



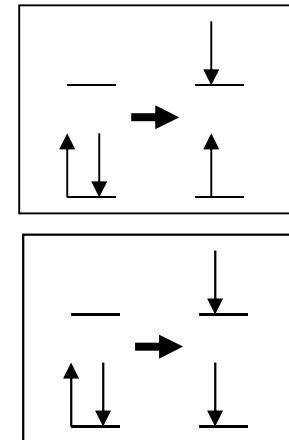
Φασματοσκοπία Φθορισμού Fluorescence Spectroscopy

Αρχές Φθορισμού



- **Φωταύγεια (Luminescence)**

- Εκπομπή φωτονίων από διεγερμένες ηλεκτρονικές καταστάσεις (excited states)
- Δύο είδη φωταύγειας:
 - Αποδιέγερση από μονήρη (singlet) διεγερμένη κατάσταση
 - Αποδιέγερση από τριπλή (triplet) διεγερμένη κατάσταση
- Μονήρεις και Τριπλές Καταστάσεις
 - Θεμελιώδης κατάσταση (Ground state) – δύο ηλεκτρόνια ανά τροχιακό (orbital) με αντίθετο σπιν σε ζεύγος
 - Μονήρης διεγερμένη κατάσταση
 - Το ηλεκτρόνιο στη ψηλότερη ενεργειακή κατάσταση έχει την αντίθετη κατεύθυνση σπιν από το ηλεκτρόνιο στο κατώτερο τροχιακό
 - Τριπλή διεγερμένη κατάσταση
 - Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί αυτόματα να αντιστρέψει το σπιν του. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται διασυστηματική διέλευση (intersystem crossing.) Τα ηλεκτρόνια και στα δύο τροχιακά έχουν τώρα την ίδια κατεύθυνση σπιν.



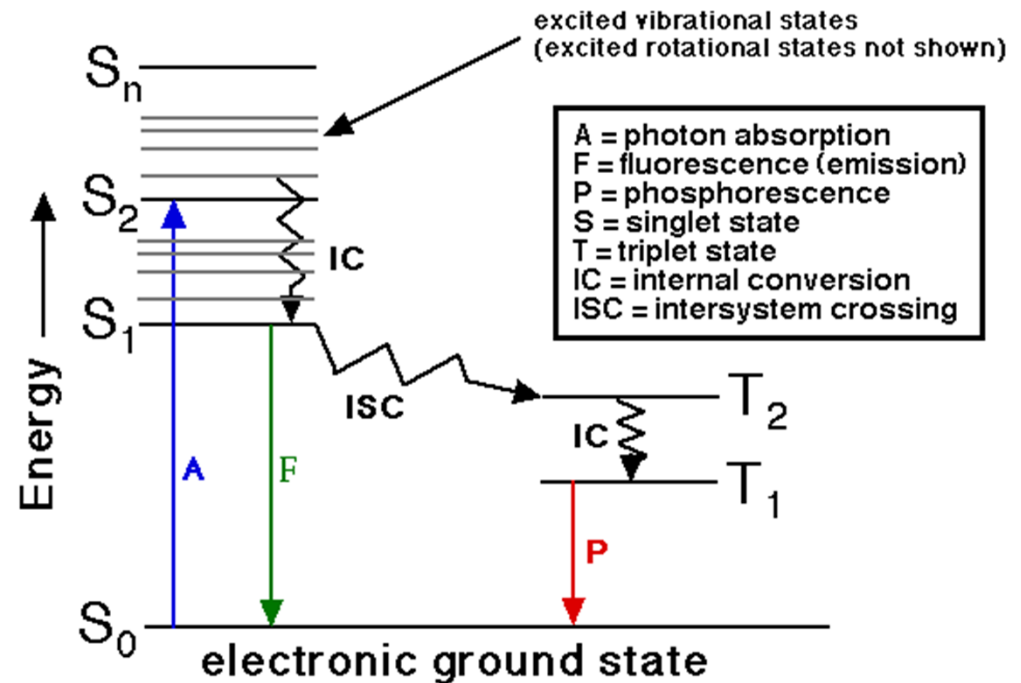
Αρχές Φθορισμού



- Τύποι εκπομπής

- Φθορισμός
 - Επιστροφή από μονήρη διεγερμένη κατάσταση στη βασική κατάσταση (ground state) → δεν απαιτεί αλλαγή στον προσανατολισμό του σπιν (πιο συχνή από αποδιέγερση (relaxation))
- Φωσφορισμός
 - Επιστροφή από τριπλή διεγερμένη κατάσταση στη βασική κατάσταση (ground state) → απαιτεί αλλαγή στον προσανατολισμό του σπιν
- Ο ρυθμός εκπομπής του φθορισμού είναι αρκετές τάξεις μεγέθους πιο γρήγορος από ότι του φωσφορισμού

- Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων (Διάγραμμα Jablonski)



Αρχές Φθορισμού

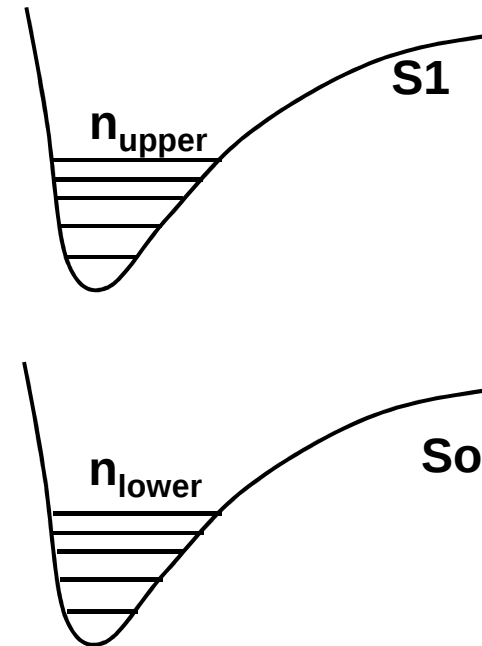


- Πληθυσμός των ενεργειακών καταστάσεων
 - Η αναλογία των μορίων σε άνω και κάτω ενεργειακό επίπεδο

$$\frac{n_{upper}}{n_{lower}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)$$

$k=1.38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ (σταθερά Boltzmann)

ΔE = Ενεργειακή διαφορά μεταξύ επιπέδων



Αρχές Φθορισμού



- **Διέγερση**

- Φως απορροφάται
- Για αραιό δείγμα, ισχύει ο νόμος Beer-Lambert
 - Το μέγεθος του ϵ αντανakλά την πιθανότητα απορρόφησης
 - Η εξάρτηση του ϵ ως προς το μήκος κύματος αντιστοιχεί στο φάσμα απορρόφησης

$$A = \epsilon(\lambda)CL$$

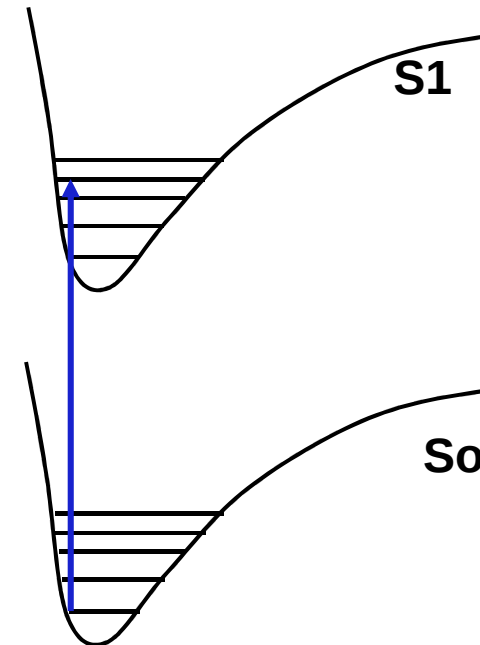
ϵ = συντελεστή μοριακής απορρόφησης (molar absorption coefficient) - ($M^{-1} cm^{-1}$)

C = συγκέντρωση (concentration) (M)

L = μήκος διαδρομής (pathlength) (cm)

