

РАМАНОВСКАЯ МИКРОСПЕКТРОСКОПИЯ И КАРС МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Методом КАРС получены цифровые изображения распределения липидов в клетке. В качестве образца использовались человеческие раковые Mia-PaCa pancreatic клетки. На примере A-CAPS изображения TE мозговых клеток проиллюстрирована возможность применения Рамановских меток для повышения селективности изображения.

Прогресс клеточной биологии и медицины связан с методами и оборудованием, позволяющими проводить бесконтактный структурный анализ биологических образцов и процессов в них с высоким разрешением и в реальном времени. Оптическая лазерная микроскопия обладает неоспоримыми преимуществами и успешно дополняет физико-химические, радиационные, электронно-лучевые методы анализа. Конфокальная флуоресцентная лазерная микроскопия в сочетании с достижениями в нанофотонике и синтезе флуоресцентных меток, селективно взаимодействующих с компонентами клетки, позволяют изучать состав и структурные превращения клетки. Для не флуоресцирующих образцов либо биологически не совместимых с внедряемыми флуоресцентными метками в силу их токсичности, либо подверженных сильному фото-выцветанию флуорофоров, в качестве контрастного механизма формирования сигнала могут быть использованы молекулярные колебательные свойства входящих в состав биологических объектов органических соединений.

К числу перспективных направлений оптического анализа биологических объектов на клеточном уровне, основанных на характерных колебательных резонансах, относятся Рамановская микроспектроскопия, микроскопия Спонтанного Рамановского Рассеяния (СПР) и Когерентного Анти-Стоксова Рамановского Рассеяния (КАРС). В отличие от СПР с присущими ему ограничениями вследствие слабости сигнала и большой величины авто-флуоресцентного фона, КАРС отклик среды нелинейно зависит от мощности возбуждающего сигнала, и, как минимум, на пять порядков превышает сигнал СПР.

Широкие применения оптических методов активного и спонтанного Рамановского рассеяния связаны с перспекти-

вами в изучении меж- и внутриклеточных взаимодействий, селективных процессов на уровне мембраны, цитоплазмы, липидов, ядер и присущих им РНК и ДНК взаимодействий.

Диагностика и лечение онкологических заболеваний напрямую связаны с методами и оборудованием для бесконтактного структурного клеточного анализа биологических образцов и *in situ* процессов в них. Разработка лекарственных препаратов и методов лечения таких заболеваний базируется на осмыслении происходящих в клетке процессов, изучении внутриклеточных превращений и их особенностей, селективных свойств взаимодействия реагентов на клеточном уровне. При этом эффективность препаратов определяется главным образом управляемостью процессов их селективного взаимодействия с внутриклеточной структурой.

Когда на среду с отличной от нуля нелинейной восприимчивостью третьего порядка $\chi^{(3)}$ падают две согласованные по времени и пространству световые волны: $E(v_p)$, большей частоты v_p – волна "накачки" и $E(v_s)$, меньшей частоты v_s – "Стоксова" волна, они взаимодействуют, вызывая биения электромагнитного поля на частоте $v_p - v_s$. В случае их резонанса с колебательным состоянием определенной химической связи среды $v_p - v_s = v_{vib}$ происходит вынужденное рассеяние второ-

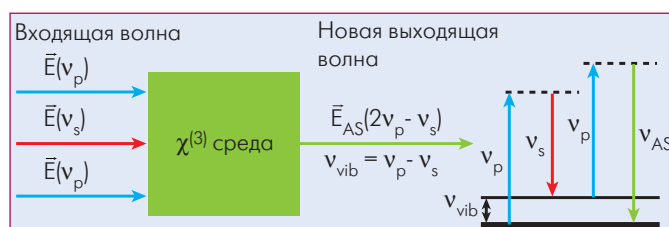


Рис. 1 Диаграмма процесса КАРС. v_p – частота света волны накачки $E(v_p)$, v_s – частота света Стоксовой компоненты Рамановского рассеяния $E(v_s)$, колебательного резонанса v_{vib} , v_{as} – частота света анти-Стоксовой компоненты $E(v_{as})$, на колебательном резонансе v_{vib} .

