

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ХИМИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ: КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Г. Фишер, harald.fischer@witec.de,
WITec GmbH, Ульм, Германия

Порой обнаружение химических веществ в живых клетках и тканях является самой важной задачей фармацевтических и медико-биологических исследований. В статье продемонстрирована возможность получения изображения химического состава живых человеческих клеток, бактерий и лекарственных покрытий с помощью неразрушающей конфокальной рамановской микроскопии. Приведено подробное описание этой технологии и рассмотрены возможности ее применения.

ЭФФЕКТ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В МИКРОСКОПИИ

В спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановская спектроскопия) возбуждение колебательных квантовых уровней в молекуле приводит к возникновению сдвига энергетических уровней квантов падающего излучения и излучения обратного рассеяния. Величина энергетического сдвига уникальна для молекул разных веществ, и это позволяет идентифицировать химические компоненты образца. Объединение в одном приборе рамановского спектрометра с современным конфокальным микроскопом (рис.1) дает потрясающие результаты. Возбужденные видимым светом молекулы образца дают спектр обратно-рассеянного излучения. Таким образом, по спектральному "портрету" образца можно однозначно определить локализацию в нем химических соединений. Полученное изображение (отображение химического картирования) обладает разрешением по горизонтали до 200 нм и по вертикали до 500 нм.

Установка WITec alpha300 R, в которой реализована данная технология, позволяет получить полный рамановский спектр в каждой точке отображения обычно за 1–100 мс. Затем спектры, полученные для каждой точки, складываются в полное изображение образца, которое содержит десятки тысяч рамановских спектров. При изучении

образца можно выбирать разные направления исследования его изображения, рассматривая, например, полученные спектры для точек, лежащих на одной линии. При этом генерация изображения происходит путем интегрирования рамановских спектров от всех точек заданной линии. Тогда исследователь получает для анализа

