

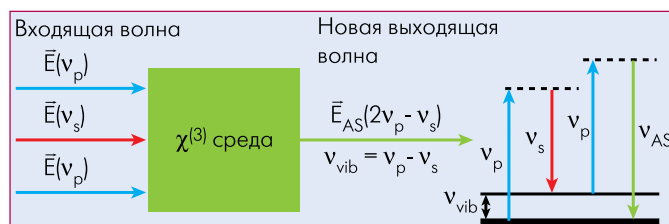
# РАМАНОВСКАЯ МИКРОСПЕКТРОСКОПИЯ И КАРС-МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

**М**етодом КАРС получены цифровые изображения распределения липидов в клетке. В качестве образца использовались человеческие раковые M1a-PaCa pancreatic клетки. На примере F-CARS 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 нанопотонике и синтезе флуоресцентных меток, селективно взаимодействующих с компонентами клетки, позволяет изучать состав и структурные превращения клетки. Для нефлуоресцирующих образцов либо биологически не совместимых с внедряемыми флуоресцентными метками в силу их токсичности, либо подверженных сильному фотоблику 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 (СРР) и Когерентного анти-стоксового Рамановского рассеяния (КАРС). В отличие от СРР с присущими ему ограничениями вследствие слабости сигнала и большой величины автофлуоресцентного фона, КАРС-отклик среды нелинейно зависит от мощности возбуждающего сигнала и, как минимум, на пять порядков превышает сигнал СРР.

Широкое применение оптических методов активного и спонтанного Рамановского рассеяния связано с перспективой в изучении меж- и внутриклеточных взаимодействий, се-



**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  $v_{vib}$ .

ллективных 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 (рис.1):  $E(v_p)$ , 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 второго фотона волны накачки  $E(v_p)$  на сфазированном колебательном состоянии  $v_{vib}$  с генерацией новой волны  $E_{as}(2v_p - v_s)$ .

\*СП СОЛАР ТИИ (Минск, Беларусь).

\*\*Институт Лазеров, Фотоники и Биопотоники, Университет Баффало, Университет Штата Нью Йорк (США).

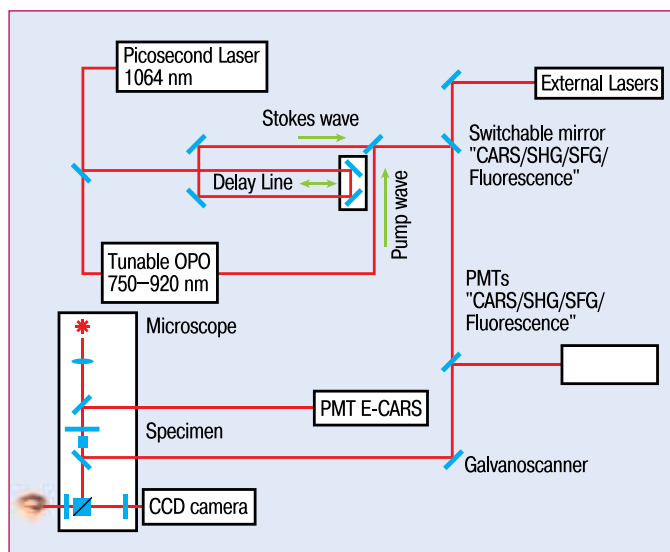


Рис.2 Схема КАРС микроскопа

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 полистириновых 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 слабоконцентрированную смесь полистириновых микросфер с калиброванным диаметром  $1587 \pm 25$ ,  $760 \pm 10$  и  $535 \pm 10$  нм.

Как видно (рис.3б), шарики в 760 и 535 мкм четко различимы (на рисунке приведен разброс значений диаметров). 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.

