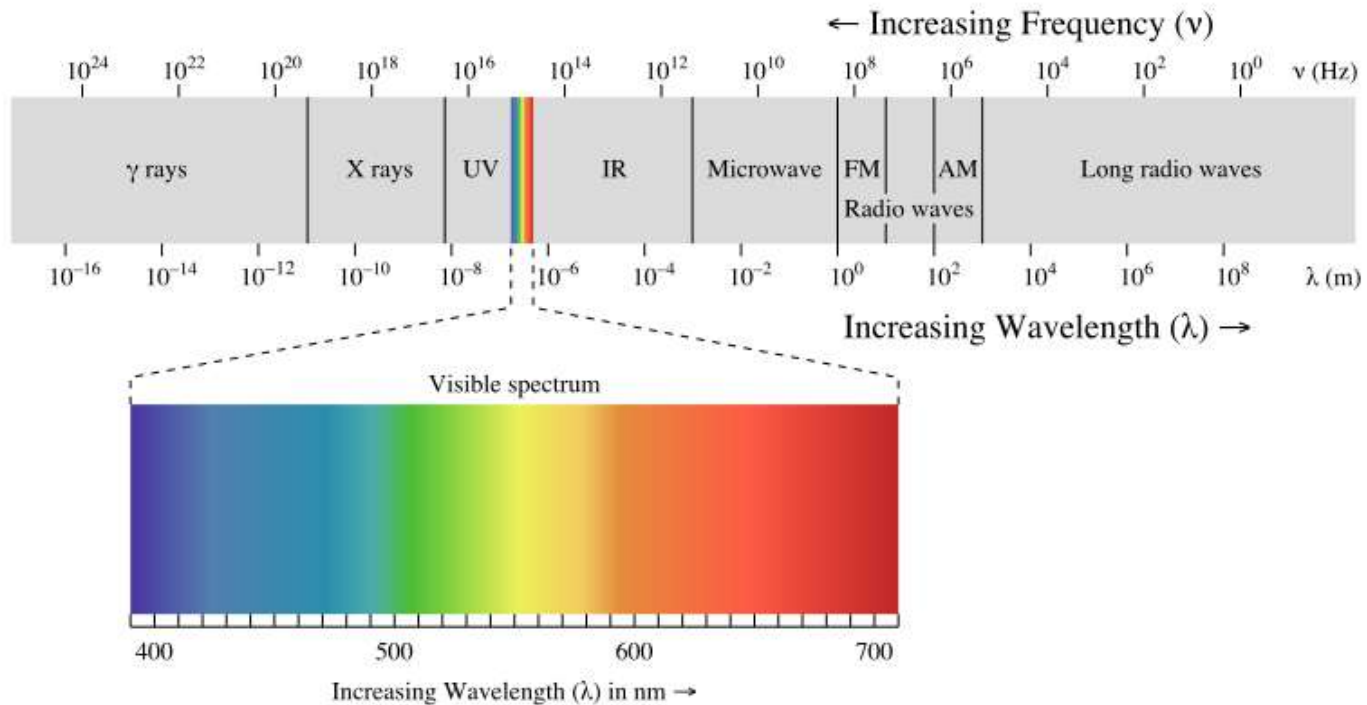


Методы исследования биологических объектов с применением электромагнитных волн оптического диапазона

**Аристов А.А.
Доцент каф. ПМЭ, ТПУ**

Диапазоны электромагнитного излучения



Диапазоны оптической области электромагнитных излучений

1. Крайний УФ диапазон	1–10 нм
2. Дальнее УФ излучение	10– 200 нм
3. Ближнее УФ излучение	200– 400 нм
4. Видимый свет	400–780 нм
5. Ближний ИК диапазон	780–2,5*10 ³ нм
6. Среднее ИК излучение	2,5–50 мкм
7. Дальнее ИК излучение	50–1000 мкм

Классификация оптических методов исследования

1. Классификация по спектральным характеристикам оптического излучения:

- б) Фотометрические
- в) Спектрофотометрические

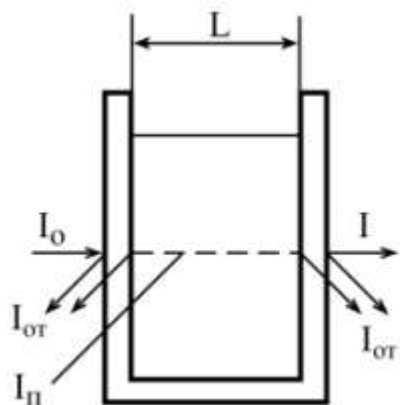
2. Классификация по виду взаимодействия вещества с излучением:

- а) Абсорбционная фотометрия
- б) Нефелометрия
- в) Турбидиметрия
- г) Рефлектометрия
- д) Эмиссионная фотометрия
- е) Люминисцентная фотометрия

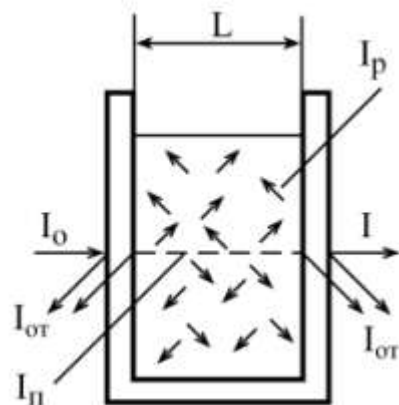
3. Классификация методов по объектам исследования:

- а) Методы исследования биопробы и жидкости (аналитические)
- б) Методы, предназначенные для исследования организма.

Явления, возникающие при прохождении света через объекты



прозрачный раствор (а)



дисперсная среда (б)

для раствора

$$I_0 = I_{\text{от}} + I_{\text{п}} + I$$

для дисперсной среды

$$I_0 = I_{\text{от}} + I_{\text{п}} + I_p + I$$

I_0 — интенсивность падающего светового потока;

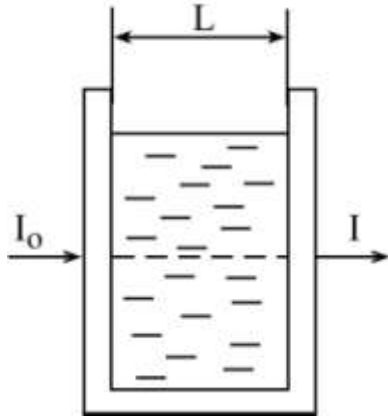
$I_{\text{от}}$ — интенсивность светового потока, отраженной от стенки кюветы;

$I_{\text{п}}$ — интенсивность светового потока, поглощенной окрашенным раствором;

I_p — интенсивность светового потока, рассеянного дисперсной средой;

I — интенсивность светового потока, прошедшего через слой исследуемого вещества.