- **Αρχή Franck-Condon**

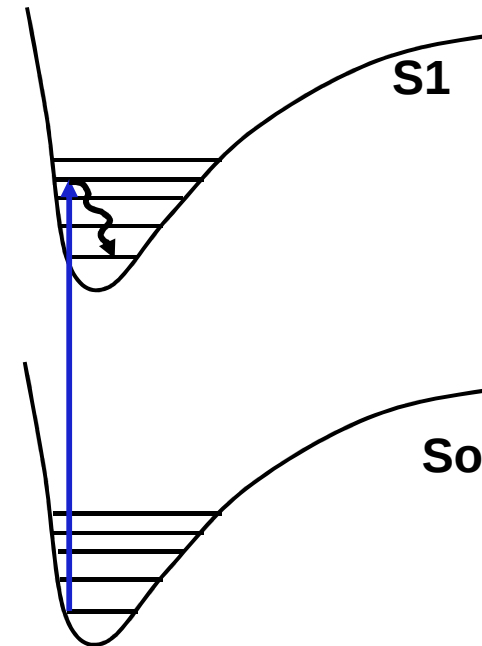
- Η διεργασία απορρόφησης λαμβάνει χώρα σε μια χρονική κλίμακα (10^{-15} s) πολύ ταχύτερα από εκείνη της μοριακής δόνησης



Αρχές Φθορισμού



- Μη εκπέμπουσα μετάβαση (non-radiative relaxation)
 - Το ηλεκτρόνιο προωθείται σε υψηλότερο επίπεδο δόνησης στην κατάσταση S_1 από το επίπεδο δόνησης που ήταν στη βασική κατάσταση S_0
 - Δονητική απενεργοποίηση πραγματοποιείται μέσω διαμοριακών συγκρούσεων
 - Χρονική κλίμακα 10^{-12} s (γρηγορότερα από ότι η διαδικασία του φθορισμού)

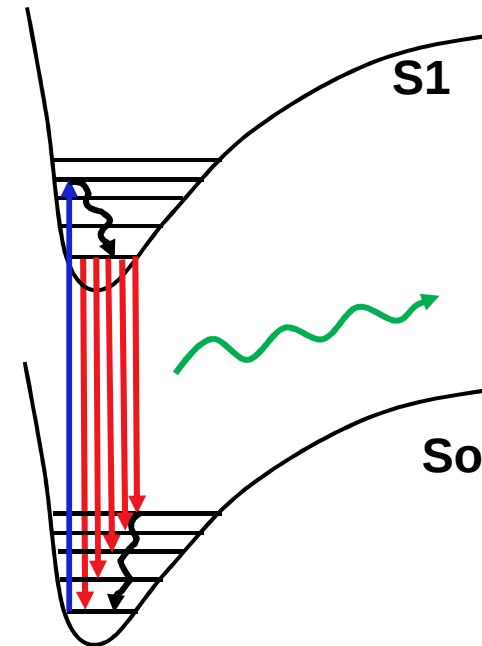


Αρχές Φθορισμού



- **Εκπομπή**

- Το μόριο μεταβαίνει από το χαμηλότερο δονητικό ενεργειακό επίπεδο της διεγερμένης κατάστασης (S_1) σε κάποιο δονητικό ενεργειακό επίπεδο της βασικής κατάστασης (10^{-9} s)
- Η ενέργεια του φωτονίου που εκπέμπεται είναι μικρότερη από εκείνη των προσπιπτόντων φωτονίων
- Φάσμα εκπομπής
 - Για ένα δεδομένο μήκος κύματος διέγερσης, η μετάβαση των εκπομπών κατανέμεται μεταξύ διαφόρων δονητικών ενεργειακών επιπέδων του S_0
 - Για ένα μόνο μήκος κύματος διέγερσης, παρουσιάζεται ένα φάσμα εκπομπής φθορισμού



Αρχές Φθορισμού



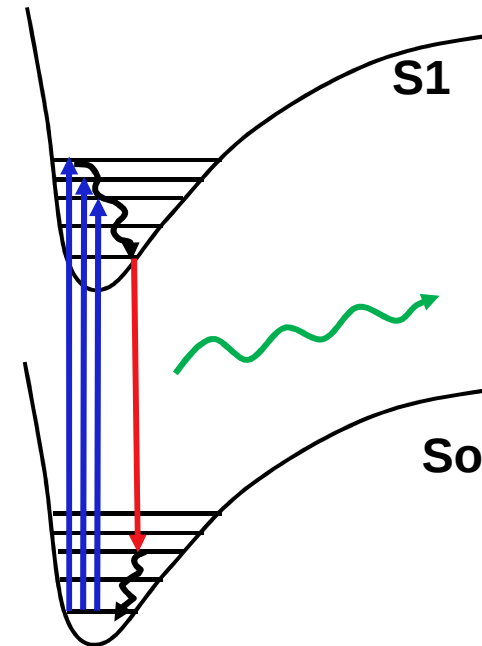
- **Εκπομπή**

- Μετατόπιση Stokes

- Φως φθορισμού με μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με το φως που απορροφάται (φως διέγερσης)
 - Εσωτερική μετατροπή (Internal conversion) επηρεάζει μετατόπιση Stokes
 - Ο διαλύτης και η σχέση των διεγερμένων καταστάσεων μπορεί επίσης να επηρεάσουν το μέγεθος της μετατόπιση Stokes

- Το μήκος κύματος εκπομπής είναι ανεξάρτητο από το μήκος κύματος διέγερσης

- Μετάβαση στο χαμηλότερο δονητικό ενεργειακό επίπεδο της S_1
 - Για ένα μόριο, το ίδιο μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού παρατηρείται, ανεξάρτητα από το μήκος κύματος διέγερσης

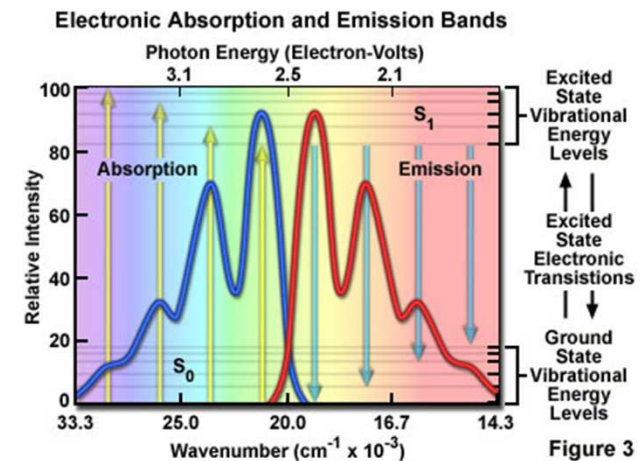
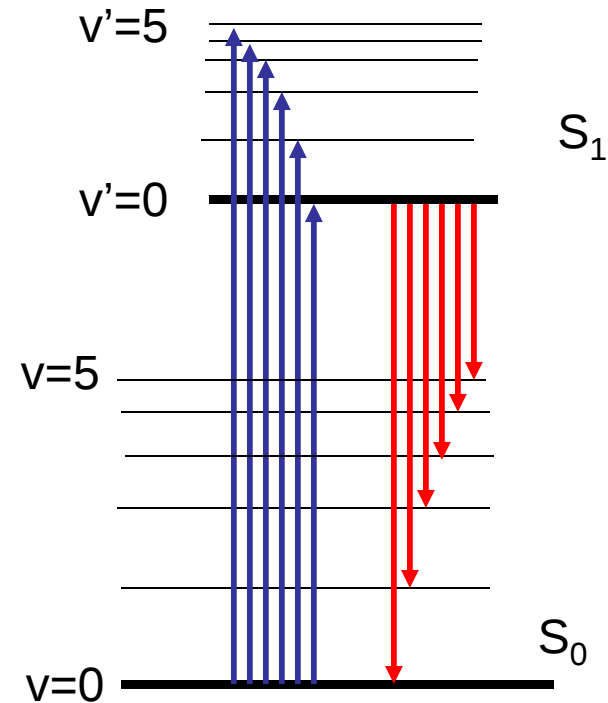