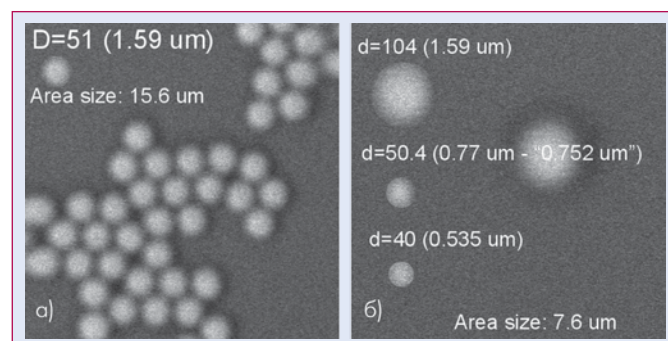
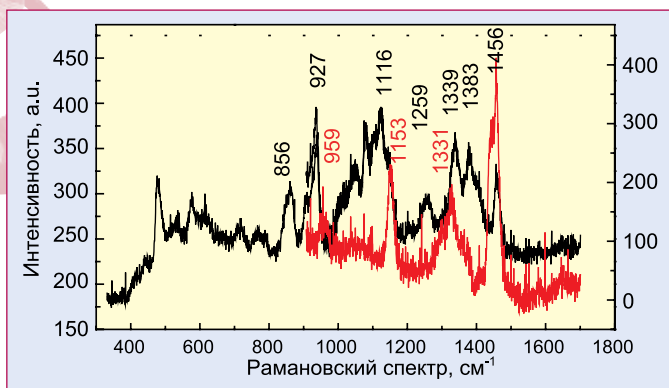
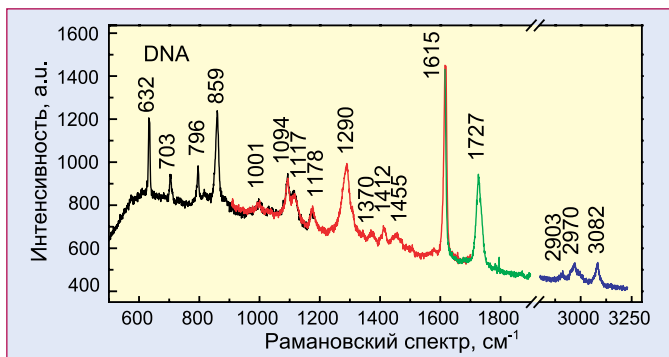


Рис.3 Калибровка пространственного разрешения КАРС-микроскопа. F-КАРС изображения полистириновых микросфер (1590 нм калиброванным диаметром – а) и 1590, 750 и 530 нм диаметрами – б) на частоте  $1670 \text{ см}^{-1}$  C=C колебательного резонанса (двойная связь). Размер зоны сканирования  $15,6 \times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



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



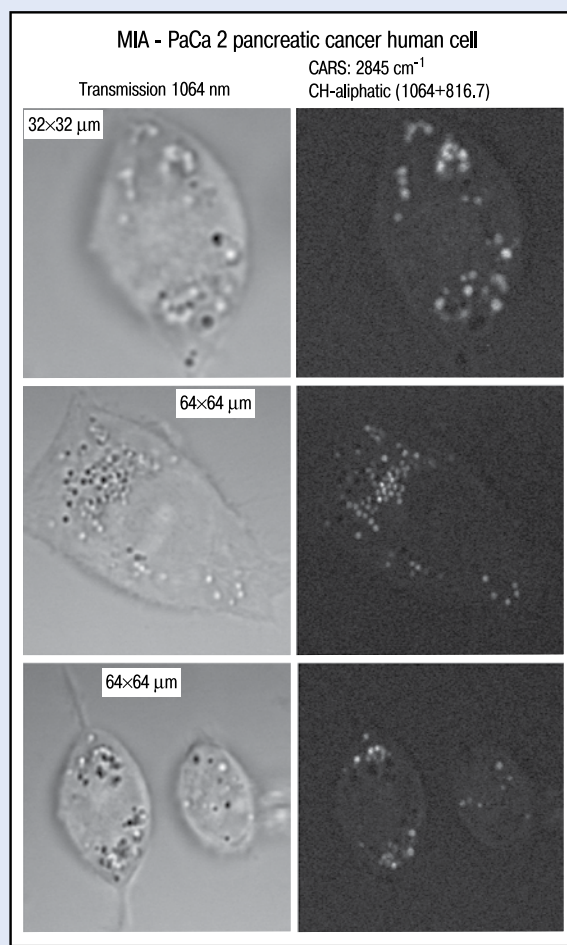
**Рис.5** Рамановский спектр экстракта DNA, приготовленный по специальной технологии из популяции HeLa типа клеток



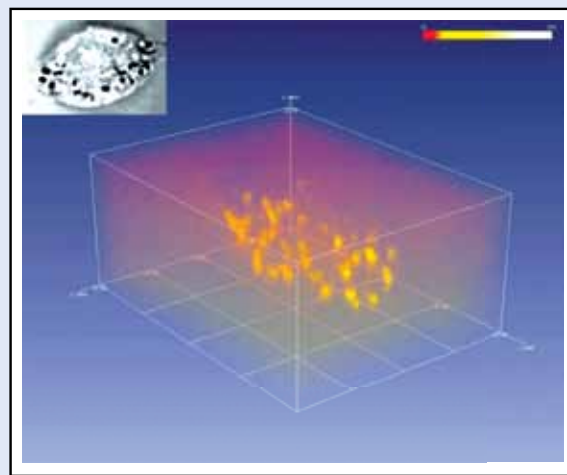
**Рис.6** In vitro Рамановский спектр ядрышек (nucleolus) ТЕ-типа мозговых клеток

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.