Метод абсорбционной фотометрии



$T = I / I_0$ — коэффициент пропускания

$D = \lg(I_0/I) = \lg(I_0/T)$ — оптическая плотность

$D_\lambda = a_\lambda CL$, или

$\lg(I_0/I) = a_\lambda CL$,

или

$I = I_0 10^{(-a_\lambda CL)}$

закон

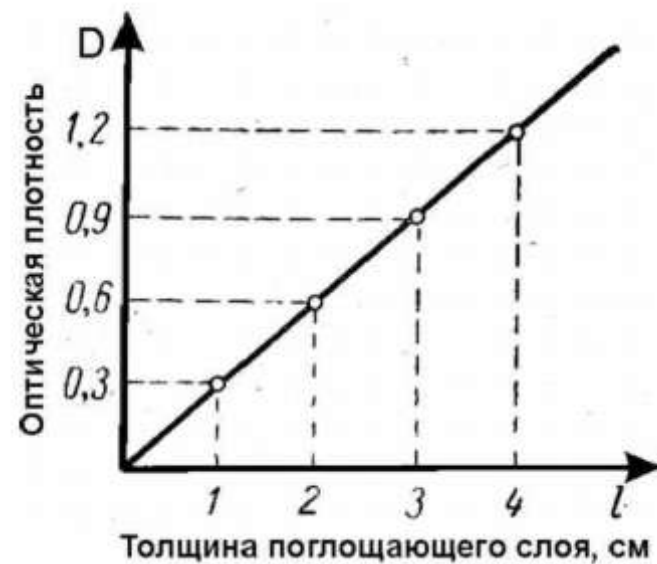
Бугера — Ламберта — Бера

$$\lg(I_0/I) = \sum_{i=1}^n \lg(I_0/I_i) = \sum_{i=1}^n D_{\lambda i}$$

Нахождение оптической плотности
р-ра для нескольких веществ



Зависимость интенсивности выходящего светового потока от толщины (концентрации) слоя поглощающего вещества



Зависимость оптической плотности от толщины (концентрации) поглощающего слоя

Приборы для абсорбционной фотометрии

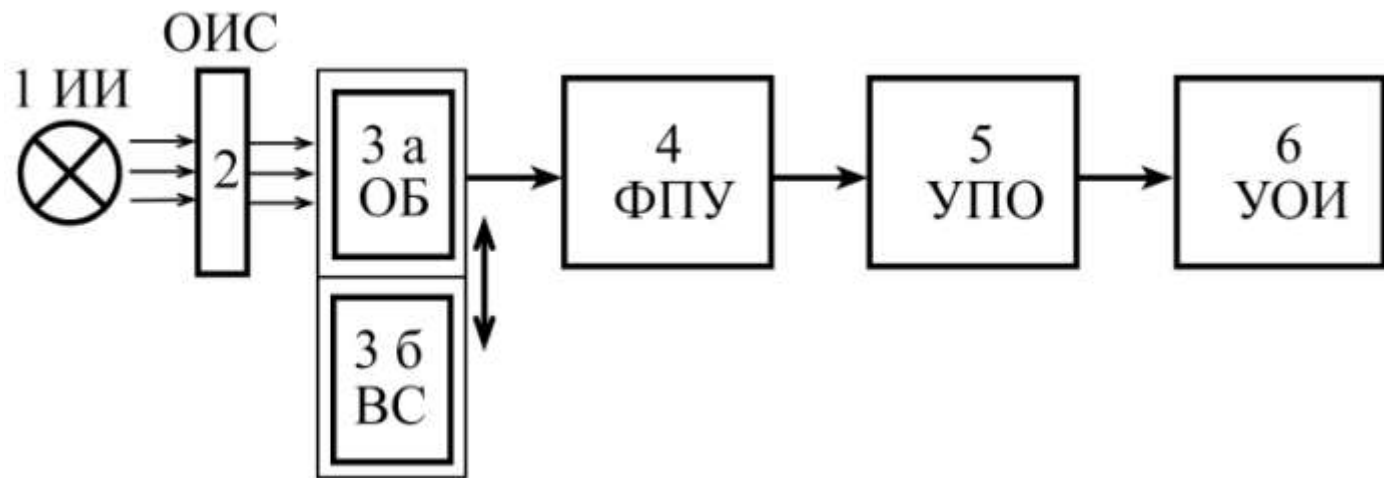
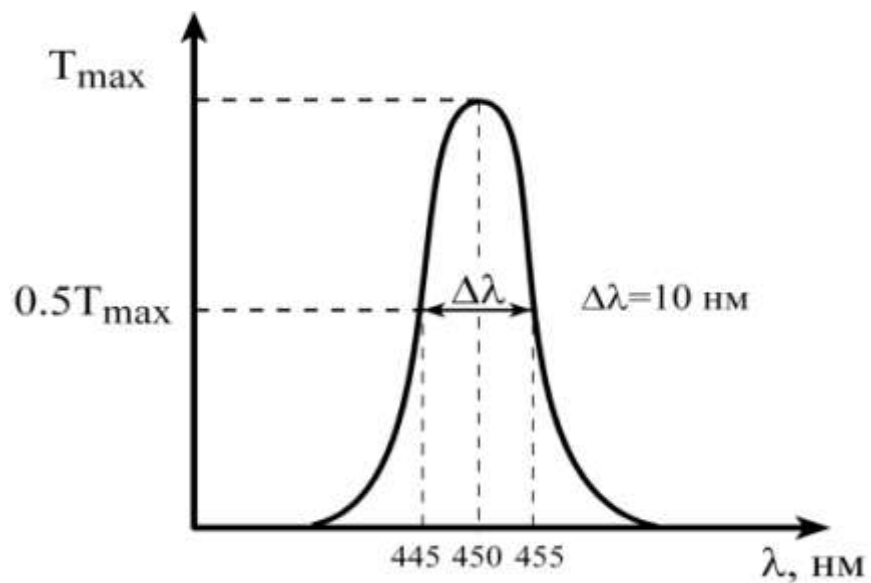


Схема одноканального абсорбционного фотоколориметра

1 – источник излучения 2 – оптическая избирательная система, 3а – исследуемое вещество, 3б – вещество сравнения, 4 – фотоприемное устройство, 5 – устройство преобразования информации, 6 – устройство регистрации и отображения информации.

Ширина полосы пропускания фильтра



Спектральная полоса фильтра определяется, как ширина в нанометрах спектральной кривой пропускания на уровне половины от максимального пропускания