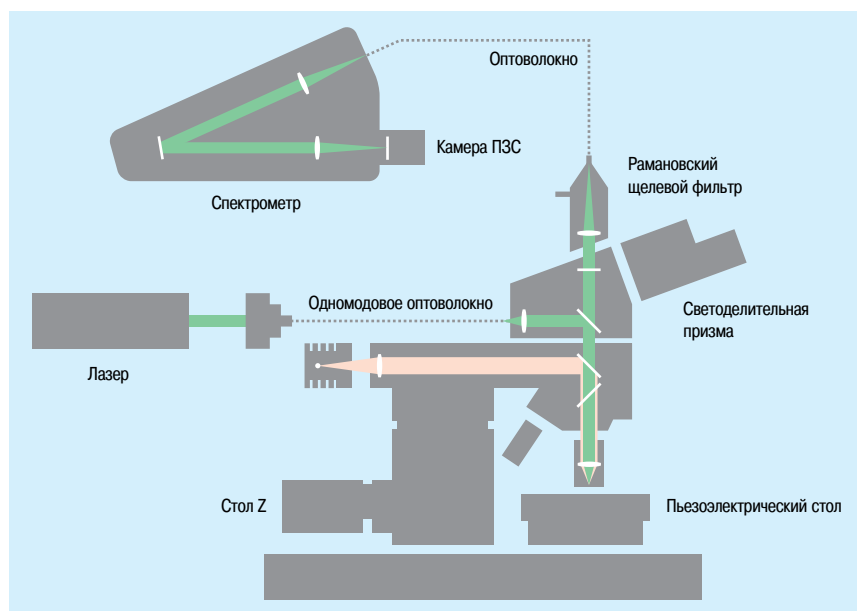


Рис.1. Схема конфокального рамановского микроскопа

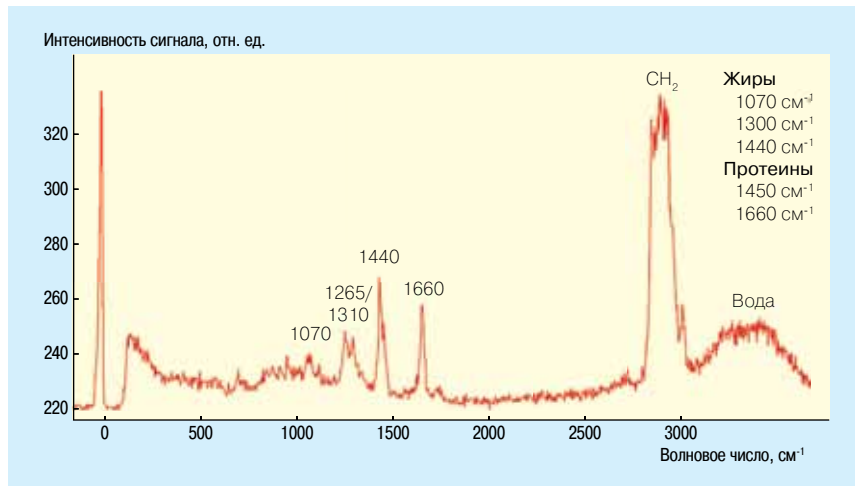


Рис.2. Типичный рамановский спектр клетки с характерными пиками

характеристики спектральных пиков: длину волны, ширину, минимальное и максимальное значение интенсивности. А если мы имеем прозрачный образец, то, используя конфокальный микроскоп, можем анализировать также и внутренний состав объекта и получать объемные изображения.

ИЗОБРАЖЕНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Обычно перед микроскопическим исследованием срезов животной или растительной тканей необходимо определенным образом подготовить образец. Подобные операции: крепление, микротомирование, гистологическое окрашивание образцов – довольно длительны. В таких исследованиях часто применяется флуоресцентная микроскопия, заключающаяся в обработке исследуемого образца специальными красителями и последующем получении

изображения с помощью лазера на красителях. Часто окраска образца ведет к невозможности его дальнейшего использования в экспериментах. Метод конфокальной рамановской микроскопии, во-первых, неразрушающий, во-вторых, в этом методе время, затраченное на подготовку образца, минимально. Поэтому данная технология позволяет эффективно получать химические изображения живых клеток в физиологической среде без их повреждения. В описываемом эксперименте эпителиальные клетки крысы исследовались с помощью конфокального рамановского

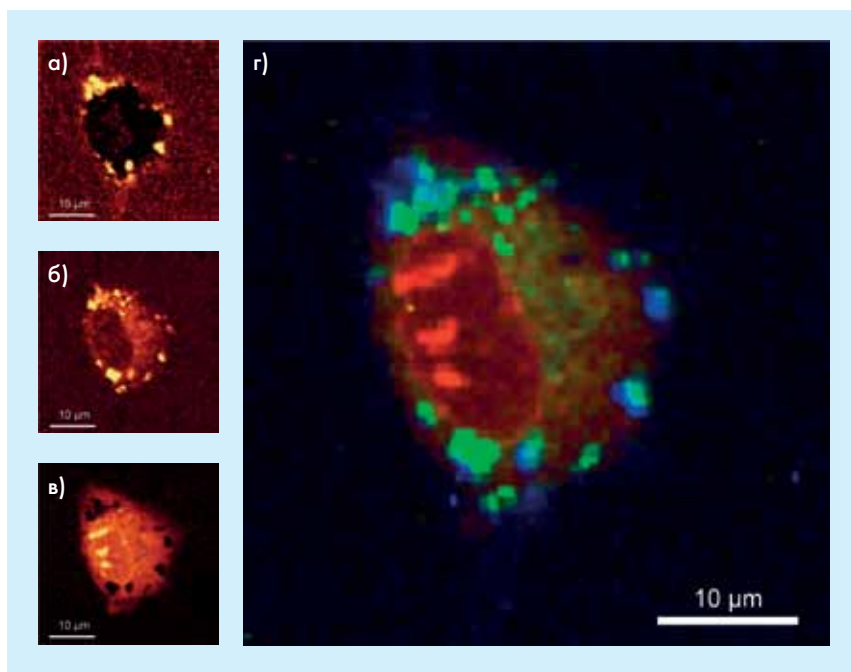


Рис.3. Построение изображения клетки: наложение базисных спектров на измеренные спектры образца: (а) митохондрии, (б) эндоплазматический ретикулум, (в) ядрышки; (г) изображение различных элементов клетки в цветовой кодировке

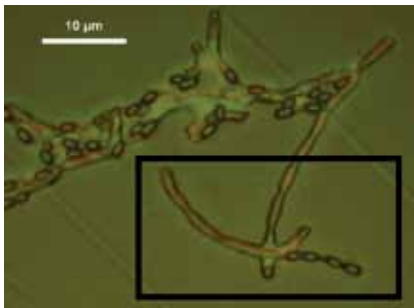


Рис. 4. Видеоизображение бактерии *Bacillus Cereus*

микроскопа WITec alpha300 R с 60-кратным имерсионным объективом (Nikon, NA = 1,0), в котором для возбуждения использовался Nd:YAG-лазер с удвоением частоты (длина волны $\lambda = 532$ нм, мощность $P = 10$ мВт). В ходе эксперимента были получены 10 000 спектров со скоростью 100 мс на один спектр. Размеры исследуемого участка составляли 40×40 мкм.

