

Спектрально-поляризационные свойства фотолюминесценции фиброзных оболочек глаза

Бубнова И. А.

д.м.н., ведущий научный сотрудник¹

Семчишен В. А.

к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник²

Свиридов А. П.

д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник²

Хайдуков Е. В.

к.ф.-м.н., старший научный сотрудник

Новиков И. А.

старший научный сотрудник¹

Петров С. Ю.

к.м.н., ведущий научный сотрудник¹

Пахомова Н. А.

аспирант¹

Волжанин А. В.

ординатор¹

¹ФГБНУ «НИИ глазных болезней», 119021, Российская Федерация, Москва, Россолимо ул., 11 А,Б

²Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 142190, г. Троицк, г. Москва, ул. Пионерская 2.

Прозрачность финансовой деятельности: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-29-03843.

Для контактов: Пахомова Наталья Андреевна, sp465@pochta.ru

Аннотация

Цель. Разработать бесконтактную фотолюминесцентную диагностику фиброзной оболочки глаза.

Методы. В выделенных дезэпителизированных глазах кролика было индуцировано механическое напряжение фиброзной оболочки, эквивалентное внутриглазному давлению до 50 мм рт.ст. В этих условиях с помощью спектрофотометра Flurolog-3 (Jobin-Yvon, Франция) измерены спектры фотолюминесценции роговицы и склеры при возбуждении на длинах волн 250, 350 и 450 нм и спектры возбуждения фотолюминесценции в диапазоне длин волн 300-425 нм. Получены также кросс- и ко-поляризованные спектры фотолюминесценции, индуцированные линейно поляризованным светом с длиной волны 450 нм.

Результаты. Максимум фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении на длине волны 350 нм расположен вблизи 450 нм. При этом спектр фотолюминесценции можно представить в виде двух полос: пиридиннуклеотида с максимумом на длине волны 460-470 нм и гликозилированного коллагена с максимумом на длине волны 430-440 нм. Показано, что вклад эпителия является существенным. Разница в спектрах фотолюминесценции с эпителием и без эпителия определяется люминесценцией рибофлавина, который имеет две полосы поглощения с максимумами на длинах волн 450 и 365 нм. Спектр люминесценции роговицы при возбуждении светом на длине волны 450 нм имеет максимум вблизи 540 нм, соответствующий спектру флуорофоров, локализованных в эпителии и эндотелии. Спектр

люминесценции при возбуждении на длине волны 250 нм соответствует возбуждению триптофана, присутствующем во внутриглазной линзе.

Фотолюминесценция роговицы глаза при возбуждении поляризованным светом является частично поляризованной; степень поляризации находится в пределах 0.2-0.35 и зависит от длины волны люминесценции.

Заключение. Выход фотолюминесценции роговицы глаза максимален при длине волны возбуждающего света 330-350 нм. Фотолюминесценция роговицы глаза при возбуждении линейно поляризованным светом является частично поляризованной. Степень поляризации фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении линейно поляризованным светом можно рассматривать в качестве измеряемого параметра для оценки физиологического состояния глаза.

Ключевые слова: роговица, склера, фиброзная оболочка глаза, люминесценция, поляризация, фотоупругость, коллаген

Фиброзная оболочка глаза, состоящая из склеры и роговицы, выполняет свои биологические функции благодаря специфической организации волокон коллагена, эластина и протеогликанов, определяющей механические и оптические свойства этих тканей. Исследования взаимосвязи механических напряжений в склере и роговице глаза с их оптическими параметрами представляют значительный фундаментальный и практический интерес для офтальмологии [1, 3, 4]. Они направлены, прежде всего, на разработку новых подходов к бесконтактной диагностике состояния глаза оптическими методами [2, 6]. Так, распределение интенсивности, состояние поляризации отраженного зондирующего света или спектры фотолюминесценции, индуцируемые в локальных областях тканей глаза, можно экспериментально измерить как функция внутриглазного давления. Если обратная функция стабильна от образца к образцу, то измеряемые значения перечисленных оптических параметров должны с определенностью указывать на значение внутриглазного давления. Например, известно, что роговица человеческого глаза обладает двулучепреломлением и, соответственно, свойством фотоупругости – изменением параметров, характеризующих двулучепреломление, при механической нагрузке [9, 10, 13]. В линейно упругих материалах, к которым можно отнести и роговицу глаза, оптические эффекты однозначно связаны с механическими напряжениями и с вызванными ими деформациями [7]. К возможным измеряемым параметрам можно отнести пространственное распределение интенсивности излучения второй гармоники фемтосекундного лазера, генерируемой пучками коллагеновых волокон биотканей [11]. Это позволяет визуализировать внутреннюю микроструктуру коллагенсодержащих тканей, в частности, тканей глаза [12]. В работе Аветисова С.Э (2013) показано, что фотолюминесценция роговицы глаза, возбуждаемая поляризованным излучением ртутной лампы, является частично поляризованной, причем степень поляризации зависит от механических напряжений в роговице [8]. Настоящая работа направлена на исследование спектров возбуждения и спектров фотолюминесценции роговицы и склеры глаза поляризованным излучением и выявление оптимальных условий, при которых возможен контроль внутриглазного давления оптическими методами.