Αρχές Φθορισμού



- **Αρχή των αντιστρόφων (mirror image) φασμάτων**

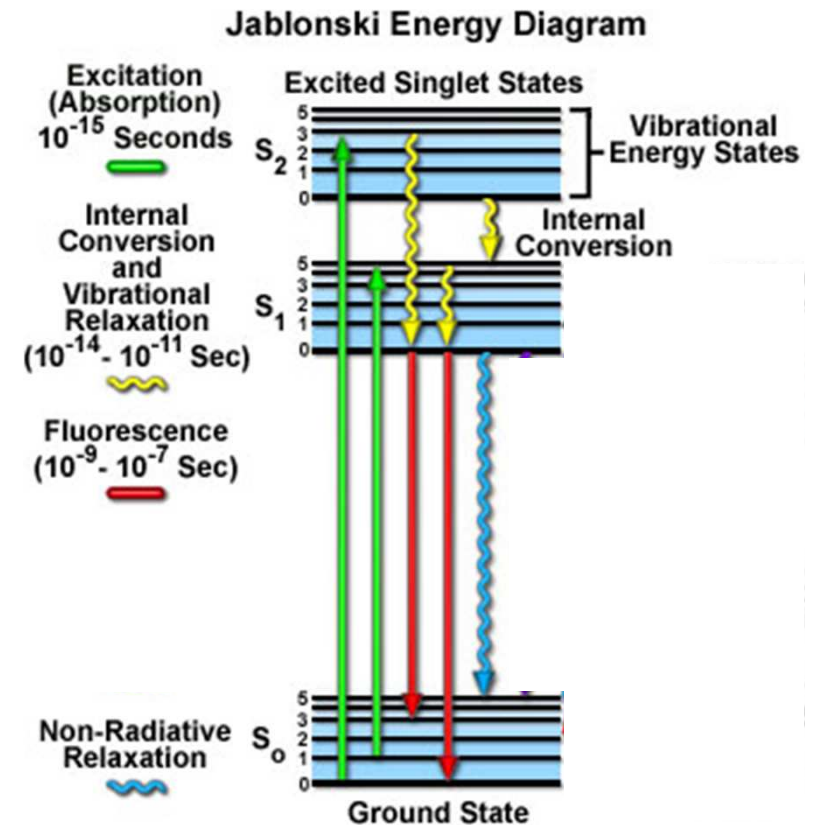
- Τα δονητικά επίπεδα των διεγερμένων και των βασικών καταστάσεων είναι παρόμοια
- Το φάσμα απορρόφησης αντικατοπτρίζει τα δονητικά επίπεδα της διεγερμένης κατάστασης
- Το φάσμα εκπομπής αντανακλά τα δονητικά επίπεδα της βασικής κατάστασης
- Το φάσμα εκπομπής φθορισμού είναι αντίστροφο του φάσματος απορρόφησης



Αρχές Φθορισμού



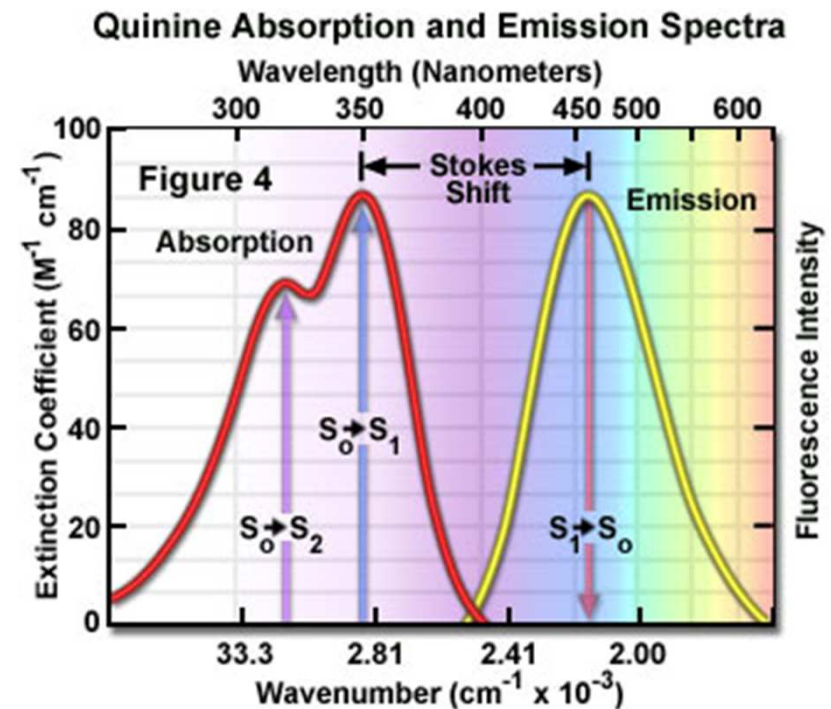
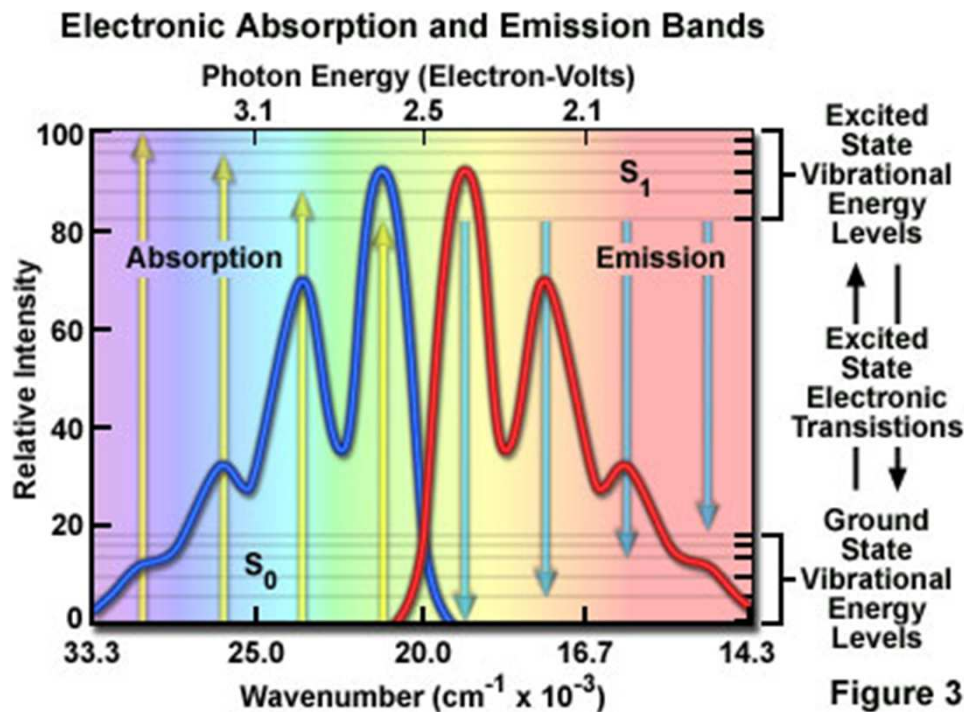
- **Εσωτερική μετατροπή (Internal conversion) ή εκπομπή φθορισμού**
 - Σε ανώτερες ενεργειακές καταστάσεις τα επίπεδα ενέργειας έχουν πιο πυκνή διάταξη
 - Επικάλυψη μεταξύ των ψηλών δονητικών ενεργειακών επιπέδων της S_{n-1} και των χαμηλών ενεργειακών επιπέδων της S_n είναι πιο πιθανή
 - Αυτή η επικάλυψη κάνει τη μετάβαση μεταξύ των επιπέδων πολύ πιθανή
- Εσωτερική μετατροπή: μια μετάβαση μεταξύ καταστάσεων της ίδιας πολλαπλότητας
 - Χρονική κλίμακα 10^{-12} s (γρηγορότερα από ότι η διαδικασία του φθορισμού)
- Σημαντικά μεγάλο ενεργειακό χάσμα μεταξύ S_1 και S_0
 - Χρόνος ζωής (lifetime) της S_1 ζωής είναι μεγαλύτερος $\rightarrow$ η διαδικασία εκπομπής ακτινοβολίας μπορεί να ανταγωνιστεί αποτελεσματικά τις διαδικασίες μη-εκπομπής ακτινοβολίας



Αρχές Φθορισμού



- **Εσωτερική μετατροπή (Internal conversion) ή εκπομπή φθορισμού**
 - Η αρχή της αντιστροφής του φάσματος ισχύει μόνο όταν έχουμε μόνο μετάβαση $S_0 \rightarrow S_1$
 - Παρατηρούνται αποκλίσεις από την αρχή όταν έχουμε μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_2$ ή ακόμα και σε ψηλότερες καταστάσεις

