

МЕТОД БЕСКОНТАКТНОЙ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЯ ФИБРОЗНОЙ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗА

С.Ю. Петров¹, И.А. Бубнова¹, И.А. Новиков¹, Н.А. Пахомова¹, А.В. Волжанин¹, В.А. Семчишен², Е.В. Хайдуков², А.П. Свиридов²

¹Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва, Россия

²Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и Фотоника» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме

Бесконтактная оптическая диагностика структурных нарушений глаза обладает рядом преимуществ: высокая скорость, точность и большой спектр параметров, доступных для анализа. В работе представлены результаты исследований фотолюминесценции фиброзной оболочки глаза, возбуждаемой поляризованным светом, в зависимости от внутриглазного давления. В эксперименте применяли деэпителизированные глаза кролика с искусственно повышенным офтальмотонусом до 50 мм рт.ст. При этом склеру и роговицу освещали линейно поляризованным светом на длинах волн 250, 350 и 450 нм, возбуждая фотолюминесценцию в диапазоне длин волн до 700 нм. Были получены ко- и кросс-поляризованные спектры фотолюминесценции, возбуждаемые линейно поляризованным светом. При возбуждении поляризованным светом фотолюминесценция роговицы оказалась частично поляризованной. В зависимости от длины волны фотолюминесценции степень поляризации изменяется от 0,2 до 0,35. Показано, что степень поляризации фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении линейно поляризованным светом можно рассматривать в качестве измеряемого параметра для оценки состояния внутриглазного давления. Показано, что спектр фотолюминесценции состоит из двух полос с максимумами вблизи 460–470 и 430–440 нм. Эти полосы отнесены, соответственно, к пиридиннуклеотидам и гликозилированному коллагену. Существенный вклад оказывает эпителий глаза, в котором содержится рибофлавин с полосами поглощения вблизи длин волн 450 и 365 нм. При возбуждении на длине волны 450 нм максимум фотолюминесценции расположен вблизи 540 нм, что соответствует спектру флуорофоров в эндотелии и эпителии. Спектр фотолюминесценции при возбуждении на длине волны 250 нм можно приписать триптофану, находящемуся в хрусталике глаза.

Ключевые слова: глаукома, роговица, склера, фиброзная оболочка глаза, фотолюминесценция, поляризация.

Для цитирования: Петров С.Ю., Бубнова И.А., Новиков И.А., Пахомова Н.А., Волжанин А.В., Семчишен В.А., Хайдуков Е.В., Свиридов А.П. Метод бесконтактной фотолюминесцентной диагностики состояния фиброзной оболочки глаза // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 32–36.

Контакты: Петров С.Ю., e-mail: glaucomatosis@gmail.com

METHOD OF NON-CONTACT PHOTOLUMINESCENT DIAGNOSTICS OF THE EYE FIBROUS TUNIC CONDITION

Petrov S.Yu.¹, Bubnova I.A.¹, Novikov I.A.¹, Pakhomova N.A.¹, Volzhanin A.V.¹, Semchishen V.A.², Khaydukov E.V.², Sviridov A.P.²

¹Experience Scientific-Research Institute of Eye Diseases of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

²Shubnikov Crystallography Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract

Non-contact optical diagnostics of structural disorders of the eye has a number of advantages: high speed, accuracy and a large range of parameters available for analysis. The paper presents the results of studies of the photoluminescence of the fibrous tunic of the eye, excited by polarized light, depending on the intraocular pressure. In the experiments, isolated de-epithelized eyes of the rabbit were used, inside of which pressure up to 50 mm Hg was artificially created. Under these conditions, the cornea and sclera were illuminated with linearly polarized light at wavelengths of 250, 350 and 450 nm, exciting photoluminescence in the wavelength range up to 700 nm. Cross and co-polarized photoluminescence spectra excited by linearly polarized light were obtained. It has been established that, when excited by polarized light, the photoluminescence of the cornea is partially polarized. Depending on the wavelength of the photoluminescence, the degree of polarization varies from 0.2 to 0.35. It is shown that the degree of polarization of the photoluminescence of the cornea of the eye upon excitation by linearly polarized light can be used as a measurable parameter for assessing the physiological state of the eye. It is shown that the photoluminescence spectrum consists of two bands with maxima near 460–470

and 430-440 nm. These bands are assigned, respectively, to pyridinnucleotides and glycosylated collagen. A significant contribution can be made by the epithelium of the eye, which contains riboflavin with characteristic absorption bands near 450 and 365 nm. When excited at 450 nm, the photoluminescence maximum is located near 540 nm, which corresponds to the spectrum of fluorophores in the endothelium and epithelium. The spectrum of photoluminescence upon excitation at a wavelength of 250 nm can be attributed to tryptophan located in the intraocular lens.