Спектральная полоса фильтра из цветного стекла 3С1

Структура двухлучевого одноволнового фотометра

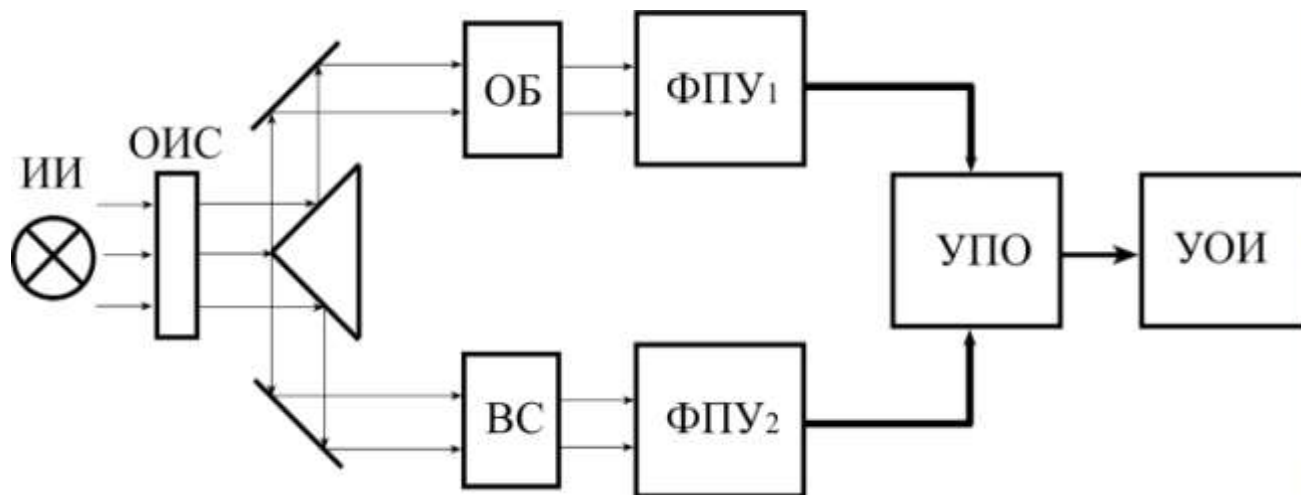
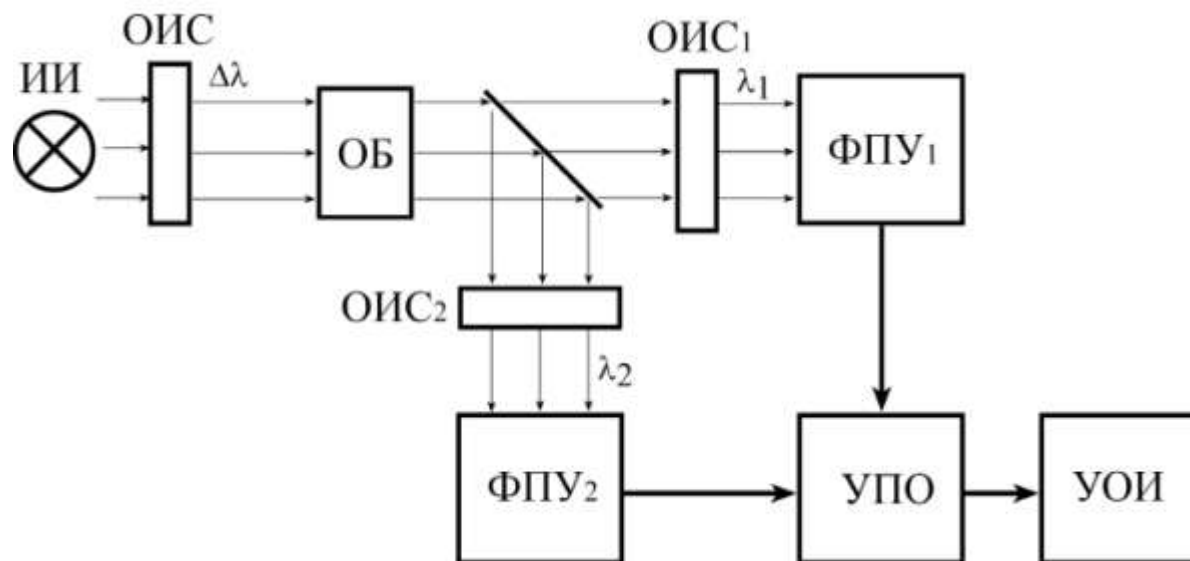
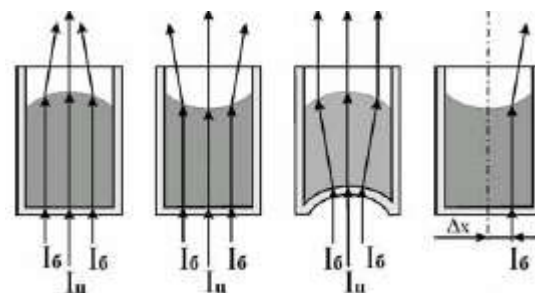
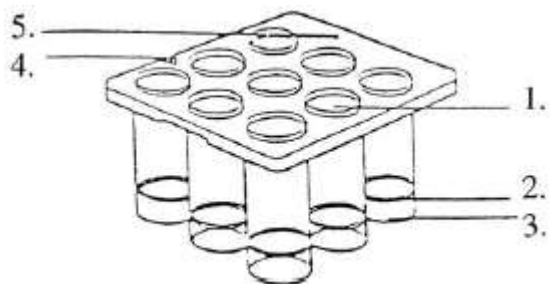
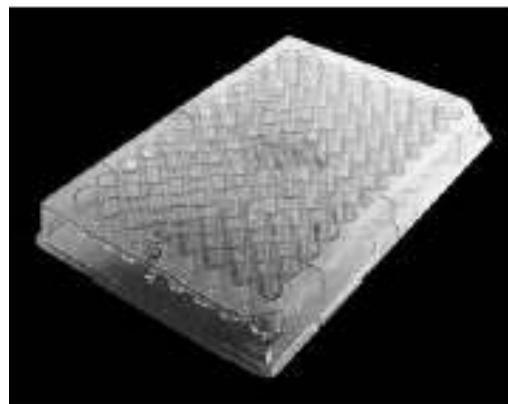


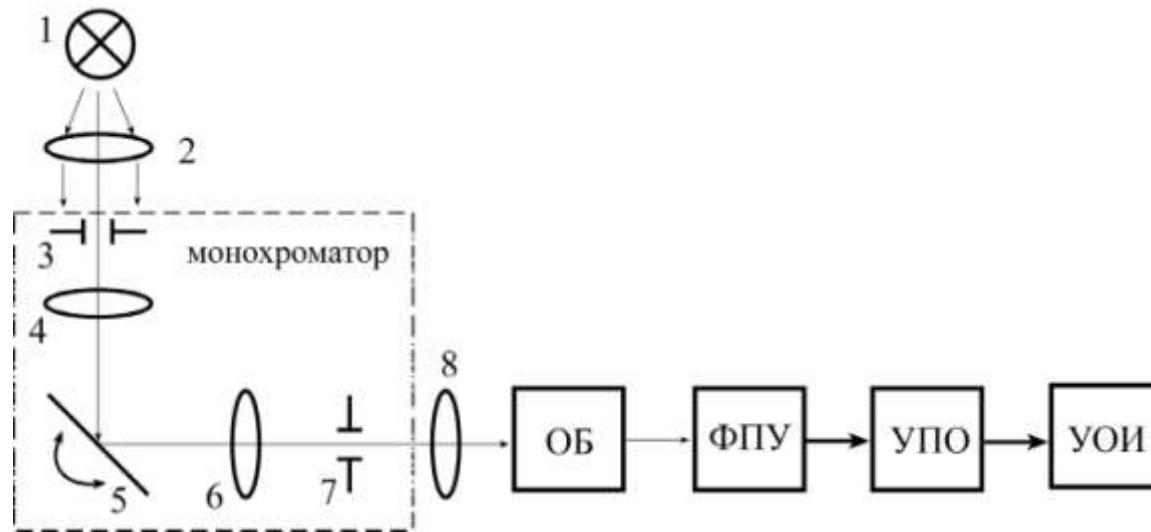
Схема двухволнового одноканального фотометра