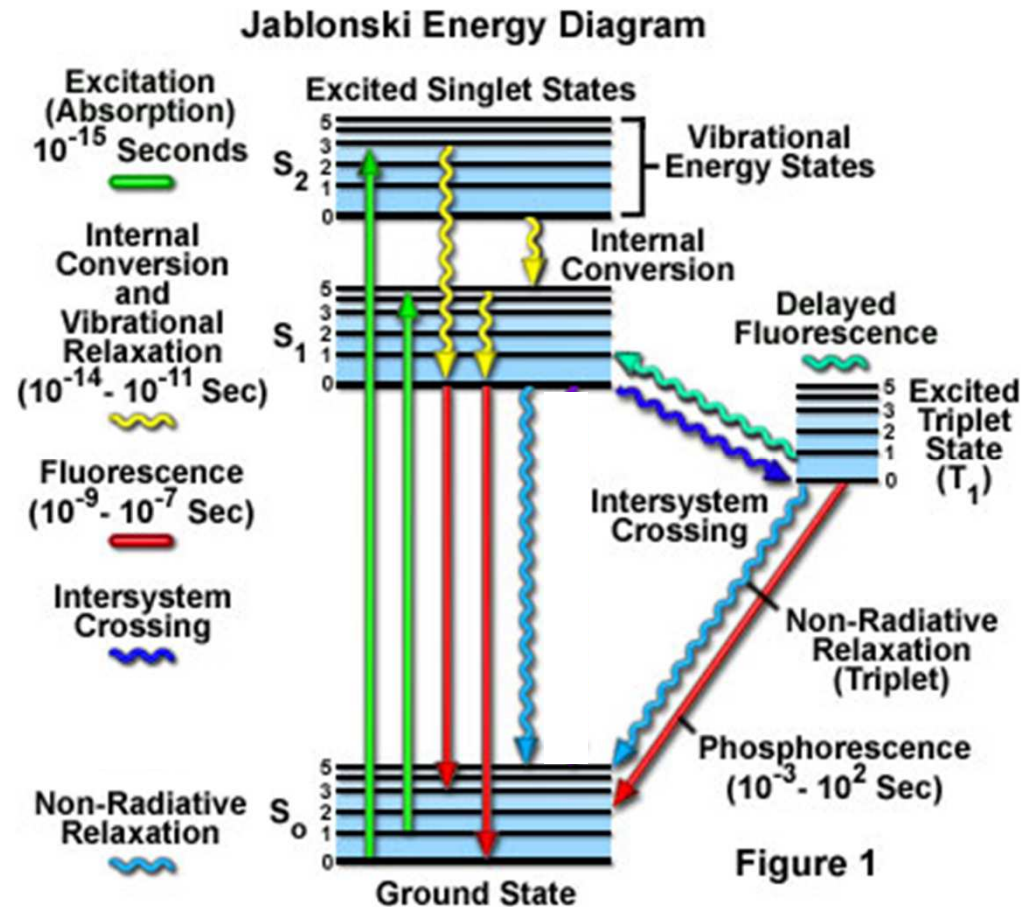


Αρχές Φθορισμού



- **Διασυστηματική διάβαση (Intersystem crossing)**

- Διασυστηματικής διάβαση αναφέρεται σε μη-εκπέμπουσα μετάβαση μεταξύ καταστάσεων διαφορετικής πολλαπλότητας (multiplicity)
- Αυτό συμβαίνει με αντιστροφή του σπιν του διεγερμένου ηλεκτρονίου με αποτέλεσμα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με τον ίδιο προσανατολισμό σπιν → μια τριπλή κατάσταση (triplet state)
- Μεταβάσεις μεταξύ ενεργειακών καταστάσεων διαφορετικής πολλαπλότητας κανονικά δεν γίνονται
- Μηχανισμοί ζεύξης σπιν-τροχιάς και δονητικοί (vibronic) μειώνουν τον «καθαρό» χαρακτήρα των αρχικών και τελικών καταστάσεων, καθιστώντας πιθανή την διάβαση
- Η μετάβαση $T_1 \rightarrow S_0$ είναι επίσης απαγορευμένη
 - Η διάρκεια ζωής της T_1 είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τη διάρκεια ζωής της S_1 (10^{-3} - 10^2 s)



Κβαντική Απόδοση και Διάρκεια Ζωής

- Η κβαντική απόδοση (quantum yield) του φθορισμού, Φ_f , ορίζεται ως:

$$\Phi_f = \frac{\text{number of photons emitted}}{\text{number of photons absorbed}}$$

- Ένας άλλος ορισμός για το Φ_f είναι

$$\Phi_f = \frac{k_r}{\sum k}$$

- Όπου k_r είναι η σταθερά ρυθμού εκπομπής και $\sum k$ είναι το άθροισμα των σταθερών ρυθμού για όλες τις διαδικασίες που μειώνουν τον πληθυσμό της κατάστασης S_1 .
- **Αν δεν υπάρχουν άλλες μεταβάσεις, $\Phi_f=1$**
- **Χαρακτηριστικά της κβαντικής απόδοσης**
 - Η κβαντική απόδοση του φθορισμού εξαρτάται από το βιολογικό περιβάλλον
 - Π.χ. το φάσμα διέγερσης της χρωστικής ουσίας φθορισμού Fura 2 και το φάσμα εκπομπής της Indo-1 και η κβαντική απόδοση τους αλλάζουν όταν δημιουργούν δεσμούς με Ca^{2+}

Κβαντική Απόδοση και Διάρκεια Ζωής



- Η διάρκεια ζωής της εκπομπής (radiative lifetime), τ_r , σχετίζεται με τον k_r

$$\tau_r = \frac{1}{k_r}$$

- Η διάρκεια ζωής του παρατηρούμενου φθορισμού (fluorescence lifetime), είναι ο μέσος χρόνος που το μόριο παραμένει στη διεγερμένη κατάσταση:

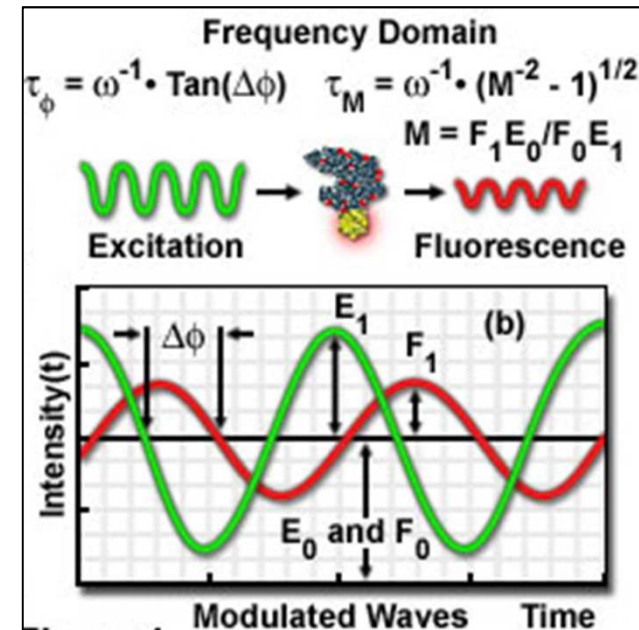
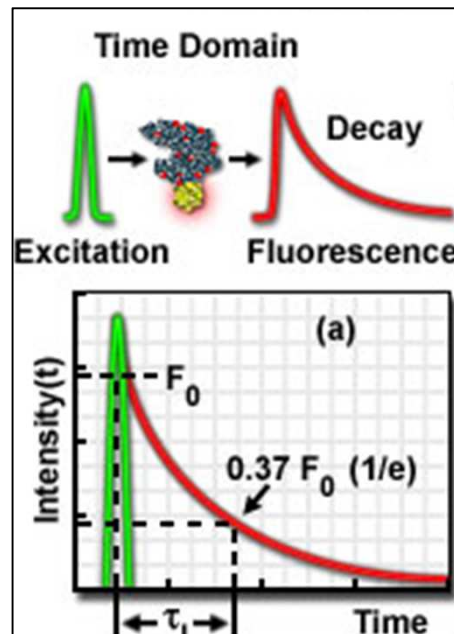
$$\tau_f = \frac{1}{\sum k}$$

- **Χαρακτηριστικά της διάρκειας ζωής (lifetime)**
 - Προσδίδουν ακόμα μια παράμετρο πληροφορίας, που λείπει από φασματικές μετρήσεις που γίνονται χρονο-ολοκληρομένα σε σταθερή κατάσταση
 - Είναι ευαίσθητη στο βιοχημικό μικρο-περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένου και των pH, οξυγόνωσης, και δεσμών
 - Δεν επηρεάζεται από διαφορές στην ένταση διέγερσης, συγκέντρωση, ή οπτικές απώλειες
 - Μπορεί να γίνει και σε ζώντες οργανισμούς (in vivo)

Κβαντική Απόδοση και Διάρκεια Ζωής

- Μέθοδοι διάρκειας ζωής φθορισμού (Fluorescence life-time methods)

- Διέγερση με σύντομο παλμό και ακολούθως μέτρηση του φθορισμού σαν συνάρτηση του χρόνου
- Διαμορφωμένη διέγερση και ακολούθως μέτρηση του φθορισμού σαν συνάρτηση του χρόνου