Keywords: glaucoma, cornea, sclera, fibrous envelope of the eye, photoluminescence, polarization.

Key words: laser photonics, holography, correlation, coherence, optical computing, photonic processor.

For citations: Petrov S.Yu., Bubnova I.A., Novikov I.A., Petrov S.Yu., Pakhomova N.A., Volzhanin A.V., Semchishen V.A., Khaydukov E.V., Sviridov A.P. Method of non-contact photoluminescent diagnostics of the eye fibrous tunic condition, *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 1, pp. 32–36 (in Russian).

Contacts: Petrov S.Yu., e-mail: glaucomatosis@gmail.com

Введение

Механические и оптические свойства склеры и роговицы глаза определяются специфической организацией волокон коллагена, эластина и протеогликанов, что позволяет выполнять им свои биологические функции. Исследования взаимосвязей механических напряжений в склере и роговице глаза с их оптическими характеристиками вызывают значительный фундаментальный и практический интерес офтальмологов [1-3] поскольку они открывают новые перспективы для бесконтактной оптической диагностики состояния глаза [4,5]. Например, состояние поляризации фотолюминесценции, возбуждаемой в локальных областях тканей глаза поляризованным светом, можно экспериментально измерить в зависимости от внутриглазного давления. Тогда обратная функция может стать основой для контроля внутриглазного давления. Так, роговица глаза обладает свойством фотоупругости – изменением параметров, характеризующих двулучепреломление при механической нагрузке [6-8]. Поскольку роговицу глаза можно отнести к линейно упругим материалам, то механические напряжения в ней и вызванные ими деформации однозначно связаны с оптическими эффектами [9]. В последнее время активно развиваются методики визуализации внутренней микроструктуры коллагенсодержащих тканей, в частности, тканей глаза, измеряя интенсивности излучения второй гармоники, генерируемой пучками коллагеновых волокон биотканей [10,11]. В работе [12] показано, что фотолюминесценция роговицы глаза, возбуждаемая поляризованным излучением, является частично поляризованной, при этом степень поляризации зависит от механических напряжений. В представленной работе проведены исследования спектров возбуждения и спектров фотолюминесценции роговицы и склеры глаза поляризованным излучением, направленные на выявление возможностей контроля внутриглазного давления оптическими методами.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на глазных яблоках кролика *ex vivo*, в пределах 10 ч после энуклеации. Транспортировку глаз осуществляли в холодильной сумке

при температуре не выше 4°C. В ряде экспериментов эпителий глаза снимали. Эту процедуру выполняли либо механически специально разработанным для этих целей разметчиком, либо с помощью 20%-го раствора этанола. Измерения проводили при комнатной температуре 18-20°C. Глазное яблоко крепили в специальном держателе на эластичной мембране и прикрывали жестким фланцем с круглым отверстием. При этом область роговицы выступала наружу через отверстие. С помощью ручного воздушного компрессора осуществляли наддув до заданного давления, которое и определяло внутриглазное давление. В наших экспериментах оно достигало 50 мм рт.ст.

Для регистрации спектров фотолюминесценции и спектров возбуждения фотолюминесценции глаз использовали спектрофотометр Flurolog-3 (Jobin-Yvon, Франция). Возбуждение фотолюминесценции осуществляли светом ксеноновой разрядной лампы, из которого с помощью монохроматора выделяли узкий участок спектра. Измерения спектров фотолюминесценции проводили при постоянном внутриглазном давлении. На рис. 1 представлена фотография держателя с глазом кролика в измерительном отсеке спектрофотометра.