Материалы и методы

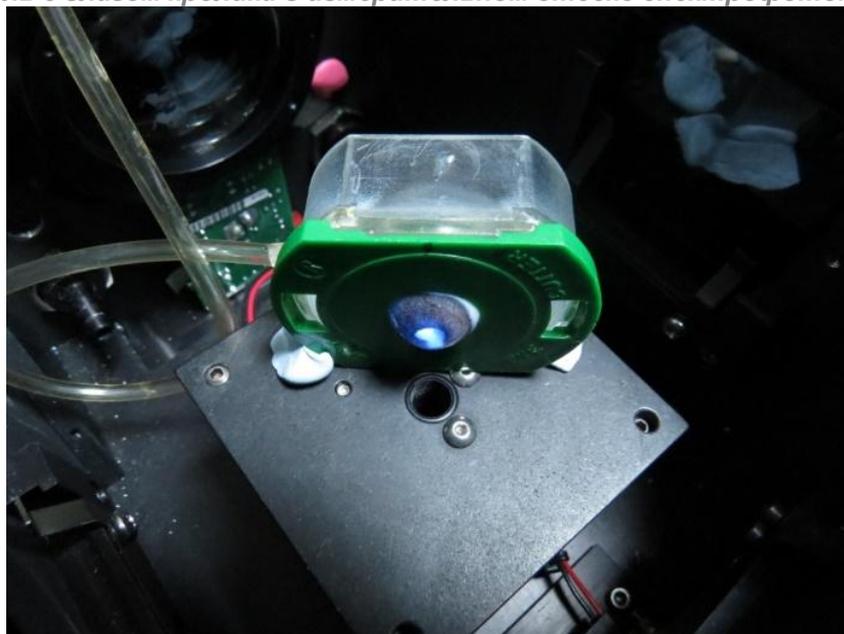
В эксперименте были использованы глаза кроликов, как с эпителием, так и предварительно дезэпителизованные. Свежие глазные яблоки кролика были изъяты и использовались в пределах 10 часов после энуклеации. Глаза транспортировались в холодильной сумке при температуре не выше 4°C. Эпителий снимался как механически, так и с использованием 20% раствора этанола. Перед проведением облучения глаза выдерживались при комнатной температуре до 18-20°C. Каждый глаз закреплялся в специальном держателе. Эпителий снимался механически специально разработанным для этих целей разметчиком. Разметчик представлял собой два соосных кольца с диаметрами 6,5 мм и 10 мм и высокими, по сравнению с обычно используемыми в офтальмологии, бортами высотой 3 мм. Внутрь колец закапывался 20% раствор спирта и выдерживался в течение 40 секунд. Затем эпителий снимался шпателем в виде цельного лоскута, который после процедуры коррекции зрения мог закрывать зону облучения. После снятия эпителия роговица промывалась дистиллированной водой и высушивалась с помощью мягкой салфетки.

Глазное яблоко фиксировалась в специальном держателе, снабженном системой поддержания интраокулярного давления. Оно располагалось на эластичной мембране и прикрывалось жестким фланцем с круглым отверстием, причем область роговицы выступала наружу через это отверстие. Затем производился наддув мембраны посредством ручного воздушного компрессора до заданного давления, которое и определяло внутриглазное давление. В наших экспериментах оно достигало 50 мм рт.ст.