Кюветы для фотометрирования



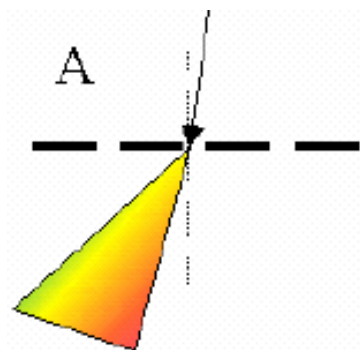
Спектрофотометры



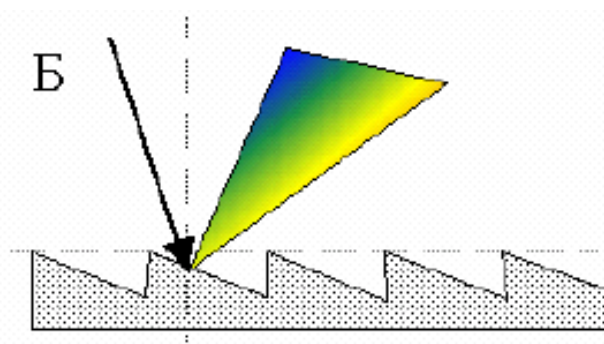
Структурная схема одноканального спектрофотометра

1 – источник света, 2 – оптическая система, направляющая поток энергии на входную щель; 3 – входная щель; 4 – оптическая система, формирующая параллельный поток световой энергии; 5 – диспергирующий элемент (призма или дифракционная решетка); 6 – оптическая система, направляющая поток энергии на выходную щель; 7 – выходная щель; 8 – оптическая система, формирующая поток энергии, проходящий через кювету.

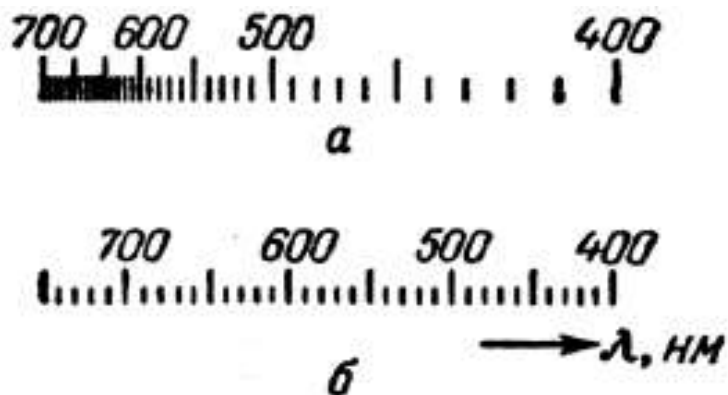
Получение спектра на дифракционных решетках



прозрачной



отражательной



Сопоставление шкал спектров,
«развернутых» призмой (а) и решеткой (б).

У призмы в диапазоне видимого света шкала убывает с увеличением длины волны .

У дифракционной решетки шкала «развертки» по длинам волн линейная.

Схемы фотометрирования



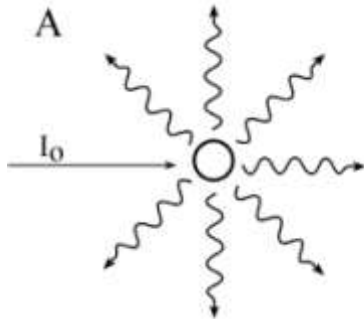
с монохроматором



с полихроматором

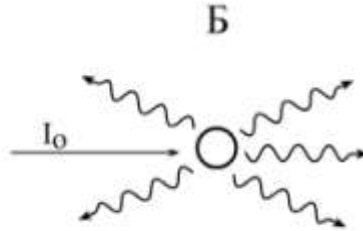
Нефелометрия

Рэлеевское рассеяние

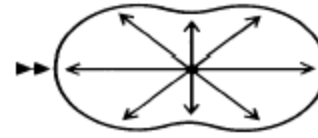


$$a < 0.12 \lambda$$

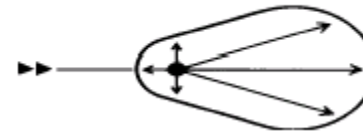
рассеяние Ми



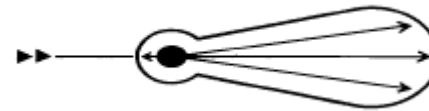
$$a > 2 \lambda$$



$$a < \lambda / 10$$



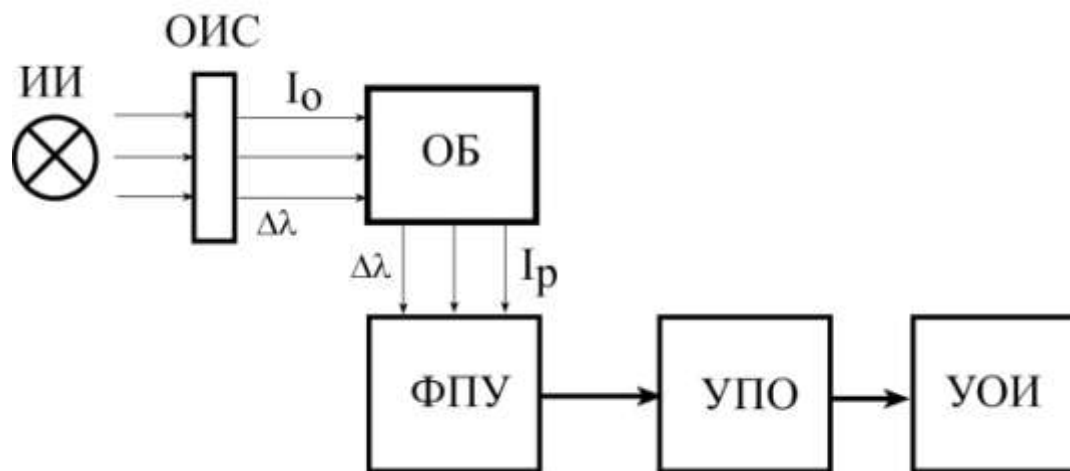
$$a < \lambda$$



$$a \geq \lambda$$

Индикатрисы рассеяния света
для частиц разных размеров

Схема нефелометра



I_0 – падающий световой поток;