На рис.2 показан один из 10 000 рамановских спектров, в котором можно идентифицировать жиры и протеины по их характеристическим рамановским пикам. Для получения изображения используют два метода анализа: определение положения обнаруженных пиков по усредненному по линии спектрам; или сравнение полученных спектров с эталонными спектрами

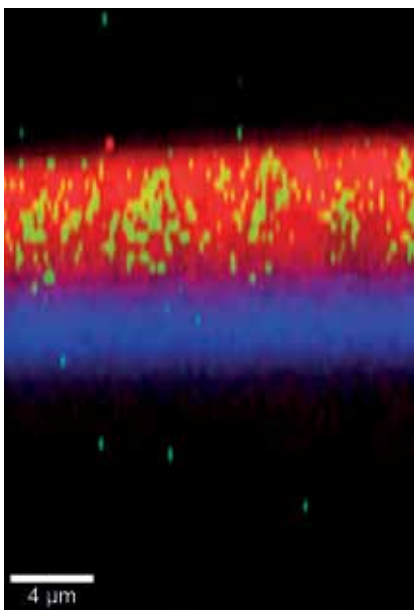


Рис. 6. Фрагмент элюирующего стенового покрытия

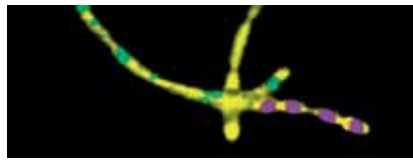


Рис.5. Фрагмент изображения бактерии *Bacillus Cereus*, выделенный на рис.4: вегетативные клетки – желтый цвет; PHB –зеленый; споры – фиолетовый

заданных химических веществ. Эталонный или базисный спектр получают заранее. Для этого снимают спектр чистого химического вещества путем усреднения спектров определенного участка изображения эталонного образца. Данный спектр добавляется в библиотеку спектров с помощью встроенного программного обеспечения (ПО), которое позволяет оптимизировать отношение сигнал-шум.

Рис.3 иллюстрирует метод создания изображения: фото а, б, в – это изображения, полученные путем наложения базисных эталонных спектров на экспериментальные спектры образца: митохондрии (а), эндоплазматический ретикулум (б) и ядрышки (в). Далее эти изображения были программно объединены в одно с помощью цветовой кодировки (рис.3 г). Таким образом, полученное "цветное" изображение различных элементов клетки не требует предварительной окраски образца.

БАКТЕРИИ

Анализируя изображения биологических материалов, можно выявить влияние физиологических свойств, метаболитов, визуализировать распределение лекарства в клетках и тканях. Рассмотрим пример, в котором ясна та критически важная роль, которую играет Рамановский микроскоп высокого разрешения. В описанном ниже эксперименте на уровне одиночной клетки анализировалась бактерия *Bacillus Cereus* с помощью конфокального Рамановского микроскопа alpha300 R. Прибор позволяет анализировать распределение лекарств и продуктов метаболизма внутри одиночной

бактерии и определять внутриклеточные и межклеточные неоднородности.

Бактерия *Bacillus Cereus* может производить поли-бета-гидроксимасляную кислоту (РНВ), накапливая ее во внутриклеточных гранулах. На рис.4 показано видеоизображение области, которая анализировалась с помощью рамановского микроскопа. Увеличенное изображение этой области представлено на рис.5. Бактерия может формировать три различных клеточных компонента, которые видны на изображении, полученном с помощью рамановской микроскопии: вегетативные клетки без РНВ (желтые), вегетативные клетки с РНВ (зеленые) и споры (фиолетовые).