- **Απορρόφηση από αραιό διάλυμα**
 - Λίγη απορροφητικότητα (absorbance)
 - Από τον νόμο Beer-Lambert
- **Εκπομπή**
 - Ισοτροπική
- **Ένταση Φθορισμού**

$$F(\lambda_x, \lambda_m) = I_A \Phi(\lambda_m) Z = \left[2.303 I_o \varepsilon(\lambda_x) CL \right] \Phi(\lambda_m) Z$$

- όπου,
 - I_o – ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
 - ε – συντελεστή μοριακής απορρόφησης
 - Φ – κβαντική απόδοση
 - C – συγκέντρωση
 - L – μήκος διαδρομής
 - Z – παράγοντας συστήματος (π.χ. γωνία συλλογής)

Ένταση Φθορισμού



- **Φάσμα Εκπομπής (Emission)**

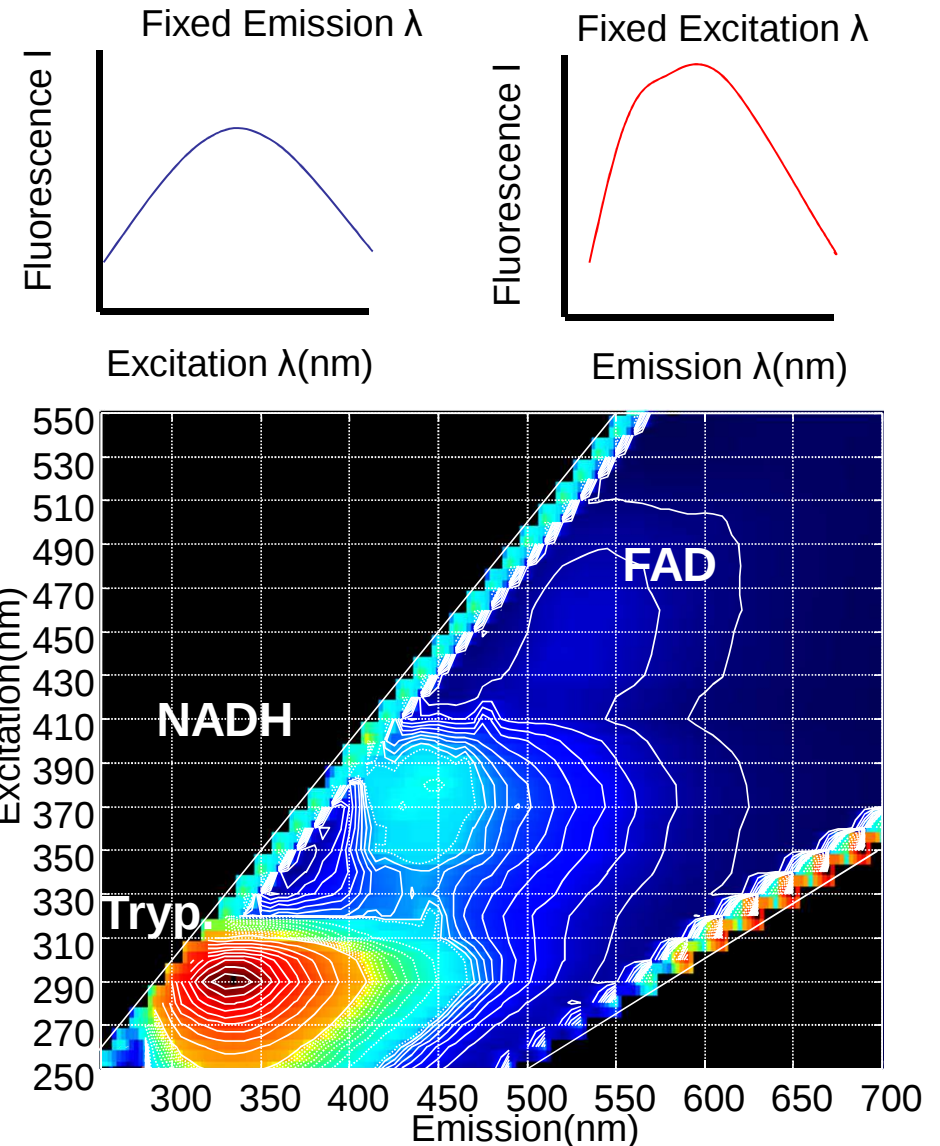
- Για ένα σταθερό μήκος κύματος διέγερσης μετρούμε το φάσμα
- Μας δίνει το φάσμα του φθορισμού
- Αντικατοπτρίζει και την κβαντική απόδοση, $\Phi_k(\lambda_m)$

- **Φάσμα διέγερσης (Excitation)**

- Για διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης μετρούμε την ένταση φθορισμού σε ένα μήκος κύματος εκπομπής
- Μας δίνει το φάσμα απορρόφησης
- Αντικατοπτρίζει τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης, $\epsilon(\lambda_x)$

- **Πίνακας Διέγερσης-Εκπομπής (Excitation-Emission Matrix (EEM))**

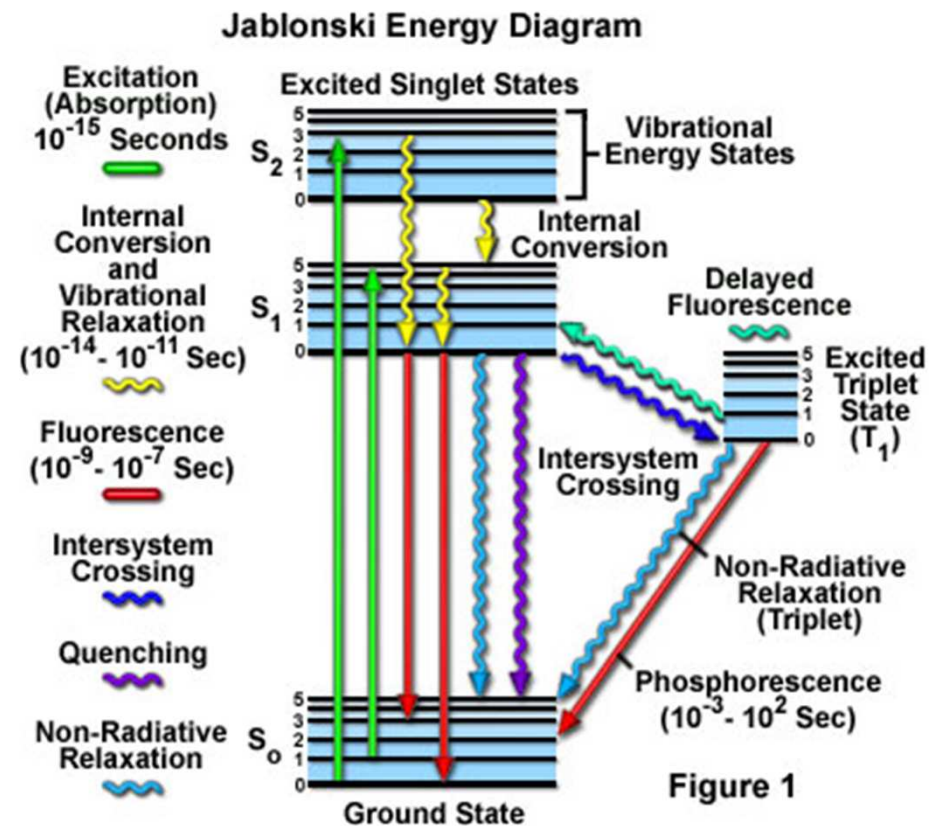
- Συνδυασμός των δύο
- Καλή αναπαράσταση για φθορισμό από πολλαπλά μόρια





• Απόσβεση (Quenching)

- Διεγερμένα μόρια αποδιεγείρονται (relax) μέσω μη-εκπέμπουσων οδών αποφεύγοντας τον φθορισμό (δονήσεις, συγκρούσεις, διασυστηματική διάβαση)
- Το μοριακό οξυγόνο προκαλεί απόσβεση αυξάνοντας την πιθανότητα διασυστηματικής μετάβασης
- Πολικοί διαλύτες (όπως το νερό) γενικά προκαλούν απόσβεση λόγω κατανομής τους γύρω από τα διεγερμένα δίπολα.