I_p – световой поток рассеянный средой

Люминесцентная фотометрия

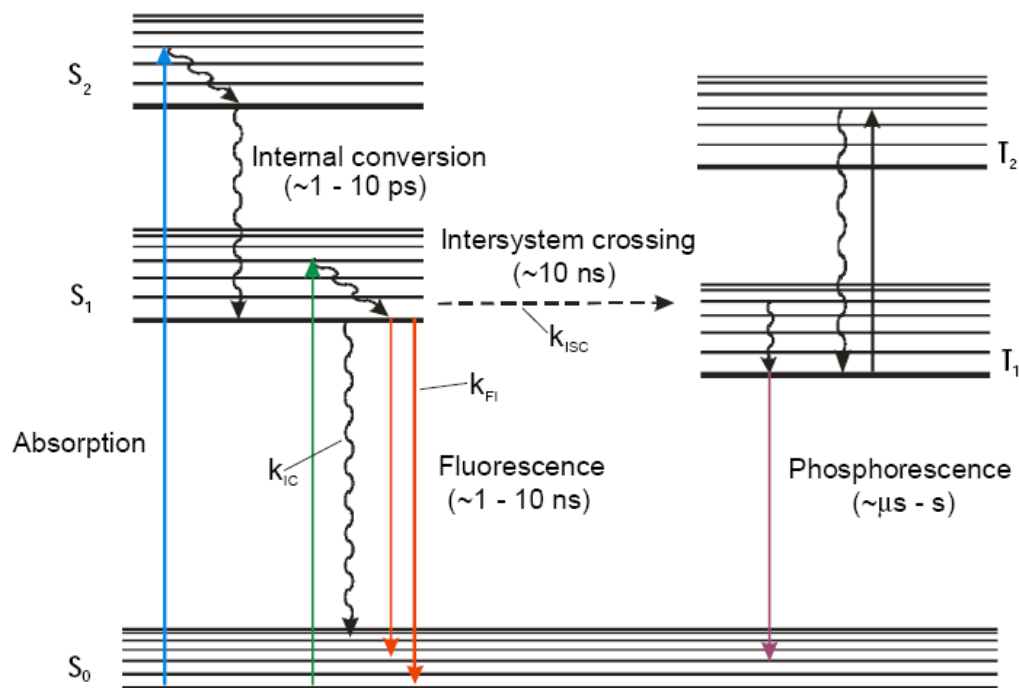
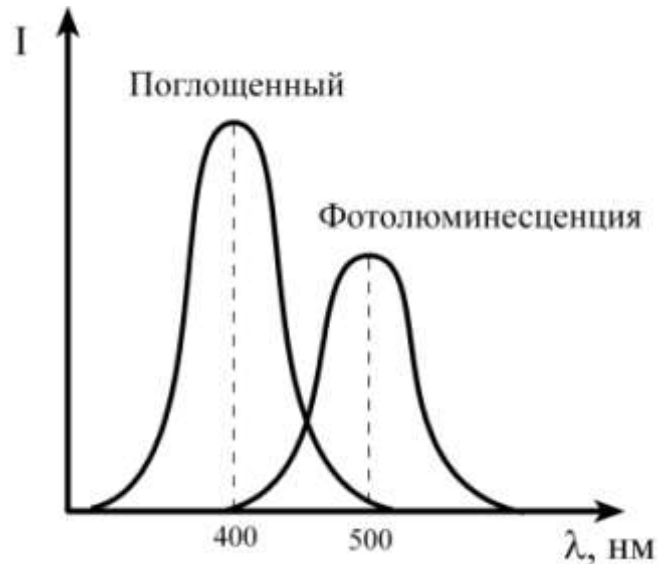


Схема энергетических переходов в молекуле при возникновении люминесценции

Основные закономерности люминесценции

Спектры поглощенного излучения и возбужденного свечения (з-н Стокса)



Определение энергетического выхода люминесценции

$$\frac{I_l}{I_n} = E = \left(\frac{I_l}{I_0} \right) (1 - \tau_l)$$

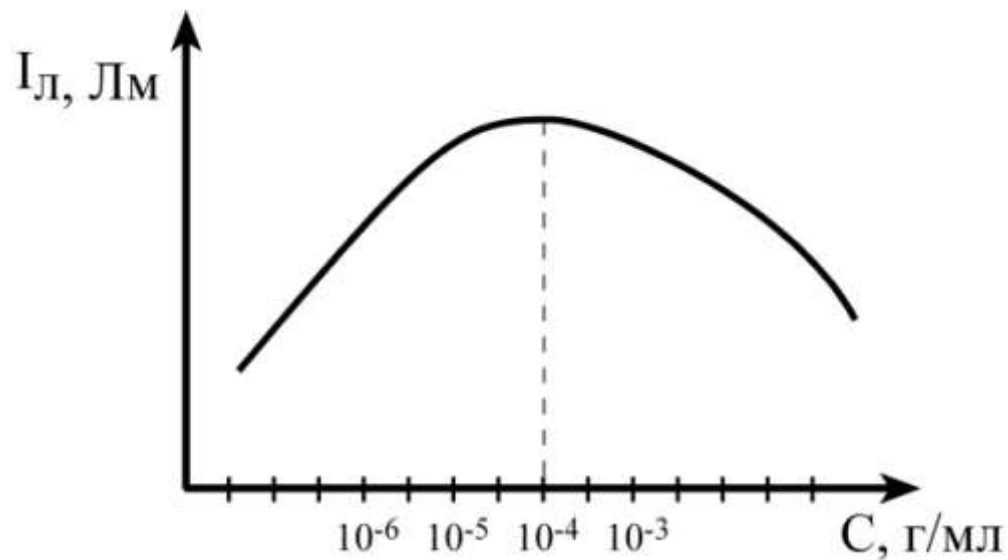
- I_l — интенсивность люминесценции,
 I_0 — интенсивность излучения,
 I_n — интенсивность поглощенного излучения,
 τ_l — коэффициент пропускания при люминесценции

Определение концентрации вещества по люминесценции

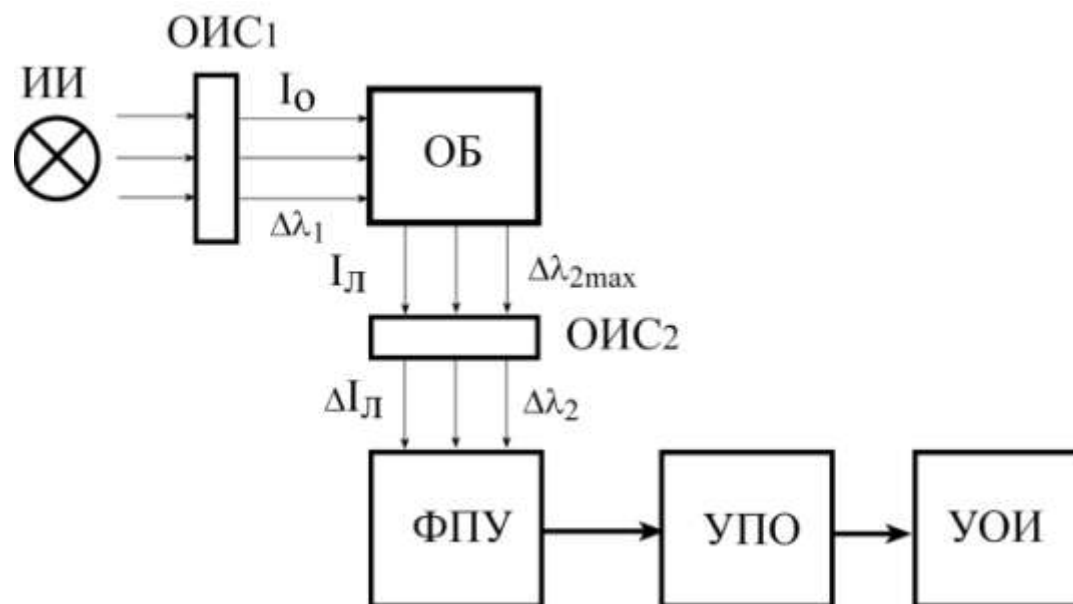
$$E = m_\lambda Cl,$$

- m_λ — удельный показатель люминесценции,
 C — концентрация флуорофора,
 l — толщина исследуемой среды