*СП СОЛАР ТИИ, Минск (Беларусь)

**Институт Лазеров, Фотоники и Биофотоники, Университет Баффало, Университет Штата Нью Йорк (США)

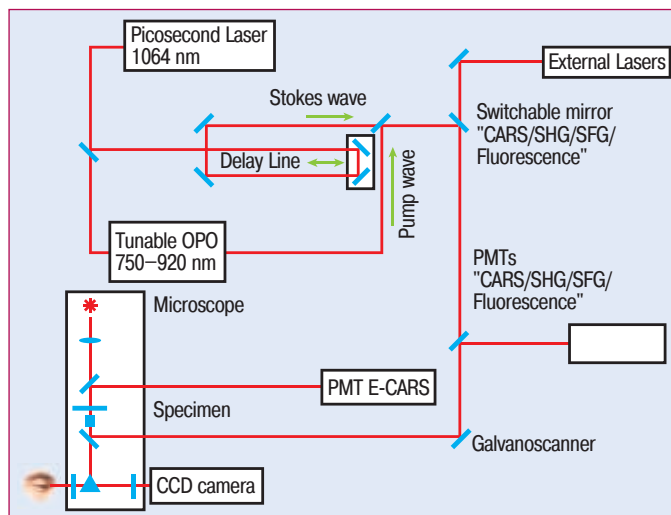


Рис.2 Схема микроскопа для построения сигнала КАРС

го фотона волны накачки $E(v_p)$ на сфазированном колебательном состоянии v_{vib} с генерацией новой волны $E_{as}(2v_p - v_s)$.

Сигнал КАРС пропорционален квадрату интенсивности волны накачки, прямо пропорционален интенсивности Стоксовой волны, квадрату вкладов в тензор $\chi^{(3)}$, который включает сумму откликов всех молекул, присутствующих в зоне взаимодействия в фокальной перетяжке лазерного излучения. КАРС сигнал пропорционален соответственно квадрату концентрации молекул, вносящих вклад в $\chi^{(3)}$. Это позволяет при определенных условиях с учетом селективности и неинвазивности метода использовать КАРС для количественных измерений концентрации химической субстанции в образце.

ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ КАРС МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.

Упрощенная схема микроскопа, в котором используется сигнал КАРС, приведена на рис.2.

Для оценки пространственного разрешения микроскопа использовался образец водно-дисперсионного раствора по-

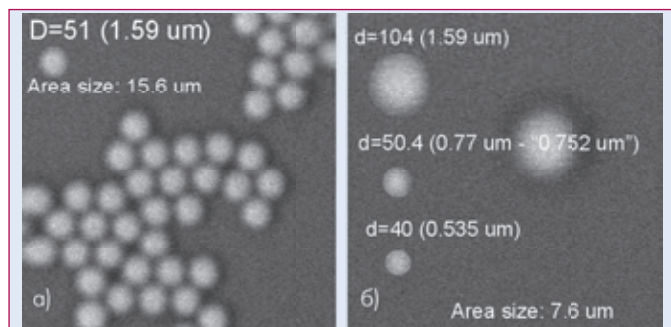


Рис.3 Калибровка пространственного разрешения КАРС микроскопа. F-КАРС изображения полистирольных микросфер (1590 нм калиброванным диаметром – а) и 1590 нм, 750 нм и 530 нм диаметрами – б) на частоте 1670 см^{-1} C=C колебательного резонанса (двойная связь). Размер зоны сканирования $15,6 \times 15,6\text{ мкм}$ – а) и $7,6 \times 7,6\text{ мкм}$ – б)

листириновых микросфер, помещенный в стандартный микроскоп-слайд (стеклянная подложка толщиной 1 мм – двухсторонняя, самоклеющаяся пластиковая прокладка толщиной 100 мкм и покровное стекло толщиной 170 мкм). Образец представлял собой слабоцентрированную смесь полистирольных микросфер с калиброванным диаметром $1587 \pm 25\text{ нм}$, $760 \pm 10\text{ нм}$ и $535 \pm 10\text{ нм}$.

Как видно (рис.3б), шарики в 760 мкм и 535 мкм четко различимы (разброс значений диаметров приведен на рис.). Оценочная величина пространственного разрешения F-КАРС изображения составляет порядка 200 нм, что хорошо согласуется с представлением о нелинейной природе формирования изображения и о возможности его превышения относительно оптического разрешения, определяемого критерием Релея.

Ниже приведены примеры спектров биологических образцов, полученных на Рамановском микроспектрометре. В структуру линий биологических субстанций вносят вклад различные химические образования и химические связи. Адекватная интерпретация Рамановских спектров на основе анализа химического состава и соответствующих колебательных состояний молекул, образующих биологические объекты, весьма важна для понимания структуры клетки и процессов в ней.