Απόσβεση, Φωτολεύκανση & Κορεσμός

- **Φωτολεύκανση (Photobleaching)**

- Ορίζεται ως η μη αναστρέψιμη καταστροφή ενός διεγερμένου φθοροφόρου
- Η φωτολεύκανση δεν είναι ένα μεγάλο πρόβλημα, εφόσον ο χρόνος διέγερσης είναι πολύ μικρός (μερικές εκατοντάδες ms)

- **Κορεσμός Διέγερσης (Excitation Saturation)**

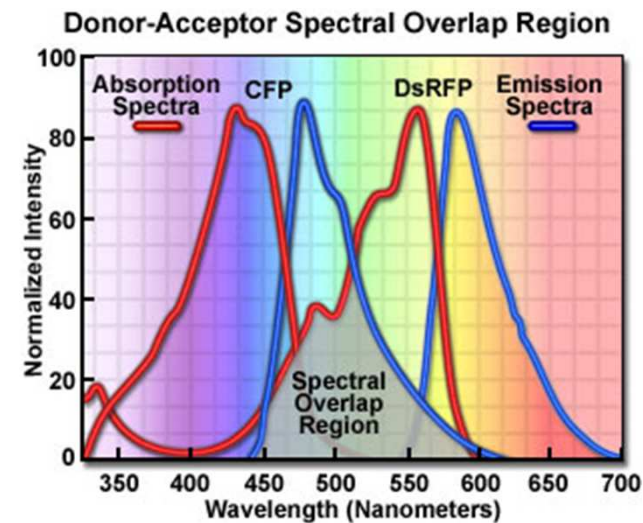
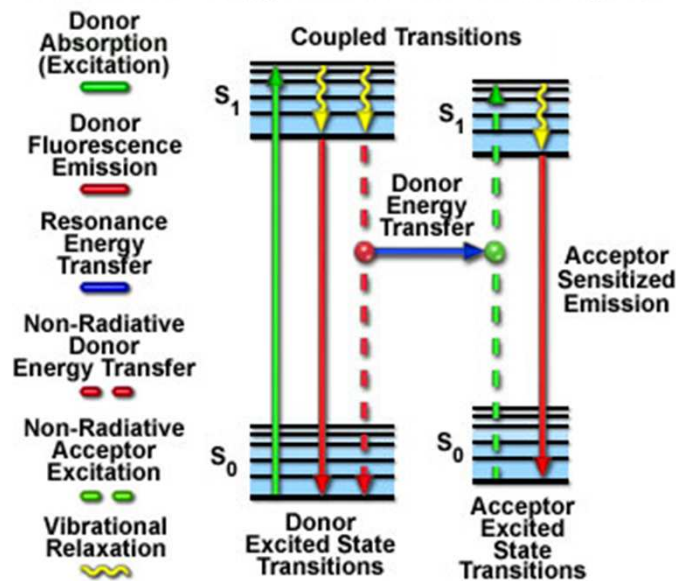
- Ο ρυθμός εκπομπής εξαρτάται από τον χρόνο που το μόριο παραμένει στην κατάσταση διέγερσης (η διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάσταση τ_f)
- Οπτικός κορεσμός παρουσιάζεται όταν ο ρυθμός της διέγερσης υπερβαίνει το αντίστροφο τ_f
- Τα μόρια που παραμένουν στην ακτίνα διέγερσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα έχουν και μεγαλύτερη πιθανότητα διασυστηματικής διάβασης και άρα φωσφορισμού

Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού Φθορισμού (FRET)



- Μη-εκπέμουςα μεταφορά ενέργειας - μια κβαντική μηχανική διαδικασία συντονισμού μεταξύ μεταβατικών δίπολων
 - Αποτελεσματική μεταξύ 10-100 Å μόνο
 - Τα φάσματα εκπομπής (του δότη) και διέγερσης (του δέκτη) πρέπει να συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό
 - Ο δότης μεταφέρει χωρίς εκπομπή στον δέκτη
 - Η FRET είναι πολύ ευαίσθητη στην απόσταση μεταξύ δότη και δέκτης και είναι επομένως, ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη μοριακής δυναμικής

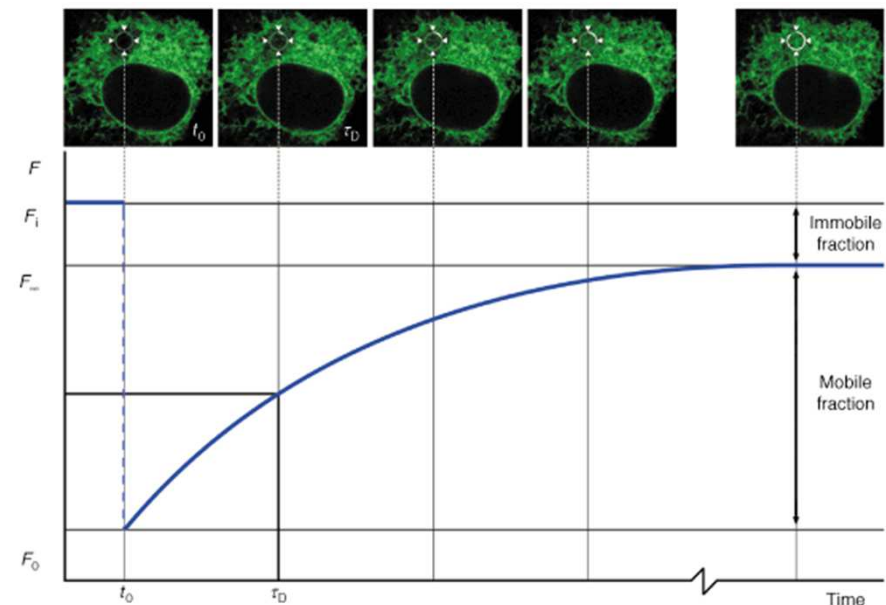
Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram



Ανάκτηση Φθορισμού μετά από Φωτολευκανση (FRAP)



- Χρήσιμη τεχνική για τη μελέτη των ιδιοτήτων μεταφοράς μέσα σε ένα κύτταρο, ειδικά τη διαμεμβρανική διάχυση πρωτεϊνών
 - Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί ο ρυθμός της διάχυσης, και ο λόγος των μορίων που είναι κινητά / ακίνητα
 - Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μεταξύ ενεργού μεταφοράς και διάχυσης
- **Διαδικασία**
 - Σήμανση του μορίου με ένα φθοροφόρο
 - Φωτολευκανση ((καταστροφή) το φθοροφόρου σε μια καλά καθορισμένη περιοχή με ένα λέιζερ υψηλής έντασης
 - Χρήση μιας ασθενέστερης ακτίνας για εξέταση της ανάκτησης του φθορισμού ως συνάρτηση του χρόνου



Nature Cell Biology **3**, E145 - E147 (2001)

Βιολογικές Φθορίζουσες Χρωστικές (Fluorophores)



• Ενδογενή Φθοροφόρα

- Αμινοξέα
- Δομικές πρωτεΐνες
- Ένζυμα και συνένζυμα
- Βιταμίνες
- Λιπίδια
- Πορφυρίνες

• Εξωγενή Φθοροφόρα

- Χρωστικές κυανίνης
- Φωτοευαισθητοποιητές
- Μοριακοί δείκτες - GFP, κλπ.

Endogenous fluorophores	Excitation maxima (nm)	Emission maxima (nm)
Amino acids		
Tryptophan	280	350
Tyrosine	275	300
Phenylalanine	260	280
Structural proteins		
Collagen	325	400, 405
Elastin	290, 325	340, 400
Enzymes and coenzymes		
FAD, flavins	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Vitamins		
Vitamin A	327	510
Vitamin K	335	480
Vitamin D	390	480
Vitamin B ₆ compounds		
Pyridoxine	332, 340	400
Pyridoxamine	335	400
Pyridoxal	330	385
Pyridoxic acid	315	425
Pyridoxal 5'-phosphate	330	400
Vitamin B ₁₂	275	305
Lipids		
Phospholipids	436	540, 560
Lipofuscin	340–395	540, 430–460
Ceroid	340–395	430–460, 540
Porphyrins	400–450	630, 690

FAD, flavin adenine dinucleotide; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; AND(P)H, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

Βιολογικές Φθορίζουσες Χρωστικές (Fluorophores)



TABLE III. Measured fluorescence lifetimes and amplitudes for endogenous biological fluorophores *in vitro* (337.1 nm excitation), with comparison to literature values.