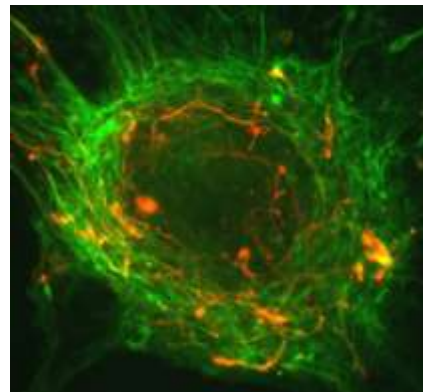
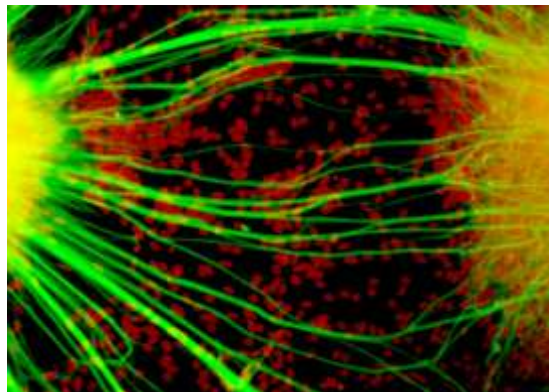
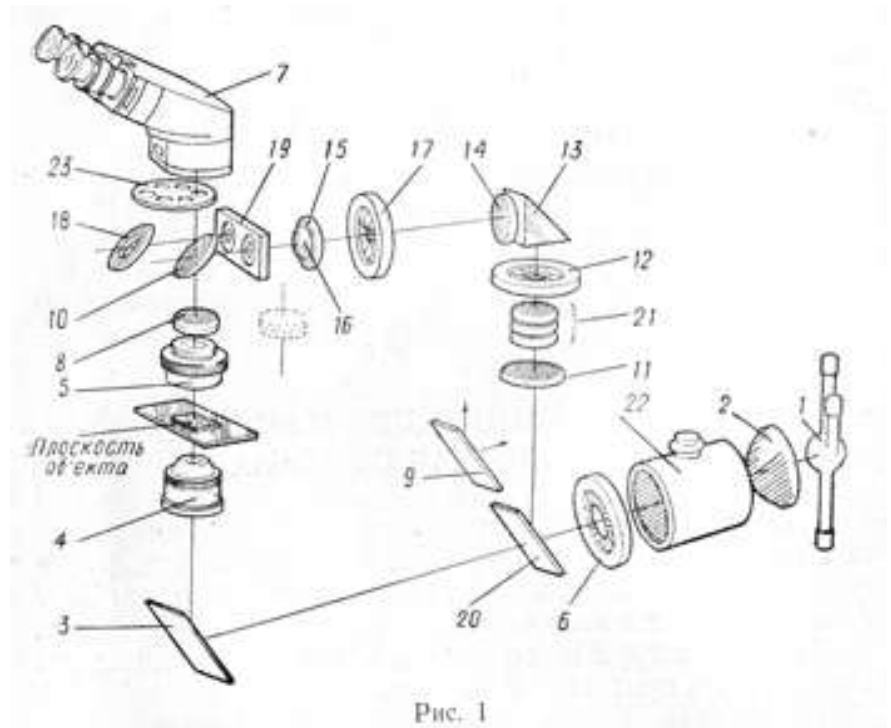
Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации флюоресцирующего вещества



Структура флуориметра



Fluorescence Microscope with Digital Camera



Химические реакции, ответственные за сверхслабое свечение животных тканей

HOON	Пероксид водорода
$\cdot\text{OO}^-$	Супероксид-радикал
$\cdot\text{OH}$	Радикал гидроксила
$^1\text{O}_2$	Синглетный кислород

Реакции активных форм кислорода

LOON	Гидропероксид
$\text{LOO}\cdot$	Диоксил-радикал
$\text{LO}\cdot$	Алкоксил радикал

Свободнорадикальное (= цепное, = перекисное) окисление липидов (= липопероксидация, = ПОЛ, = ЛПО)

$\cdot\text{NO}$	Нитроксид
ONOO^-	Пероксинитрит

Реакции активных форм азота.

Хемилюминесцентный анализ

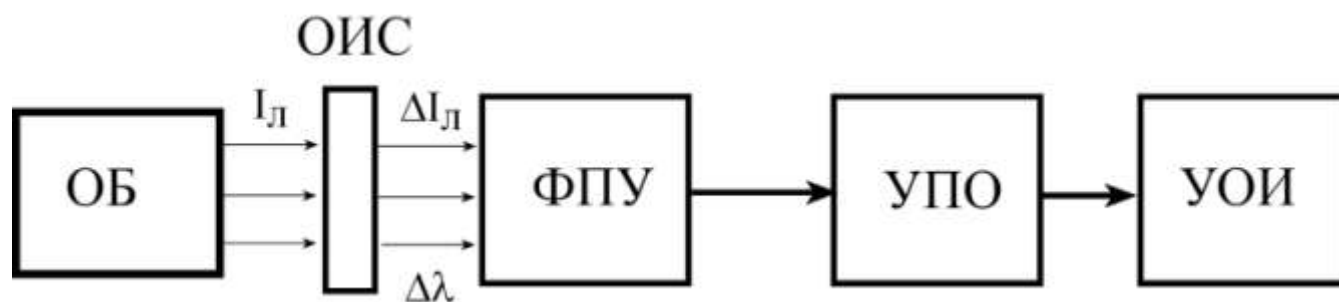


Схема хемилюминометра

Использование ХЛ в медицине

1. Изучение механизма реакций, сопровождающихся свечением (**ХЛ-реакции**).
 - Изучение первичных стадий фотобиологических процессов.
 - Изучение цепного окисления липидов.
 - Изучение «активных форм кислорода».
 - Изучение механизма действия антиоксидантов.
2. Применение ХЛ в лабораторной клинической диагностике.
 - Оценка уровня свободных радикалов.
 - Определение активности фагоцитов.
 - Определение окисляемости липопротеинов.
 - Определение антиоксидантов.