Спектры фотолюминесценции и спектры возбуждения фотолюминесценции глаз регистрировали с помощью спектрофотометра Flurolog-3 (Jobin-Yvon, Франция) при возбуждении выделенной монохроматором области спектра ксеноновой разрядной лампы. Чувствительным приемником спектрометра являлся фотоумножитель P289 (Hamamatsu, Япония). Облучение и измерения спектров люминесценции проводили, не вынимая глазное яблоко из держателя при постоянном давлении наддува. На Рисунке 1 представлена фотография держателя с глазом кролика в измерительном отсеке спектрофотометра.

Для поляризационных измерений спектров люминесценции на пути луча освещения образца возбуждающим светом и на пути люминесцентного света от образца к приемнику помещали поляризационные фильтры, взаимная ориентация которых была либо параллельна, либо ортогональна. Дискриминация света в диапазоне длин волн 450-700 нм при взаимно ортогональной конфигурации используемых поляризационных фильтров была не хуже 10^2 .

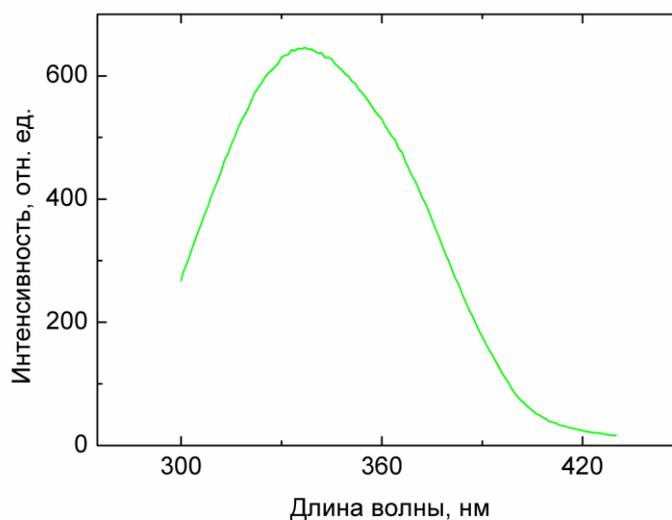
Рис. 1. Держатель с глазом кролика в измерительном отсеке спектрофотометра.



Результаты и обсуждение

Спектры фотовозбуждения

Рис. 2. Спектр возбуждения фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при регистрации на длине волны 455 нм.



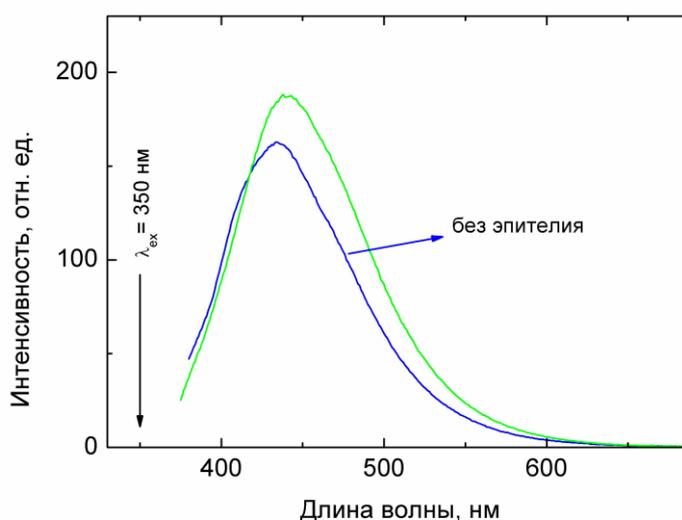
На рис. 2 изображен спектр возбуждения люминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при регистрации на длине волны 455 нм. Он имеет колоколообразный вид с максимумом

сигнала при длине волны возбуждающего света в диапазоне 330-360 нм. Отметим, что интенсивность фотолюминесценции при длине волны возбуждающего света 400 нм уменьшается примерно в 6 раз, однако остается достаточно высокой для проведения измерений с хорошей точностью обычными фотоприемниками. Важно, что полученный спектр возбуждения практически не зависит от длины волны наблюдения фотолюминесценции.

Спектры фотолюминесценции

На рис. 3 приведены спектры люминесценции роговицы глаза кролика с эпителием и без эпителия *in vitro* при возбуждении светом на длине волны 350 нм. Полученные спектры имеют сложную структуру и могут быть представлены в виде суммы двух полос гауссового профиля с максимумами в областях 430-440 и 470-480 нм (на рис. 3 не показаны). Видно, что вклад эпителия в сигнал люминесценции довольно значителен.