Fluorophore <5×10 ⁻⁶ M in PBS	Measured				Literature				References
	Lifetime (ns)		Area		Lifetime (ns)		Area		
	τ_1	τ_2	A_1	A_2	τ_1	τ_2	A_1	A_2	
Tryptophan	0.54	4.45	0.33	0.66	0.62	3.20	0.22	0.78	58
					0.53	3.10	0.33	0.67	37
					1.47	2.78	0.72	0.28	55
Elastin	1.63	7.36	0.36	0.64	1.7	8.3			57
					1.3	5.8			57
					1.4	6.7	0.58	0.42	55
					1.12	6.57	0.27	0.73	28
FAD	2.63				2.3				33
					2.85				
NADH (free)	0.36				0.3				36
					0.26	0.66			59
					0.24	0.58	0.77	0.23	55
					0.4				33
					0.38	1.38	0.97	0.03	28

Εξοπλισμός Φθορισμού



- Ο φθορισμός είναι μία άκρως ευαίσθητη μέθοδο (μπορεί να μετρήσει συγκέντρωσης αναλύτη από 10^{-8} M)
- Σημαντική η ελαχιστοποίηση των παρεμβολών από:
 - Φθορισμό από διαλύτες
 - Διαρροές φωτός στον εξοπλισμό
 - Παράσιτη ακτινοβολία (stray light) στον εξοπλισμό ή από ουσίες με ψηλό δείκτη σκέδασης
- Τα όργανα δεν αποδίδουν ιδανικό φάσμα:
 - Μη ομοιόμορφη φασματική απόδοση της φωτεινής πηγής
 - Η απόκριση του ανιχνευτή και των οπτικών στοιχείων έχουν διαφορετική απόκριση ως προς το μήκος κύματος

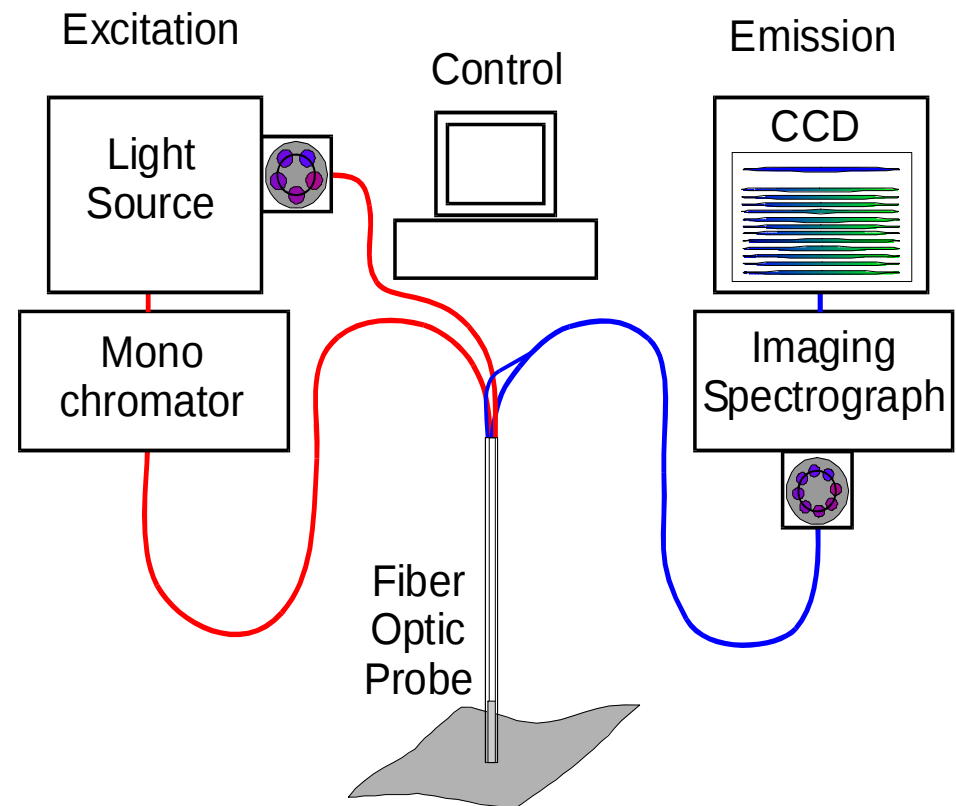


Εξοπλισμός Φθορισμού



- **Κυριότερα μέρη εξοπλισμού φασματοσκοπίας φθορισμού**

- Πηγή φωτός
 - Ευρύ φάσμα (Xe lamp)
 - Μονοχρωματική (LED, laser)
- Μεταφορά του φωτός στο δείγμα
 - Φακοί/Κάτοπτρα
 - Οπτικές Ίνες
- Διαχωρισμός μηκών κύματος (πιθανών και για τη διέγερση και για την εκπομπή)
 - Φίλτρα (Filters)
 - Μονοχρωμάτορας (Monochromator)
 - Φασματογράφο (Spectrograph)
- Ανιχνευτής
 - Φωτοπολλαπλασιαστής (PMT)
 - Κάμερα CCD





• Αποτελέσματα Διαγνωστικής Εξέτασης

	Has disease	Does not have disease	
Tests positive	(A) True positive	(B) False positive	(A+B) Total # who test positive
Tests negative	(C) False negative	(D) True negative	(C+D) Total # who test negative
	(A+C) Total # who have disease	(B+D) Total # who do not have disease	

Ευαισθησία (Sensitivity)= $A/(A+C)$

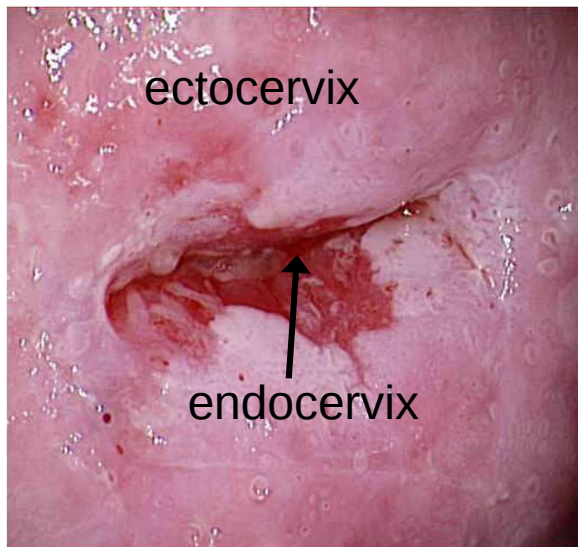
Ειδικότητα (Specificity) = $D/(B+D)$

Positive predictive value= $A/(A+B)$

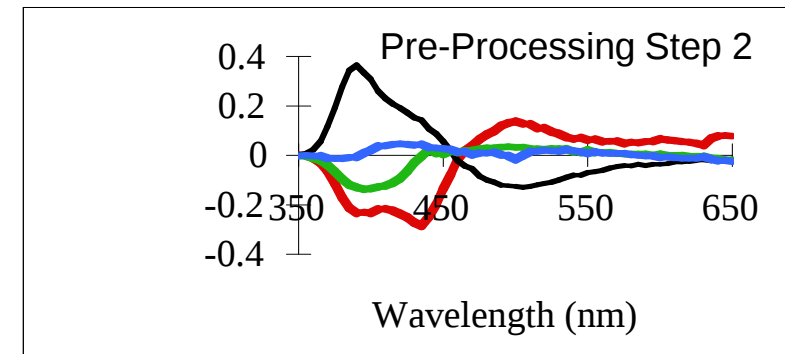
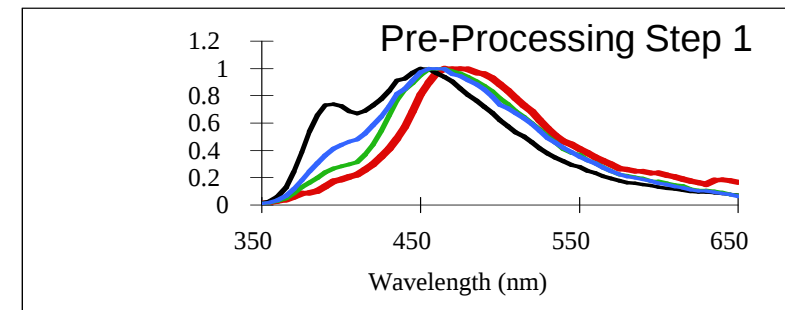
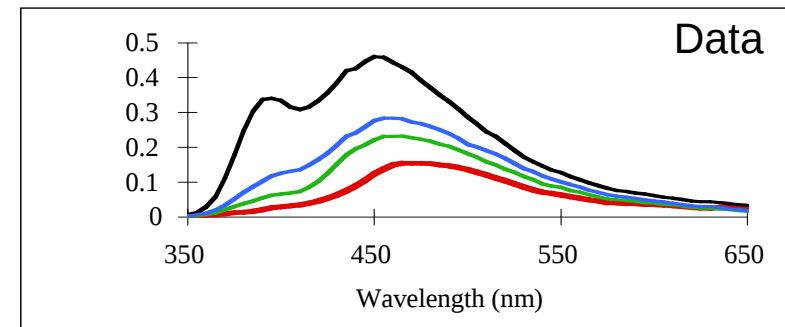
Negative predictive value= $D/(C+D)$