Поляриметрия

**Определение
концентрации оптически
активного вещества**

$$C = \frac{\alpha}{[\alpha]_D^{20} \cdot l}$$

C – концентрации оптически активного вещества (г/см³)

l – длина (дм) кюветы

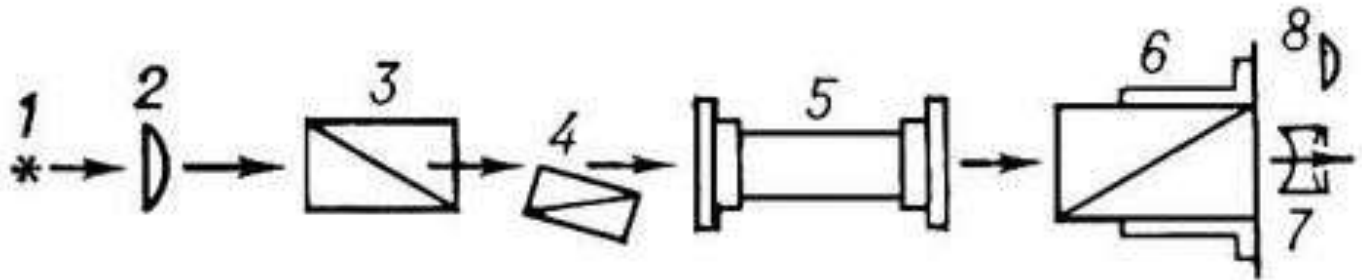
$[\alpha]_0^{20}$ – удельное вращение – угол вращения при концентрации вещества 1 г/мл, длине трубки 10 см, температуре 20°С и желтом свете (D линия Na) – $\lambda=589,3$ нм.

α – экспериментально измеренный угол вращения

Примеры оптических характеристик некоторых веществ

Раствор	$\frac{\text{град} \cdot \text{см}^3}{\text{дм} \cdot \text{г}}$	Направление вращения плоскости поляризации
Тростниковый сахар	+66,44	Правое
Виноградный сахар	+52,5	Правое
Фруктовый сахар	-91,9	Левое

Схема полутеневого поляриметра



- 1 – источник света; 2 – конденсор; 3–4 – полутеневой поляризатор;
5 – трубка с измеряемым оптически-активным веществом;
6 – анализатор с отсчётным устройством; 7 – зрительная труба;
8 – окуляр отсчётного устройства (например, микроскопа-микрометра).

Фотооксигемометрия

Определение сатурации
крови кислородом

$$SpO_2 = \frac{[HbO_2]}{[HbR] + [HbO_2]} * 100 \%$$

или

$$SpO_2 = 1 - \frac{[HbR]}{[HbR] - [HbO_2]}$$

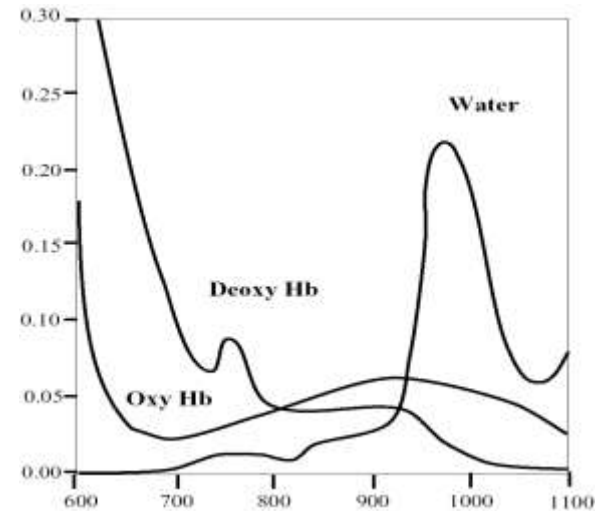
Практическое определение SpO_2
при фотооксигемометрии

$$SpO_2 = A - B \cdot \frac{D(660\text{ нм})}{D(810\text{ нм})}$$

D(660), D(810) – величины оптической
плотности крови измеренная с использованием
света с λ 660 и 810 нм

A и **B** опытные константы.

Спектры поглощения различных
форм гемоглобина



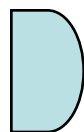
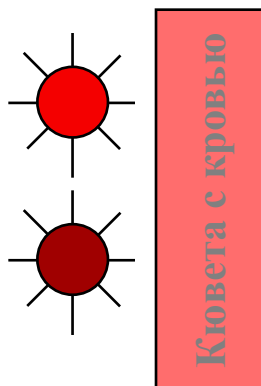
Oxy Hb оксигемоглобин

Deoxy Hb – восстановленного гемоглобин

Практическое определение SpO_2 при фотооксигеметрии

Источник
красного света
660 нм

Источник
инфракрасного
света 940 нм

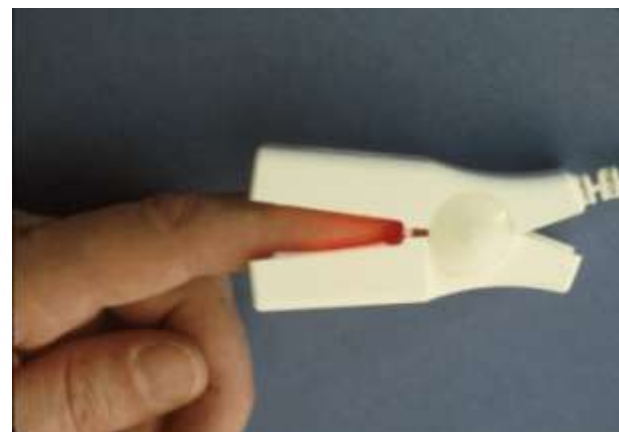
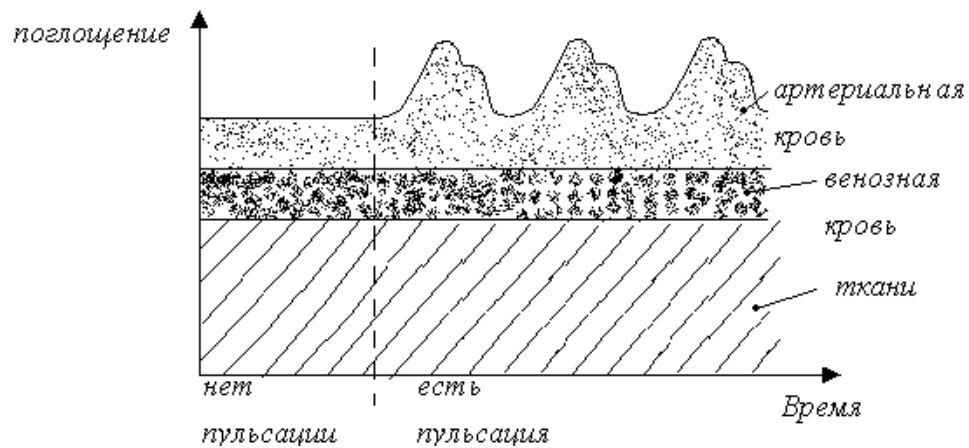