*Рис. 3. Спектры люминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при возбуждении на длине волны 350 нм с эпителием (зеленая кривая) и без эпителия (синяя кривая).*



С практической точки зрения значительный интерес представляют исследования возможности возбуждения люминесценции роговицы глаза светом ультрафиолетовой и синей областей спектра. Нами было показано, что при возбуждении довольно слабым светом ксеноновой лампы с длиной волны 450 нм люминесценция роговицы глаза может быть отчетливо измерена.

Рис. 4А. Спектры люминесценции роговицы глаза при возбуждении на длинах волн 450 нм.

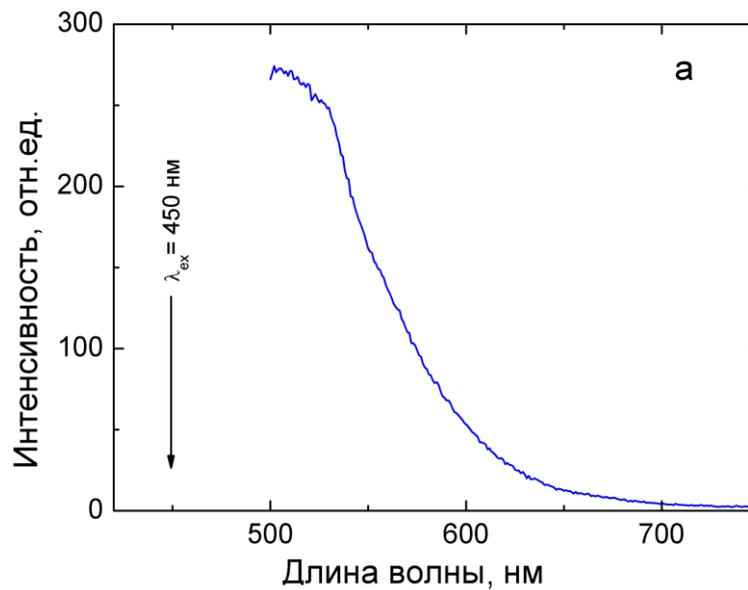
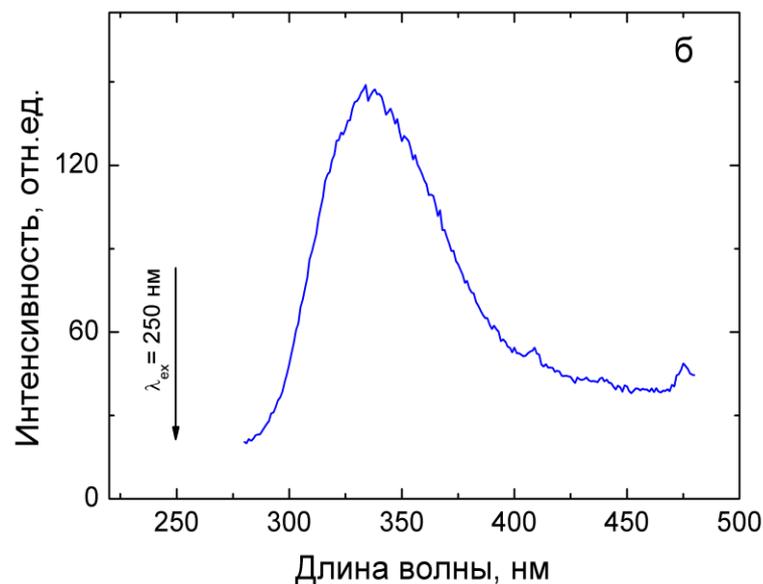


Рис. 4Б. Спектры люминесценции роговицы глаза при возбуждении на длинах волн 250 нм.