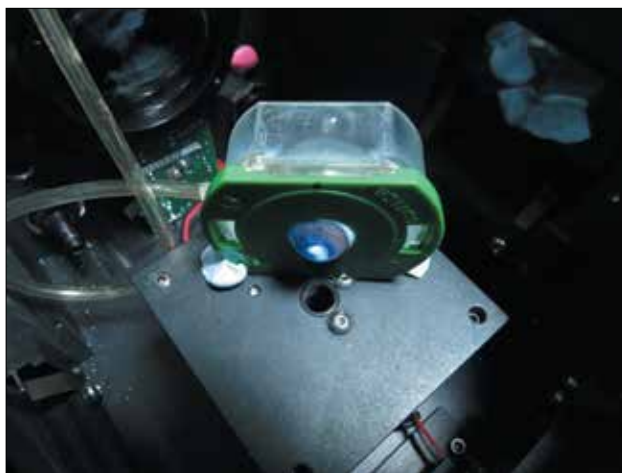


Рис. 1. Держатель с глазом кролика в измерительном отсеке спектрофотометра

Fig. 1. A holder with a rabbit eye in the measurement compartment of a spectrofluorometer

На пути возбуждающего света от монохроматора до образца и на пути люминесцентного света от образца к приемнику устанавливали поляризационные фильтры, с параллельной или ортогональной взаимной ориентацией оптических осей. Таким образом получали ко- и кросс-поляризационные спектры фотолюминесценции. В качестве поляризационных фильтров в канале возбуждения использовали призму Глана-Тейлора. Дискриминация света в диапазоне длин волн 450-700 нм при взаимно ортогональной конфигурации поляризаторов была не хуже 10^2 .

Результаты

Спектр фотовозбуждения

На рис. 2 приведен спектр возбуждения фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при регистрации излучения на длине волны 455 нм. Он имеет колоколообразную форму с максимумом сигнала в области 330-360 нм. Важно с точки зрения дистанционной диагностики, что интенсивность фотолюминесценции при длинах волн возбуждающего света более 380 нм (видимый диапазон) остается достаточно высокой для измерений обычными фотоприемниками.

Спектры фотолюминесценции

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

Для клинического применения необходимо также учитывать возможные фотохимические повреждения клеток и биотканей, вероятность которых существенно возрастает при возбуждении фотолюминесценции светом УФ области спектра. Поэтому спектры фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении в УФ области представляют в основном академический интерес. С точки зрения практических приложений наибольший интерес привлекают исследования возможности возбуждения фотолюминесценции роговицы глаза фиолетовым и синим светом видимой области спектра, причем желательно сдвигаться дальше в длинноволновую область спектра. Наши исследования показали, что при возбуждении роговицы глаза даже слабым голубым светом ксеноновой лампы с длиной волны 450 нм ее фотолюминесценция может быть отчетливо измерена. При этом, как видно из рис. 4а, спектр ее фотолюминесценции простирается примерно до 700 нм. На рис. 4б представлен спектр фотолю-

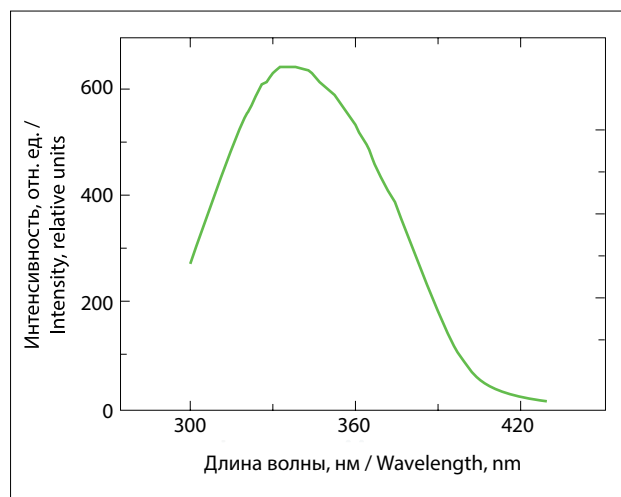


Рис. 2. Спектр возбуждения фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при регистрации на длине волны 455 нм
Fig. 2. Excitation spectrum of a rabbit eye cornea photoluminescence *in vitro*, registered at 455-nm wavelength