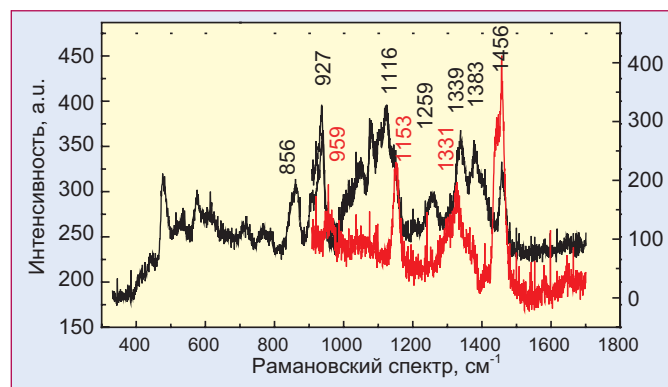


Рис.4 Рамановский спектр экстракта RNA, приготовленный из популяции TE мозговых клеток. Замороженный (-80°C) образец – черная кривая, и свежеприготовленный (37°C) образец – красная кривая

В табл.приведены примеры колебательных резонансов, основообразующих химических связей, составляющих химическую основу различных биоконпонент клетки. Из разнообразия структурного состава конкретного биологического образования можно выбрать характерные частоты колебательных состояний, концентрация химических связей которых доминирует в конкретном био-образовании и представляет его характеристическую частоту.

На рис.4 показан Рамановский спектр RNA, выделенных по специальному протоколу из TE мозговых клеток животных. Аналогичный спектр DNA, экстрагированный из HeLa-типа клеток, показан на рис.5.

Таблица . Примеры колебательных резонансов

Химическая основа	Характерная область частот колебательного состояния и соответствующий Рамановский сдвиг (см ⁻¹)	Type of chemical stretch (Тип химической связи)
C-C	1000–1350	skeletal vibration C-C (Основное колебание C-C)
C=C	1600–1680	olefinic C=C (Двойная C=C)
C=C-C	1450–1510, 1580–1615	aromatic ring (Ароматическое кольцо)
C-H	950–1225, 3070–3130	aromatic C-H (Ароматическое C-H)
C-H	2815–2850	aliphatic C-H (Алифатическое C-H)
C-F	1000–1150	aliphatic C-F (Алифатическое C-F)
C-Cl	700–800	aliphatic C-Cl (Алифатическое C-Cl)
C-Br	600–700	aliphatic C-Br (Алифатическое C-Br)
C-I	500–600	aliphatic C-I (Алифатическое C-I)
O-H	3200–3570	H-bonded O-H (H-связанная O-H)
O-H	590–720, 1310–1410, 1260–1350	different O-H bonds (Различные O-H)
C-O	1150, 1100, 1150, 1200	different C-O (Различные C-O)
N-H	1590–1650, 3325–3400	different amine NH (Различные амины NH)
C-N	1130–1190, 1150–1210, 1250–1340, 1280–1350, 1310–1360	different amine CN (Различные амины CT)

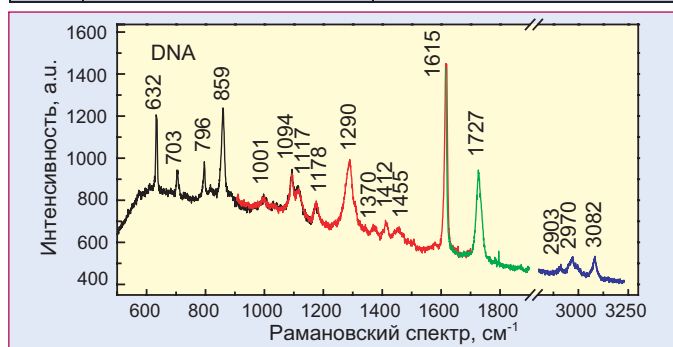
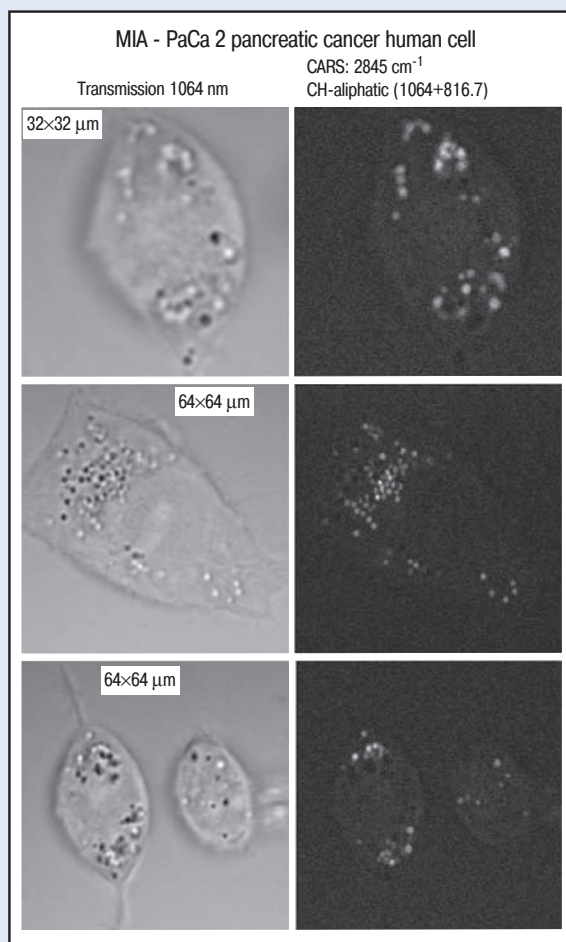