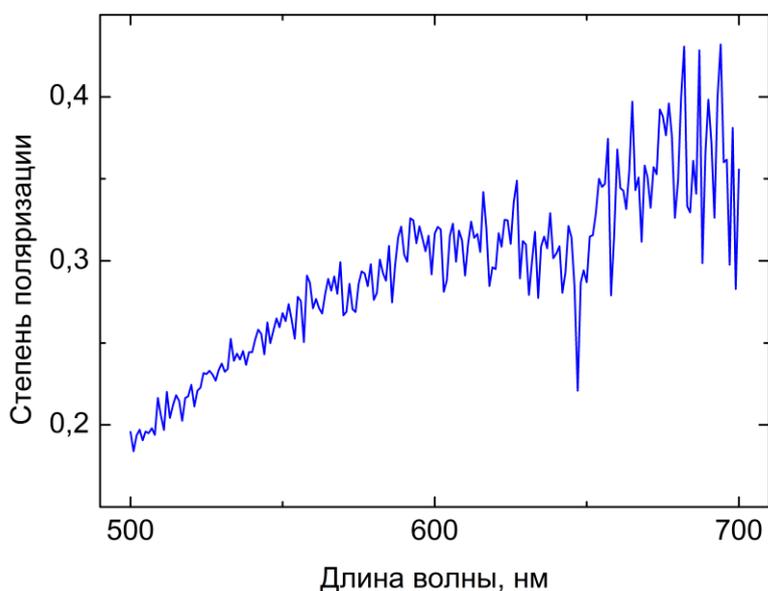


Из рис. 4а видно, что спектр ее люминесценции простирается примерно до 700 нм. Спектр фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении в УФ области представляет в основном академический интерес. Для практических клинических применений необходимо учитывать возможные фотохимические повреждения клеток и биотканей. На рис. 4б представлен спектр фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении на длине волны 250 нм. Все представленные в данной работе спектры люминесценции отстроены от длины волны возбуждающего света в сторону больших длин волн на 20-50 нм, чтобы исключить его влияние на результаты спектральных измерений.

Поляризационные измерения

Поляризационные измерения спектров люминесценции глаза *in vitro* проводились при возбуждении на длине волны 450 нм линейно поляризованным светом. Для этого перед приемником спектрометра помещали поляризатор, оптическая ось которого ориентировали параллельно или перпендикулярно вектору поляризации возбуждающего света. Полученные ко- и кросс-поляризационные спектры позволили измерить зависимость от длины волны доли линейно поляризованного света в фотолюминесценции как разница сигналов этих измерений деленная на их сумму. Итоги измерений и соответствующих вычислений приведены на Рисунке 5. Из Рисунка 5 видно, что свет фотолюминесценции зависит от положения поляризатора-анализатора, причем степень поляризации изменяется довольно сильно при изменении длины волны наблюдения: от ~ 0.2 при длине волны 500 нм до ~ 0.35 на длине волны 700 нм. Шумы измерений степени поляризации также зависят от длины волны. Они значительно растут с увеличением длины волны, что, очевидно, связано с ослаблением сигнала люминесценции.

*Рис. 5. Спектр степени поляризации люминесценции глаза *in vitro*, полученный при возбуждении на длине волны 450 нм линейно поляризованным светом.*



Спектр люминесценции глаза при возбуждении светом с длиной волны 450 нм имеет максимум на длине волны 540 нм, соответствующий спектру флуорофоров, главным образом, флавопротеинам (флавин, флавин моноклеотид и аденин динуклеотид), которые преимущественно локализованы в эпителии и эндотелии. Разница в спектрах фотолюминесценции глаза, с эпителием и без эпителия, представленные на рис. 3 определяется, скорее всего, вкладом сигнала люминесценции рибофлавина, который имеет две полосы поглощения с максимумами на длинах волн 450 и 365 нм [5].

Спектр люминесценции глаза, полученный при возбуждении на длине волны 250 нм, соответствует триптофану, который содержится во внутриглазной линзе [5].

Спектр люминесценции при возбуждении на длине волны 350 нм с максимумом вблизи 440-455 нм имеет сложную структуру и состоит из двух линий люминесценции, а именно: люминесценции пиридиннуклеотида (никотинамид динуклеотид и никотинамид динуклеотид фосфат) с максимумом вблизи 460-470 нм и люминесценции гликозилированного коллагена с максимумом вблизи 430-440 нм [5].

Заключение

В ходе исследования были получены новые данные о спектрах люминесценции и спектрах возбуждения тканей глаза, необходимые для проведения исследований и разработок аппаратуры в области бесконтактной неинвазивной диагностики структурных нарушений тканей глаза. В частности, показано, что доля линейно поляризованного света в фотолюминесценции тканей глаза при возбуждении линейно поляризованным светом на длине волны 450 нм находится в пределах 20-30%.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку работы (грант 15-29-03843).