Фотодатчик

$$SpO_2 = A - B \cdot \frac{D(660 \text{ нм})}{D(810 \text{ нм})}$$

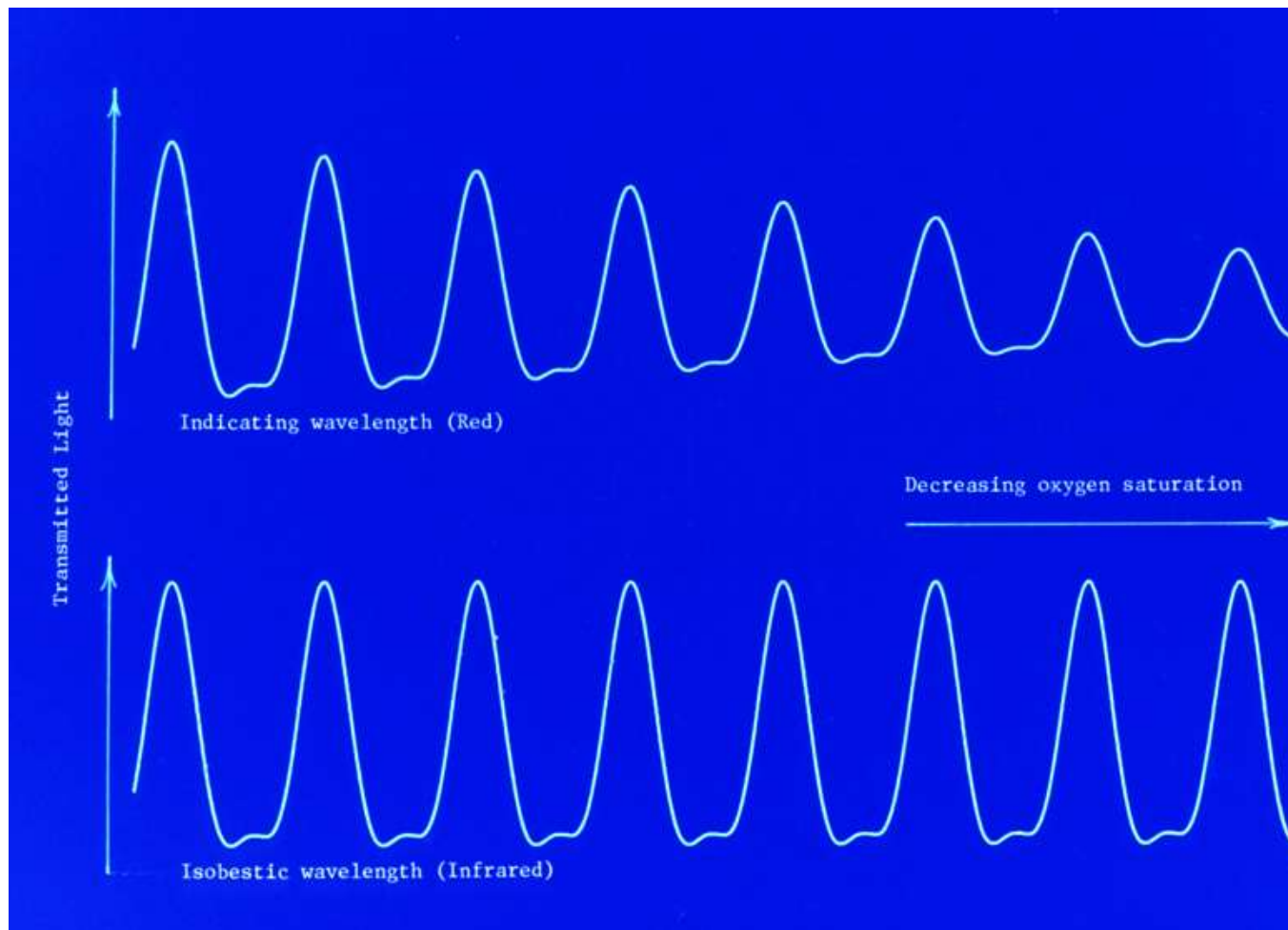
$D(660)$, $D(810)$ – величины оптической плотности крови
измеренная с использованием света с λ 660 и 810 нм
A и **B** опытные константы

Пульсоксигемометрия

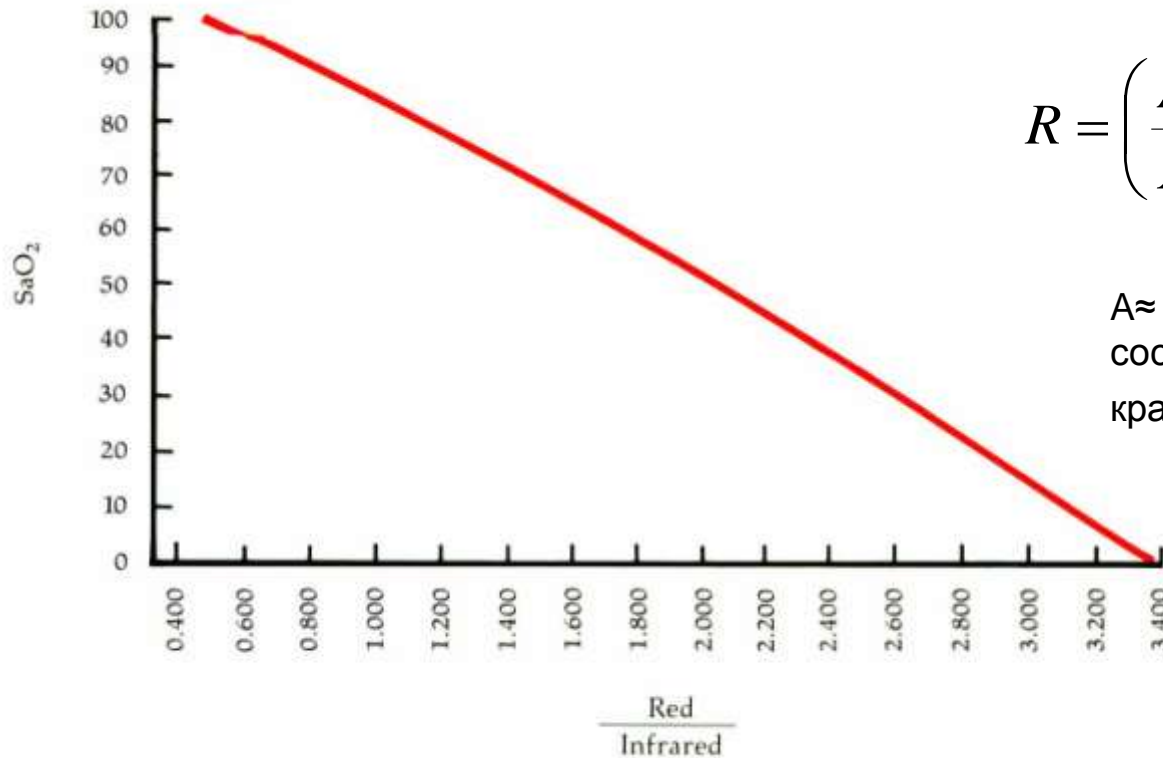


Изменение величины поглощения при пропускании света через биоткань с кровеносными сосудами

Величина красных и инфракрасных импульсов при уменьшении степени оксигенации гемоглобина



Показатель оксигенации крови



$$R = \left(\frac{A \approx}{A =} \right)^{KP} / \left(\frac{A \approx}{A =} \right)^{ИК}$$

$A \approx$ и $A =$ – пульсовые и постоянные составляющие поглощения по красному и инфракрасному каналу

Структурная схема пульсоксиметра