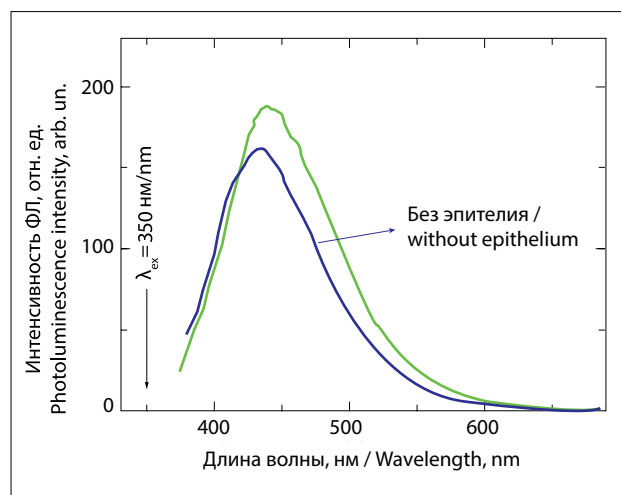


Рис. 3. Спектры фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при возбуждении на длине волны 350 нм с эпителием (зеленая кривая) и без эпителия (синяя кривая)
Fig. 3. Photoluminescence spectra of a rabbit eye cornea *in vitro* with epithelium (green curve) and without epithelium (blue curve) excited at 350 nm wavelength

минесценции роговицы глаза при возбуждении на длине волны 250 нм. Все представленные спектры фотолюминесценции отстроены от возбуждающего света в сторону больших длин волн на 20-50 нм. Это связано с фильтрацией возбуждающего излучения, чтобы исключить его влияние на результаты спектральных измерений.

Поляризационные измерения

Поляризационные спектры фотолюминесценции роговицы глаза *in vitro* измеряли при возбуждении линейно поляризованным светом с длиной волны 450 нм. Для этого на пути света от образца к приемнику спектрометра устанавливали поляризационный

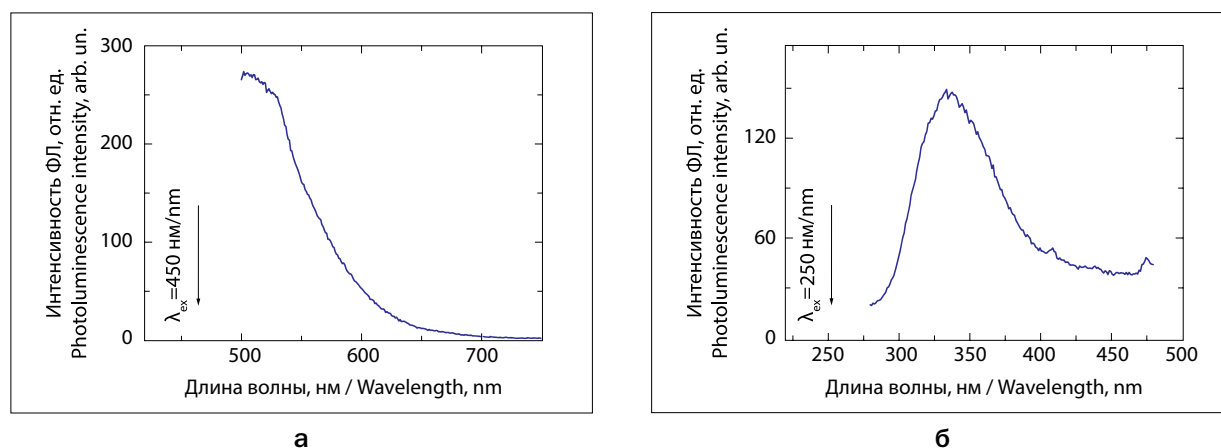


Рис. 4. Спектры фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении на длинах волн:
а – 450 нм;
б – 250 нм

Fig. 4. Photoluminescence spectra of cornea excited at wavelengths:
а – 450 nm;
б – 250 nm