Литература

1. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Завалишин Н.Н., Ненюков А.К. Экспериментальное исследование механических характеристик роговицы и прилегающих участков склеры // Офтальмологический журнал. 1988. Vol. N 4. P. 233-237
2. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Казарян Э.Э., Шмелева-Демир О.А., et al. Результаты клинической оценки нового скринингового метода определения индивидуальной нормы внутриглазного давления // Вестник офтальмологии. 2010. Vol. 126. N 2. P. 5-7
3. Аветисов С.Э., Полунин Г.С., Шеремет Н.Л., Муранов К.О., et al. Поиск шапероноподобных антикатарактальных препаратов - антиагрегантов кристаллинов хрусталика глаза. Сообщение 3. Возможности динамического наблюдения за процессами катарактогенеза на "продолжительной" модели уф-индуцированной катаракты у крыс // Вестник офтальмологии. 2008. Vol. 124. N 2. P. 3-7
4. Арутюнян Л.Л., Еричев В.П., Филиппова О.М., Акопян А.И. Вязкоэластические свойства роговицы при первичной открытоугольной глаукоме // Глаукома. 2007. Vol. N 1. P. 62-65
5. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. Москва: Наука; 1965. 232 с.

6. Еремина М.В., Еричев В.П., Якубова Л.В. Влияние центральной толщины роговицы на уровень внутриглазного давления в норме и при глаукоме // Глаукома. 2006. Vol. N 4. P. 78-83
7. Семчишен А.В., Семчишен В.А. Измерения фотоупругости роговицы глаза. Астигматизм и аномалии внутренних напряжений роговицы // Альманах клинической медицины. 2008. Vol. 17. N 2. P. 128-132
8. Avetisov S.E., Bubnova I.A., Novikov I.A., Antonov A.A., et al. Experimental study on the mechanical strain of corneal collagen // Journal of biomechanics. 2013. Vol. 46. N 10. P. 1648-1654
9. Duan L., Yamanari M., Yasuno Y. Automated phase retardation oriented segmentation of chorio-scleral interface by polarization sensitive optical coherence tomography // Optics express. 2012. Vol. 20. N 3. P. 3353-3366
10. Nagase S., Yamanari M., Tanaka R., Yasui T., et al. Anisotropic alteration of scleral birefringence to uniaxial mechanical strain // PloS one. 2013. Vol. 8. N 3. P. e58716
11. Roth S., Freund I. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon // Biopolymers. 1981. Vol. 20. N 6. P. 1271-1290
12. Tan H.Y., Teng S.W., Lo W., Lin W.C., et al. Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part 1: second harmonic generation imaging of cornea stroma // Journal of biomedical optics. 2005. Vol. 10. N 5. P. 054019
13. Yamanari M., Nagase S., Fukuda S., Ishii K., et al. Scleral birefringence as measured by polarization-sensitive optical coherence tomography and ocular biometric parameters of human eyes in vivo // Biomedical optics express. 2014. Vol. 5. N 5. P. 1391-1402

Spectral-polarized properties of eye fibrous tunic photoluminescence

Bubnova I. A.

Med.Sc.D., leading research associate¹

Semchishen V. A.

Ph.D., leading research associate²

Sviridov A. P.

Ph.D., leading research associate²

Khaydukov E. V.

senior research associate²

Novikov I. A.

senior research associate¹

Petrov S.Yu.

Ph.D., leading research associate¹

Pakhomova N. A.

Postgraduate student¹

Volzhanin A. V.

resident¹

¹Scientific Research Institute of Eye Diseases, 11 A,B, Rossolimo St., Moscow, Russian Federation, 119021

²Institute of Photonic Technologies of Federal Research Centre "Crystallography and Photonics" of Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya str., Troitsk, Moscow, Russian Federation, 142190

Abstract

Aim. To develop a non-contact photoluminescent diagnostic method for the fibrous tunic of the eye.

Methods. Mechanical stress of eye fibrous tunic equal to 50 mmHg was induced in a deepithelized rabbit eye. In these conditions a Flurolog-3 spectrophotometer (Jobin-Yvon, France) was used to measure cornea and sclera photoluminescence excitation spectra in with 250, 350 and 450 nm wavelengths and photoluminescence excitation spectra within the 300-425 nm wavelength range. Cross- and co-polarized photoluminescence spectra induced with linearly polarized light with 450 nm wavelength were also acquired.