- Διάγνωση προ-καρκινικών βλαβών στον τράχηλο της μήτρας



— Normal squamous
— Low-grade
— High-grade
— Normal columnar





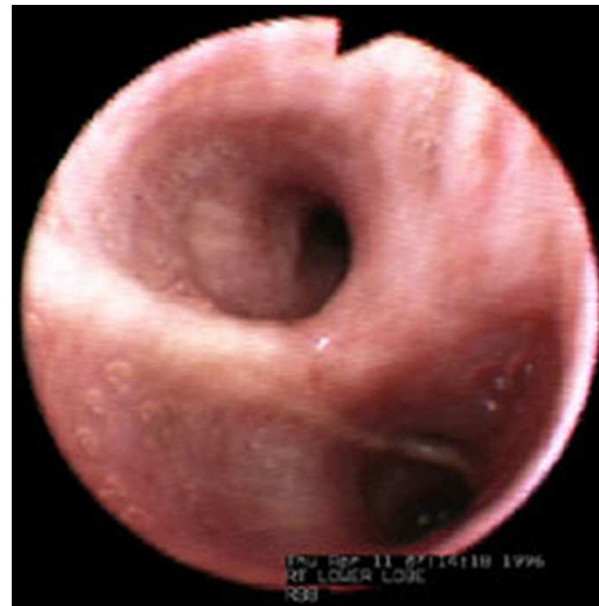
- Διάγνωση προ-καρκινικών βλαβών στον τράχηλο της μήτρας

Classification	SILs vs. NON SILs		HG SIL vs. Non HG SIL	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
Pap Smear Screening	62% $\pm$ 23	68% $\pm$ 21	N/A	N/A
Colposcopy in Expert Hands	94% $\pm$ 6	48% $\pm$ 23	79% $\pm$ 23	76% $\pm$ 13
Full Parameter Composite Algorithm	82% $\pm$ 1.4	68% $\pm$ 0.0	79% $\pm$ 2	78% $\pm$ 6
Reduced-Parameter Composite Algorithm	84% $\pm$ 1.5	65% $\pm$ 2	78% $\pm$ 0.7	74% $\pm$ 2

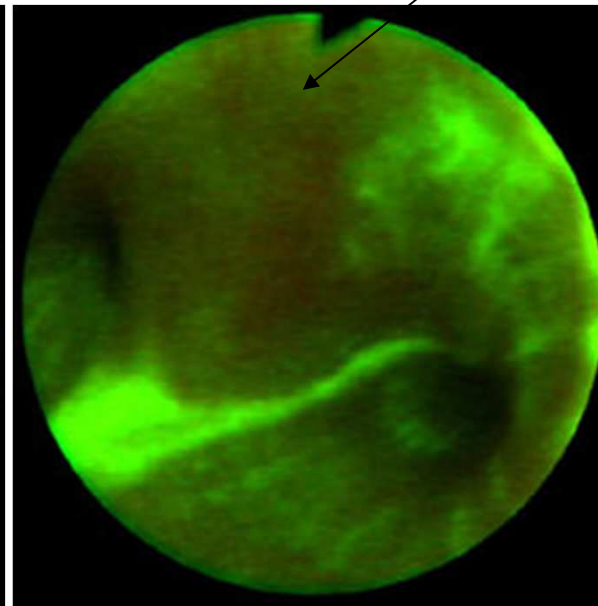
SIL = Squamous Intraepithelial Lesion (Πλακώδης ενδοεπιθηλιακή βλάβη)
HG = High Grade (Ψηλού βαθμού)



- Επιτόπια (in situ) ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα με το σύστημα απεικόνισης LIFE



White light bronchoscopy



Autofluorescence ratio image

Carcinoma in situ



- **Επιτόπια (in situ) ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα με το σύστημα απεικόνισης LIFE**
 - Ο αυτοφθορισμός βελτιώνει την ικανότητα να εντοπιστούν μικρές προ-καρκινικές αλλοιώσεις

	Severe dysplasia/Worse		Intraepithelial Neoplasia	
	WLB	WLB+LIFE	WLB	WLB+LIFE
Sensitivity	0.25	0.67	0.09	0.56
Positive predictive value	0.39	0.33	0.14	0.23
Negative predictive value	0.83	0.89	0.84	0.89
False positive rate	0.10	0.34	0.10	0.34
Relative sensitivity	2.71		6.3	



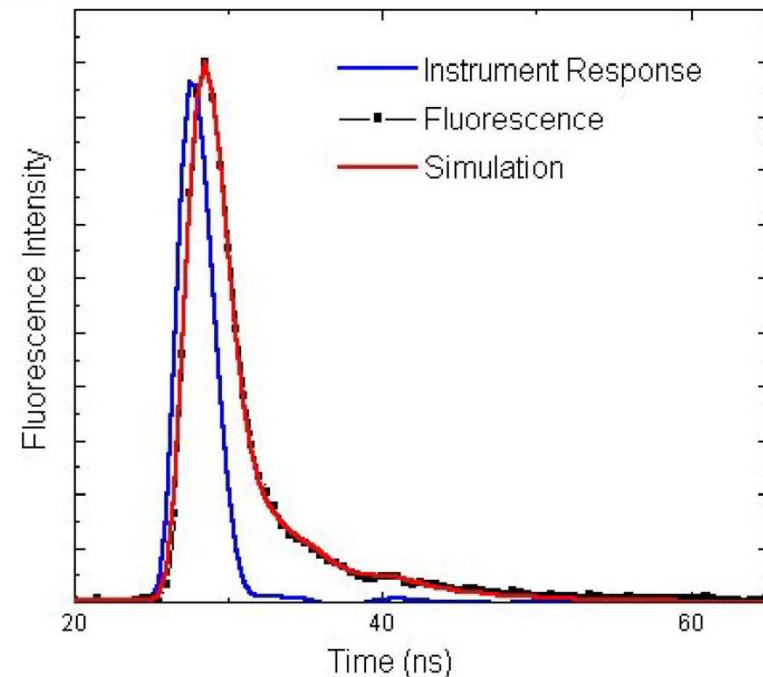
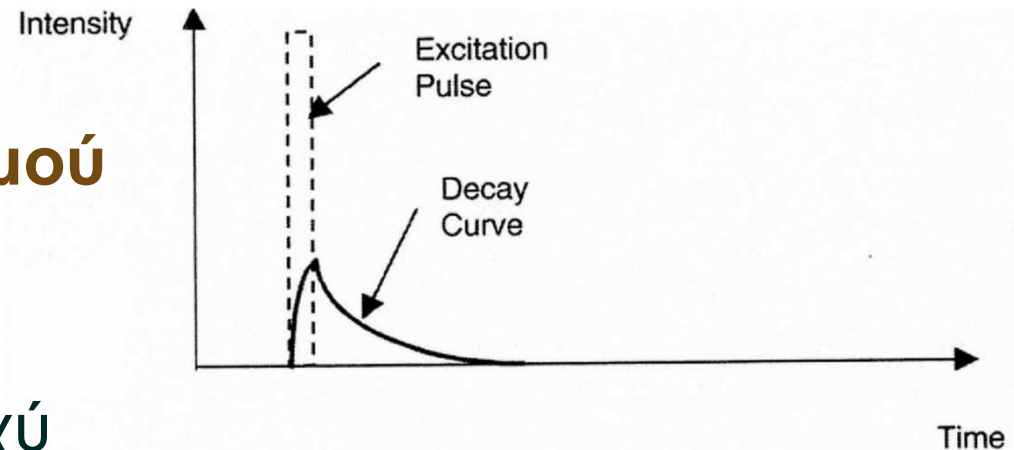
- **Μετρήσεις διάρκειας ζωής (lifetime) φθορισμού**

- Μετρήσεις διάρκειας ζωής αυτοφθορισμού από ζων (in vivo) παχύ έντερο (colon)

- **Ανάλυση**

- Μοντέλο με διπλή εκθετική μείωση (decay)

$$F(t) = \alpha_1 \exp(-t/\tau_1) + \alpha_2 \exp(-t/\tau_2)$$



- $$\tau_1 = 6.03 \text{ ns} \quad \tau_2 = 0.72 \text{ ns}$$
- $$\text{Area1} = 0.42 \quad \text{Area2} = 0.58$$