фильтр, оптическая ось которого была направлена перпендикулярно или параллельно вектору поляризации возбуждающего света. Полученные ко- и кросс-поляризационные спектры позволили построить спектры доли линейно поляризованного света в фотолюминесценции от длины волны как разность ко- и кросс поляризационных сигналов деленная на их сумму. Результаты измерений и соответствующих вычислений представлены на рис. 5. Из этого рисунка видно, что интенсивность фотолюминесценции роговицы глаза зависит от взаимной ориентации оптических осей поляризатора и анализатора. При изменении длины волны фотолюминесценции от 500 до 700 нм степень поляризации изменяется от ~0,2 до ~0,35. Уровень ошибок при измерении степени поляризации также спектрально зависим. Ошибки

измерений значительно растут с увеличением длины волны, что, очевидно, связано с ослаблением сигнала люминесценции.

Обсуждение

Максимум спектра фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении на длине волны 450 нм находится вблизи 540 нм, что соответствует спектрам флуоресценции флуорофоров, локализованных в эпителии и эндотелии, среди которых основными являются флавопротеины, такие как флавин, аденин динуклеотид, и др. Отличия спектров фотолюминесценции роговицы глаза с эпителием и без эпителия, представленные на рис. 3, скорее всего, связаны с вкладом фотолюминесценции рибофлавина, с двумя характерными максимумами поглощения на длинах волн 450 и 365 нм [13].

Спектр фотолюминесценции глаза, полученный при возбуждении на длине волны 250 нм, может быть приписан триптофану, который содержится во внутриглазной линзе [13].

Спектр фотолюминесценции, полученный при возбуждении на длине волны 350 нм, имеет максимум вблизи 440-455 нм. Он может быть представлен в виде комбинации фотолюминесценции пиридиннуклеотидов с максимумом вблизи 460-470 нм и фотолюминесценции гликозилированного коллагена с максимумом вблизи 430-440 нм [13].

Заключение

В представленной работе исследованы кросс- и ко-поляризованные спектры фотолюминесценции фиброзных тканей глазного яблока, возбуждаемые линейно поляризованным светом. Получены новые

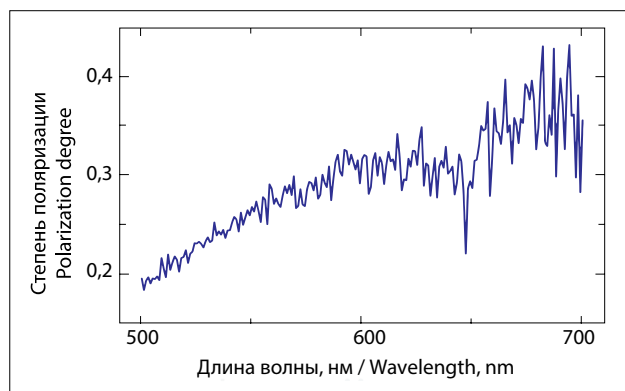


Рис. 5. Спектр степени поляризации люминесценции глаза кролика *in vitro*, полученный при возбуждении на длине волны 450 нм линейно поляризованным светом

Fig. 5. Polarization degree spectra of rabbit eye cornea photoluminescence *in vitro*, excited by linearly polarized light ($\lambda=450$ nm)

данные о спектрах фотолюминесценции и спектрах возбуждения тканей глаза, необходимые для неинвазивной диагностики структурных нарушений тканей глаза и механических напряжений. Показано, что фотолюминесценция тканей глаза при возбуждении линейно поляризованным светом является частично поля-

