

Obrazowanie tkanek metodą spektroskopii Ramana i FTIR

A. Bombalska¹, M. Mularczyk-Oliwa¹, M. Naurecka², B. Sierakowski²

¹Zakład Technologii Optoelektronicznych, Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2 00-908 Warszawa, e-mail: aneta.bombalska@wat.edu.pl

²Centrum Inżynierii Biomedycznej, Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa, e-mail: magdalena.naurecka@wat.edu.pl

Wstęp

Próbki biologiczne charakteryzują się złożoną strukturą i zróżnicowanym składem chemicznym. Badanie tego typu materiałów polega na analizie bioskładników, które występują w bardzo niskich stężeniach. Wśród wielu metod analitycznych techniki spektroskopii optycznej bardzo dobrze sprawdzają się w badaniach komórek i tkanek pochodzenia biologicznego. Do głównych zalet metod spektroskopowych zaliczyć można: małą inwazyjność, niedestrukcyjność oraz możliwość wykrycia zmian patologicznych w tkankach już na wczesnym etapie ich powstania. Metody spektroskopowe są stosunkowo szybkie oraz umożliwiają badania *in vivo*, dzięki czemu można ominąć etapy pobierania i przygotowywania próbek do analizy oraz uniknąć biopsji.

Materiały i metody

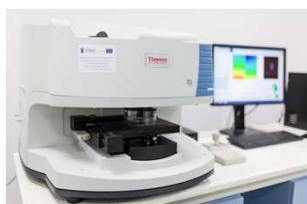
Obrazowanie tkanek ma na celu utworzenie obrazów zmian fizjologicznych i patologicznych zachodzących w tkankach roślinnych lub zwierzęcych. Obraz powstaje na skutek różnych oddziaływań promieniowania elektromagnetycznego z badaną materią. Spektroskopia FTIR i Ramana należą do metod, gdzie obserwujemy odpowiednio absorpcję i rozpraszanie promieniowania w efekcie oddziaływania z tkankami zachodzące w zakresie podczerwieni (400–4000 cm^{-1}). Wynikiem oddziaływań są pasma absorpcyjne (FTIR) i rozproszeniowe (Raman) charakterystyczne dla ugrupowań chemicznych obecnych w próbce. Pomiary mogą być prowadzone punktowo - dając widmo w miejscu pomiaru. Obecnie powszechna staje się jednak technika obrazowania, która umożliwia zebranie mapy widm wyznaczonego obszaru próbki i przy użyciu algorytmów obróbki widm - różnicowania obszaru próbki pod kątem rozmieszczenia wybranych bioskładników.

Materiał do badań stanowiły tkanki ludzkie (zęby i śluzówka z jamy ustnej) oraz roślinne (liście, marchew).

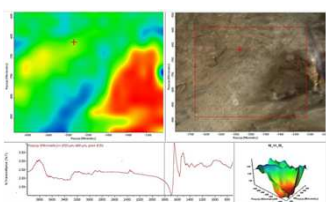


Do mapowania techniką rozproszenia Ramana wykorzystano spektrometr Nicolet IS-50 Raman/FTIR z długością lasera wzbudzającego 1064 nm i detektorem DLaTGS. Jednocześnie ze spektrometrem sprzężony jest moduł ATR-IR służący do rejestracji widm w zakresie podczerwieni.

Do mapowania techniką absorpcji w podczerwieni (FTIR) wykorzystano mikroskop Nicolet iN10 wyposażony w detektory DTGS, MCT, ruchomy stolik umożliwiający precyzyjną lokalizację obszaru mapowanego. Wymienne przystawki pozwalają na dopasowanie techniki pomiaru (DRIFT, ATR, transmisja) do rodzaju analizowanych próbek.

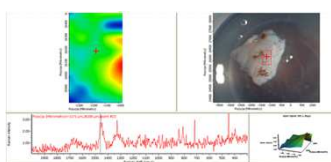


Wyniki



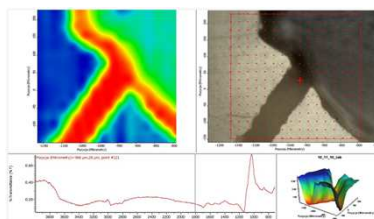
Rys. 1. Mapa tkanki śluzówki jamy ustnej wykonana techniką FTIR.

Komórki, tkanki i płyny ustrojowe człowieka składają się z wody, lipidów, białek, węglowodorów oraz kwasów nukleinowych. Dlatego też, w widmach absorpcyjnych IR rejestrowanych w tego typu materiałach wyróżnić można trzy główne masywy tj. pasma lipidów (2800 – 3000 cm^{-1}), białek (1600 – 1700 cm^{-1} , 1500 – 1560 cm^{-1}), kwasów nukleinowych (1000 – 1250 cm^{-1}) oraz dodatkowe pasma charakterystyczne dla określonego rodzaju tkanki. Mapa absorpcyjna badanej powierzchni obrazuje rozkład białek zawartych w próbce zdeterminowany obecnością grup funkcyjnych w zakresie 1500-1700 cm^{-1} .