Results. Maximal corneal photoluminescence excited at 350nm wavelength approaches 450nm. Meanwhile, photoluminescence spectrum can be presented as two bars: pyridine nucleotide with its maximum at 460-470nm and glycated collagen at 430-440nm. Epithelium contribution is shown to be substantial. The difference of photoluminescence spectra with and without epithelium is defined by luminescence of riboflavin that has two absorption bands with maximums at 450 and 365nm. Corneal luminescence spectrum excited at 450nm wavelength has a maximum nearing 540nm, that coincides with the spectrum of fluorophores localized in epithelium and endothelium. Luminescence spectrum excited at 250nm wavelength corresponds with the spectrum of tryptophane, that is present in the intraocular lens.

Corneal photoluminescence induced with polarized light is partly polarized with degree of polarization equaling 0.2-0.35 and dependent on luminescence wavelength.

Conclusion. Corneal photoluminescence yield is maximal at 330-350nm excitation light wavelength. Eye photoluminescence induced with linearly polarized light is partly polarized. The degree of corneal photoluminescence polarization induced with linearly polarized light can be calculated to assess the physiological state of the eye.

Keywords: cornea, sclera, eye fibrous tunic, luminescence, polarization, elasto-optic effect, collagen

References

1. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Завалишин Н.Н., Ненюков А.К. Экспериментальное исследование механических характеристик роговицы и прилегающих участков склеры // Офтальмологический журнал. 1988. Vol. N 4. P. 233-237
2. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Казарян Э.Э., Шмелева-Демир О.А., et al. Результаты клинической оценки нового скринингового метода определения индивидуальной нормы внутриглазного давления // Вестник офтальмологии. 2010. Vol. 126. N 2. P. 5-7
3. Аветисов С.Э., Полунин Г.С., Шеремет Н.Л., Муранов К.О., et al. Поиск шапероноподобных антикатарактальных препаратов - антиагрегантов кристаллинов хрусталика глаза. Сообщение 3. Возможности динамического наблюдения за процессами катарактогенеза на "продолгованной" модели УФ-индуцированной катаракты у крыс // Вестник офтальмологии. 2008. Vol. 124. N 2. P. 3-7
4. Арутюнян Л.Л., Еричев В.П., Филиппова О.М., Акопян А.И. Вязкоэластические свойства роговицы при первичной открытоугольной глаукоме // Глаукома. 2007. Vol. N 1. P. 62-65
5. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. Москва: Наука; 1965. 232 с.
6. Еремина М.В., Еричев В.П., Якубова Л.В. Влияние центральной толщины роговицы на уровень внутриглазного давления в норме и при глаукоме // Глаукома. 2006. Vol. N 4. P. 78-83
7. Семчишен А.В., Семчишен В.А. Измерения фотоупругости роговицы глаза. Астигматизм и аномалии внутренних напряжений роговицы // Альманах клинической медицины. 2008. Vol. 17. N 2. P. 128-132

8. Avetisov S.E., Bubnova I.A., Novikov I.A., Antonov A.A., et al. Experimental study on the mechanical strain of corneal collagen // *Journal of biomechanics*. 2013. Vol. 46. N 10. P. 1648-1654
9. Duan L., Yamanari M., Yasuno Y. Automated phase retardation oriented segmentation of chorio-scleral interface by polarization sensitive optical coherence tomography // *Optics express*. 2012. Vol. 20. N 3. P. 3353-3366
10. Nagase S., Yamanari M., Tanaka R., Yasui T., et al. Anisotropic alteration of scleral birefringence to uniaxial mechanical strain // *PloS one*. 2013. Vol. 8. N 3. P. e58716
11. Roth S., Freund I. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon // *Biopolymers*. 1981. Vol. 20. N 6. P. 1271-1290
12. Tan H.Y., Teng S.W., Lo W., Lin W.C., et al. Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part 1: second harmonic generation imaging of cornea stroma // *Journal of biomedical optics*. 2005. Vol. 10. N 5. P. 054019
13. Yamanari M., Nagase S., Fukuda S., Ishii K., et al. Scleral birefringence as measured by polarization-sensitive optical coherence tomography and ocular biometric parameters of human eyes in vivo // *Biomedical optics express*. 2014. Vol. 5. N 5. P. 1391-1402