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



а)



б)

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

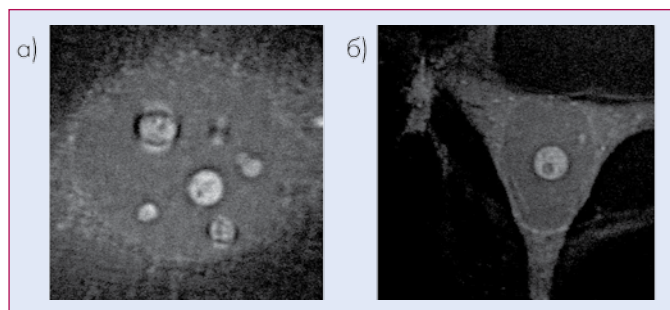
На рис.4 показан Рамановский спектр RNA, выделенных по специальному протоколу из ТЕ мозговых клеток животных. Аналогичный спектр DNA, экстрагированный из HeLa-типа клеток, показан на рис.5.

На рис.6 приведен Рамановский спектр ядрышка (nucleolus), входящего в состав ядра ТЕ-типа клетки. Анализируя характерные колебания и проводя последовательность спектральных измерений во времени, по изменению спектра и интенсивности линий или их смещению можно судить о про-



**Таблица.** Примеры колебательных резонансов

Химическая основа	Характерная область частот колебательного состояния и соответствующий Рамановский сдвиг (см <sup>-1</sup> )	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.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<sup>-1</sup>

цессах 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.

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-КАРС-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-КАРС-изображения TE-типа мозговых клеток, полученные при настройке системы в резонанс 2311 см<sup>-1</sup>. 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.

## НОВЫЕ КНИГИ

*Мир материалов и технологий*

**Нанотехнологии.**

**Наноматериалы.**

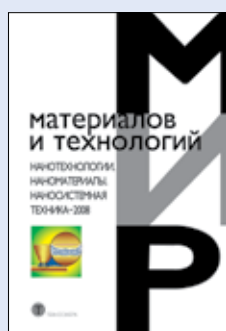
**Наносистемная техника-2008.**

**Мировые достижения – 2008 год**

**Под редакцией д.т.н., профессора П.П. Мальцева**

М.: Техносфера, 2008. – 416 с.

Эта книга является продолжением серии издательства "Техносфера" по мировым достижениям в области нанотехнологий. Она охватывает материалы, опубликованные в 2006–2008 годах в журнале "Нано- и микросистемная техника" и сгруппированные по разделам: наноматериалы, наноэлектроника, нанодатчики и наноустройства, диагностика наноструктур и наноматериалов, нанобиотехнология и применение нанотехнологий в медицине. В издании представлены примеры реализации и применения технологии формирования наноструктур, методов исследования нано-



материалов, метрологическое обеспечение и основы технологии наносистемной техники.

По просьбе читателей в книгу введен новый раздел – АНГЛО-РУССКИЙ ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ ПО МИКРО- И НАНОСИСТЕМНОЙ ТЕХНИКЕ, содержащий перевод и пояснения 900 английских терминов.

Книга представляет интерес для ученых, инженеров и преподавателей высшей школы, аспирантов и студентов, специализирующихся в области нанотехнологий, наноматериалов, наноэлектроники, микро- и наносистемной техники.

Первая книга "Наноматериалы. Нанотехнологии. Наносистемная техника. Мировые достижения за 2005 год" / Под ред. д.т.н., профессора П.П.Мальцева. – М.: Техносфера, 2006. – 152 с., ISBN 5-94836-085-7 находится в свободном доступе на сайте журнала "Нано- и микросистемная техника" <http://www.microsystems.ru>.

Обе книги могут быть использованы при подготовке курсов лекций "Введение в специальность" по государственному образовательному стандарту третьего поколения (ГОС-3), направление "Нанотехнология и микросистемная техника", закупленному Минобрнаукой России в декабре 2008 года.

### Как заказать наши книги?

По почте: 125319 Москва, а/я 91

По тел./факсу: (495) 956-3346, 234-0110

E-mail: [knigi@technosphera.ru](mailto:knigi@technosphera.ru); [sales@technosphera.ru](mailto:sales@technosphera.ru)