После входа в стационарную фазу роста и накопления РНВ бактерия *Bacillus Cereus* может формировать споры. На рис.5 можно видеть четыре клетки спор в правой части цепочки (фиолетовый цвет). Возможность одновременного наблюдения всех трех элементов подтверждает диагностические возможности конфокальной рамановской микроскопии по определению фенотипических различий на уровне одиночной клетки.

ФАРМАЦЕВТИКА: ЭЛЕМЕНТЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

В фармацевтических исследованиях при разработке новых элементов доставки или элюирования (выделения) лекарств важно знать и распределение лекарственного средства в самой фармацевтической композиции. Лекарственное средство содержится в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции. А сама фармацевтическая композиция имеет разные формы: таблетки, капсулы или порошка, эмульсии или мази, пластыря или пастилки. Фармацевтические препараты – это целые системы, включающие в себя и сам лекарственный препарат, и его покрытие. Именно возможность объемного анализа делает конфокальную рамановскую микроскопию превосходным средством визуализации

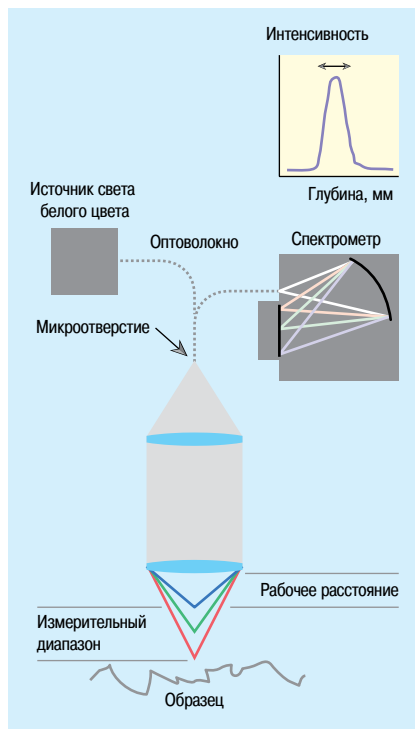


Рис.7. Принцип работы конфокально-хроматического датчика

распределения лекарств в подобных фармацевтических композициях. Технология обладает

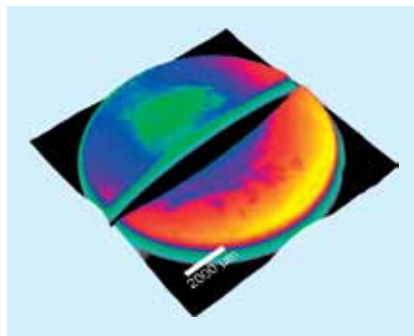


Рис.8. Профиль топологии таблетки аспирина, полученный с помощью оптического профилометра с конфокальным хроматическим датчиком

высокой химической чувствительностью и различает между собой даже аморфные и кристаллические лекарственные компоненты.

На рис.6 показано изображение объемного анализа (оси $x-z$) элюирующего стентового покрытия. Стенты обычно используются для расширения сосудов. Современные стенты имеют сложную конструкцию, поверхность которой должна

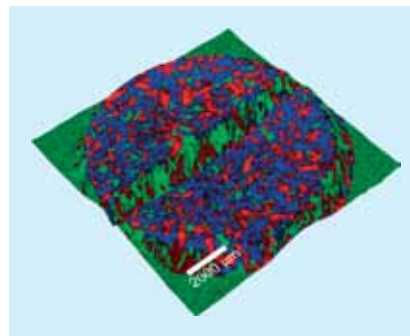


Рис.9. Визуализация распределения составляющих компонентов по топологии поверхности таблетки аспирина

обеспечивать постепенное выделение лекарственного вещества. Такое медленное введение лекарственных средств предотвращает пролиферацию клеток (разрастание) и рестеноз (повторное сужение просвета сосуда после его расширения оперативным путем). При разработке такой конструкции не обойтись без конфокальной рамановской микроскопии. На рис.6 покрытие, выделяющее лекарство, показано красным цветом; само

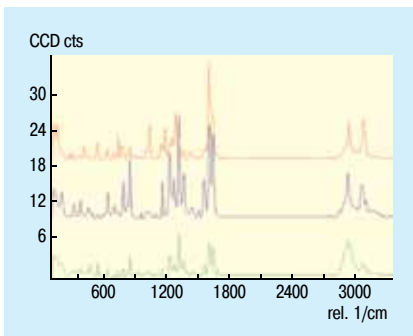


Рис.10. Спектры трех компонентов таблетки аспирина

лекарство – зеленым; полимерная подложка, на которой находится покрытие, – синим цветом.