Рис.5 Рамановский спектр экстракта DNA, приготовленный по специальной технологии из популяции HeLa типа клеток

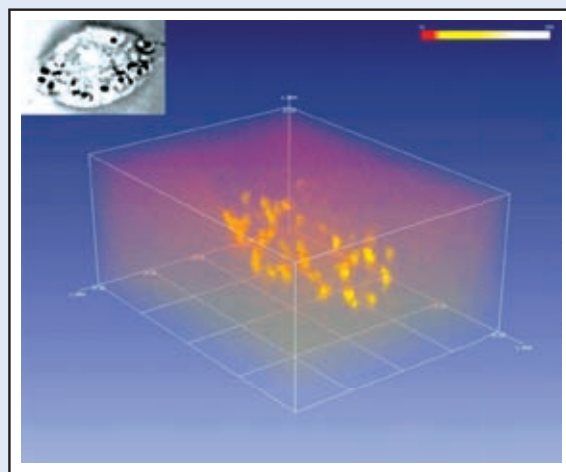


Рис.6 In vitro Рамановский спектр ядрышек (nucleolus) TE – типа мозговых клеток

На рис.6 приведен Рамановский спектр ядрышка (nucleolus), входящего в состав ядра TE-типа клетки. Анализируя характерные колебания и проводя последовательность спектральных измерений во времени, по изменению спектра и интенсивности линий или их смещению можно судить о процессах в таких жизненно важных образованиях клетки, как ядрышки внутри клеточного ядра, которые в значительной степени отражают процессы регенерации RNA и, используя КАРС микроскоп, обосновано выбирая характеристические резонансы из спектров, можно успешно визуализировать селективные изображения.



а)



б)

Рис.7 Селективный имаджинг MIA-PaCa панкреатик человеческой раковой клетки для резонанса 2845 см⁻¹ C-H связи (C-H aliphatic stretch). Селективная визуализация липидов; б) – соответствует 3D изображению клетки

На рис.7 приведены цифровые изображения нескольких MIA-PaCa клеток. Левая колонка соответствует изображениям, полученным в канале проходящего через образец лазерного излучения с длиной волны 1064 нм, а правая – F-KAPC изображениям. Видно, что данный резонанс селективно визуализирует липиды, распределенные по клетке, а контраст других компонентов ее близок к нулю и не проявляется в изображении.

На рис.8 приведены F-KAPC изображения TE-типа мозговых клеток, полученные при настройке системы в резонанс

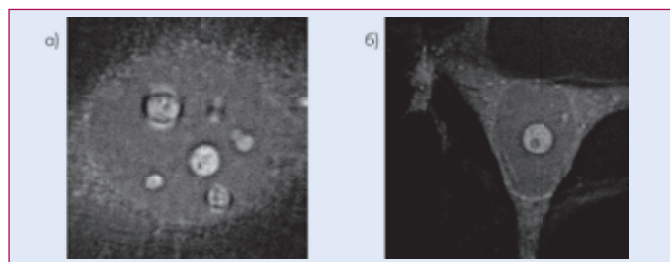


Рис.8 F-КАРС изображения прошедших специальную обработку в модифицированной питательной среде для визуализации и мониторинга поведения RNA TE-мозговых клеток при колебательном резонансе 2311 см^{-1}

2311 см^{-1} . Пример иллюстрирует возможность использования Рамановских меток полностью биологически совместимых с клеточной средой для селективного высококонтрастного имаджинга основополагающих составляющих клетки, таких как ядро и его образующие. Четко видны область ядра, нуклеоплазма и нуклеолы.

Следует также отметить, что наряду с широкими возможностями КАРС микроскопии, она является в значительной степени менее разрушительной и более свободной от стресса химического и лучевого воздействия, чем лазерная флуоресцентная микроскопия с использованием меток различного типа, включая органические красители, наночастицы на их основе, полупроводниковые квантовые точки.

КНИГИ