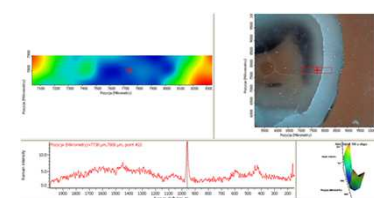
Rys. 2. Mapa tkanki śluzówki jamy ustnej wykonana techniką Ramana.

Przedstawiona mapa wycinka śluzówki jamy ustnej określa rozkład lipidów zawartych w próbce. Obszar 1400-1500 cm^{-1} determinowany jest przez drgania grup CH_3 , CH_2 oraz C=C pierścienia aromatycznego pochodzącego od lipidów.



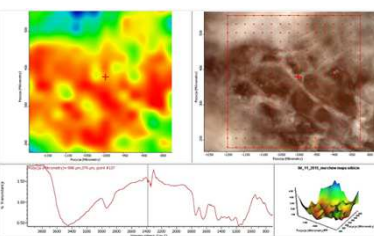
Rys.3. Mapa zęba wykonana techniką FTIR.

Szklivo jest zbudowane w 96–98% z materii nieorganicznej w postaci kryształów dwuhydroksyapatytu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Jego zawartość w szklawie i zębiny zmienia się stąd pasmo grup fosforanowych (1200–1000 cm^{-1}) charakterystyczne dla hydroksyapatytu jest bardziej intensywne w szklawie niż w zębiny. Zmiana próchnicza zęba to ubytek grup fosforanowych co przejawia się dalszym obniżeniem intensywności pasma. Mapa absorpcyjna przedstawia rozkład hydroksyapatytu w przekroju zęba charakterystyczny dla szklawki, zębiny i zmian próchnicznych.



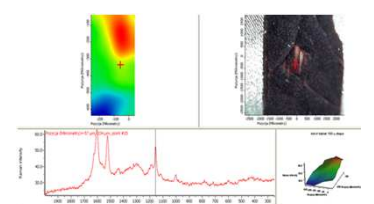
Rys.4. Mapa zęba wykonana techniką Ramana.

W widmie ramanowskim widoczny jest głównie jeden pik w okolicy 960 cm^{-1} , charakterystyczny dla grupy PO_4 . Intensywność tego pasma determinuje zawartość hydroksyapatytu w badanej próbce. Próchnicza zęba jest zmianą ilościową, stąd największa ilość fosforanów obserwowana jest w szklawie zdrowym, mniejsza zaś w miejscu objętym procesem próchnicznym.



Rys. 5. Mapa wycinka marchwi wykonana techniką FTIR.

Karotenoidy są popularnymi barwnikami wielu roślin. Należą do grupy nienasyconych węglowodorów o specyficznej budowie z charakterystycznym układem sprzężonych wiązań podwójnych węgiel-węgiel. W korzeniu marchwi występują dwa najważniejsze z nich czyli α - i β -karoten. Mapa absorpcyjna przedstawia rozkład karotenu w plasterku marchwi. Jest on determinowany obecnością intensywnego pasma będącego markerem karotenu w tkance roślinnej, pochodnego od drgań rozciągających wiązania C=C.



Rys.6. Mapa liścia wykonana techniką Ramana.

W liściach zawarte są liczne barwniki jak chlorofil, karotenoidy, ksantofile i antocyjany. Nadają one w zależności od pory roku różne zabarwienie komórkom roślinnym. Dominującą barwą badanego wycinka liścia jest bordo, która nadana jest przez dużą zawartość barwników z grupy antocyjanidyn (intensywne pasma 1320-1350, 1520 cm^{-1}). Pasma 1150 cm^{-1} pochodzi od chlorofilu, który mimo, iż niewidoczny gołym okiem, jest wciąż obecny w tkankach liścia.

Wnioski

Mapowanie umożliwia precyzyjne określenie nie tylko składu chemicznego badanej próbki, ale także rozkładu poszczególnych bioskładników na wyznaczonej powierzchni. Procesy patologiczne toczące się w żywych tkankach w istotny sposób zmieniają ich strukturę, a zatem rozkład i ilość określonych grup funkcyjnych. W miejscu procesu patologicznego rozkład ugrupowań chemicznych staje się wyraźnie odmienny, niż otaczająca go tkanka zdrowa. Istotne mogą okazać się zmiany dotyczące jedynie bardzo specyficznych grup funkcyjnych, które można wyselekcjonować w toku badań laboratoryjnych nad tkankami fizjologicznymi i zmienionymi chorobowo. Takie swoiste markery umożliwiają różnicowanie tkanki zdrowej i patologicznej, a obrazowanie staje się ważnym narzędziem w diagnostyce nowotworów.

Prezentowane techniki obrazowania uzupełniają się wzajemnie. Ze względu na różne zjawiska fizyczne (absorpcja/rozpraszanie) leżące u podstaw spektroskopii FTIR i Ramana, pasma niewidoczne w widmie FTIR będą obecne w widmie Ramana i odwrotnie. Użycie obu technik do obrazowania zmian w tkankach zwiększają zatem precyzję monitorowania toczącego się potencjalnego procesu patologicznego.