ФАРМАЦЕВТИКА: ТАБЛЕТКИ

Использование обычной конфокальной микроскопии для анализа больших объемных объектов может оказаться непростой задачей, поскольку изображение в таком микроскопе можно получить только для элементов образца, которые находятся в фокусе. К таким объектам

относятся, например, неровные поверхности лекарственных препаратов, изготовленных в виде целой таблетки. В подобных случаях для анализа можно воспользоваться новой технологией поверхностной микроскопии True Surface Microscopy компании WITec (патентная заявка рассматривается). Эта технология позволяет получать конфокальные рамановские спектры, регулируя фокусное расстояние в соответствии с профилем поверхности. Технология True Surface Microscopy позволяет измерять профиль исследуемой поверхности с большой точностью, в результате чего даже неровная и наклонная поверхность всегда остается в фокусе.

Для реализации этой уникальной функции микроскоп WITec alpha500 можно дополнительно оборудовать специальным прецизионным датчиком для оптической профилометрии. Геометрические координаты поверхности, полученные с помощью измерения профиля,

используются для регулировки фокусного расстояния конфокального рамановского микроскопа. В результате получается изображение химической структуры, наложенное на изображение топологии поверхности образца, включая его шероховатые и наклонные элементы. Для реализации данной функции в системе WITec alpha500 используется специальный конфокальный хроматический датчик (рис.7). Свет из точечного источника белого цвета фокусируется на образце с помощью гиперхроматического объектива. Этот объектив имеет хорошие фокусирующие характеристики и большую линейную хроматическую погрешность. Поэтому каждому цвету соответствует свое фокусное расстояние. Отраженный от образца свет собирается тем же объективом и фокусируется через микроотверстие на спектрометр. Поскольку на поверхности образца может сфокусироваться только световой компонент

одного цвета, только этот свет может пройти через конфокальное микроотверстие. Длина принятой световой волны зависит от расстояния до поверхности образца.

В результате сканирования образца в плоскости X-Y (размеры исследуемой площади образца не должны превышать 50 × 100 мм) строится профиль образца. Этот профиль закладывается в память ПО, в дальнейшем его используют для регулировки фокусного расстояния рамановского микроскопа, чтобы луч лазера всегда был сфокусирован на поверхности образца (или на требуемом расстоянии под поверхностью). В зависимости от типа датчика можно получить горизонтальное разрешение 10–25 мкм и вертикальное разрешение 40–120 нм в измерительном диапазоне 1–3 мм при рабочем расстоянии 10–16 мм (микроскоп комплектуется датчиками для других диапазонов и с иным разрешением по запросу исследователя).

В следующем примере описан анализ фармацевтической таблетки, проведенный с помощью технологии поверхностной микроскопии True Surface Microscopy. На рис.8 показан профиль топологии поверхности таблетки аспирина, полученный с помощью оптического профилометра с конфокальным хроматическим датчиком. Размеры измеряемой поверхности 12 × 12 мм², диапазон отклонений геометрических параметров профиля более 300 мкм. А на рис.9 представлен тот же профиль, но его изображение образовано с помощью наложения на профиль (см. рис.8) картины распределения спектров, полученных методом конфокальной рамановской микроскопии. Лекарственные компоненты отмечены красным и синим цветами, а наполнитель – зеленым. Количество обработанных спектров 300 × 300 = 90000, время интегрирования 66 мс на спектр. Диапазон пространственного отклонения профиля также более 300 мкм. Сами спектры трех компонентов, входящих в таблетку аспирина представлены на рис.10.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье продемонстрирована возможность визуализации химического состава (химическое картирование) живых человеческих клеток, бактерий и лекарственных покрытий с помощью неразрушающей конфокальной рамановской микроскопии. Таким образом, конфокальная рамановская микроскопия является мощным инструментом для анализа неоднородных образцов в субмикронном диапазоне. Технология поверхностной микроскопии True Surface Microscopy позволяет анализировать неровные и наклонные поверхности, сохраняя достоинства конфокальной микроскопии. С помощью данной технологии можно сканировать большие поверхности без предварительной подготовки проб и без юстировки образцов. Это достигается за счет метода построения профиля поверхности с помощью конфокального хроматического датчика. ●