ризованной. При возбуждении на длине волны 450 нм степень поляризации фотолюминесценции спектрально зависима и изменяется в пределах 20-30%.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (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. – № 4. – С. 233-237.
2. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Казарян Э.Э., Шмелева-Демир О.А. и др. Результаты клинической оценки нового скринингового метода определения индивидуальной нормы внутриглазного давления // Вестник офтальмологии. – 2010. – Т. 126, № 2. – С. 5-7.
3. Аветисов С.Э., Полунин Г.С., Шеремет Н.Л., Муранов К.О. и др. Поиск шапероноподобных антикатарактальных препаратов - антиагрегантов кристаллинов хрусталика глаза. Сообщение 3. Возможности динамического наблюдения за процессами катарактогенеза на "продолговатой" модели УФ-индуцированной катаракты у крыс // Вестник офтальмологии. – 2008. – Т. 124, № 2. – С. 3-7.
4. Арутюнян Л.Л., Еричев В.П., Филиппова О.М., Акопян А.И. Вязкоэластические свойства роговицы при первичной открытоугольной глаукоме // Глаукома. – 2007. – № 1. – С. 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. – № 4. – С. 78-83.
7. Семчишен А.В., Семчишен В.А. Измерения фотоупругости роговицы глаза. Астигматизм и аномалии внутренних напряжений роговицы // Альманах клинической медицины. – 2008. – Т. 17, № 2. – С. 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, No. 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, No. 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, No. 3. – e58716.
11. Roth S., Freund I. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon // Biopolymers. – 1981. – Vol. 20, No. 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, No. 5. – 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, No. 5. – P. 1391-1402.

REFERENCES

1. Avetisov S.E., Mamikonyan V.R., Zavalishin N.N., Nenyukov A.K. Experimental study of the mechanical characteristics of the cornea and adjoining areas of the sclera, *Oftal'mologicheskii zhurnal*, 1988, No. 4, pp. 233-237. (in Russian)
2. Avetisov S.E., Mamikonyan V.R., Kazaryan E.E., Shmeleva-Demir O.A., Galoyan N.S., Mazurova Yu.V., Tatevosyan A.A., Ryzhkova E.G. Results of clinical evaluation of a new screening method for determining the individual normal level of intraocular pressure, *Vestnik oftal'mologii*, 2010, Vol. 126, No. 2, pp. 5-7. (in Russian)
3. Avetisov S.E., Polunin G.S., Sheremet N.L., Muranov K.O., Makarov I.A., Fedorov A.A., Karpova O.E., Ostrovskii M.A. Search for chaperon-like anticataract agents, the antiaggregants of lens crystallins. Communication 3. Possibilities of a follow-up of cataractogenesis processes on a prolonged rat model of JV-induced cataract, *Vestnik oftal'mologii*, 2008, Vol. 124, No. 2, pp. 3-7. (in Russian)
4. Arutyunyan L.L., Eriчев V.P., Filippova O.M., Akopyan A.I. Viscoelastic properties of the cornea in primary open-angle glaucoma, *Glaukoma*, 2007, No. 1, pp. 62-65. (in Russian)
5. Vladimirov Yu.A. *Fotokhimiya i lyuminestsentsiya belkov* [Photochemistry and luminescence of proteins]. Moscow, Nauka Publ., 1965. 232 p.
6. Eremina M.V., Eriчев V.P., Yakubova L.V. The effect of central corneal thickness on intraocular pressure level in normal population and patients with glaucoma, *Glaukoma*, 2006, No. 4, pp. 78-83. (in Russian)
7. Semchishen A.V., Semchishen V.A. Eye cornea photoelasticity measurement. Astigmatism and internal mechanical stress distribution, *Al'manakh klinicheskoi meditsiny*, 2008, Vol. 17, No. 2, pp. 128-132. (in Russian)
8. Avetisov S.E., Bubnova I.A., Novikov I.A., Antonov A.A., Siplivyi V.I. Experimental study on the mechanical strain of corneal collagen, *Journal of biomechanics*, 2013, Vol. 46, No. 10, pp. 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, No. 3, pp. 3353-3366.
10. Nagase S., Yamanari M., Tanaka R., Yasui T., Miura M., Iwasaki T., Goto H., Yasuno Y. Anisotropic alteration of scleral birefringence to uniaxial mechanical strain, *PloS one*, 2013, Vol. 8, No. 3, e58716.
11. Roth S., Freund I. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon, *Biopolymers*, 1981, Vol. 20, No. 6, pp. 1271-1290.
12. Tan H.Y., Teng S.W., Lo W., Lin W.C., Lin S.J., Jee S.H., Dong C.Y. 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, No. 5, 054019.
13. Yamanari M., Nagase S., Fukuda S., Ishii K., Tanaka R., Yasui T., Oshika T., Miura M., Yasuno Y. 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, No. 5, pp. 1391-1402.