

СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В МЕДИЦИНЕ

Огромные возможности спектральных и фотометрических методов в лабораторной диагностике уже ни у кого не вызывают сомнений. Границы использования этих методов благодаря соединению их с методами микроскопии были значительно расширены.

Спектр поглощения клетки прежде всего определяется составом клетки, теми компонентами, из которых она состоит. Спектр несет информацию о состоянии клетки, так как при изменении состояния клетки изменяется ее состав (рис.1) и, соответственно, оптический спектр. Цитоспектрофотометрия (цитофотометрия) – это спектральный метод количественного и качественного изучения химических веществ клетки по ее избирательному поглощению ультрафиолетовых, видимых и инфракрасных лучей. Абсорбционная микроскопия – метод изучения структуры и состава клеток животных и растительных организмов с помощью микроскопа по избирательному поглощению света внутриклеточными структурами.

Микроскоп как оптический прибор формирует информацию о клетке в спектральном диапазоне от 200 до 1100 нм. Человеческий глаз – уникальный оптический прибор, он регистрирует информацию в спектральном диапазоне от 400 до 700 нм. Но для оценки состояния клеток на препаратах он обладает рядом существенных недостатков: во-первых, глаз формирует качественную оценку (а спектрофотометры дают количественную оценку); во-вторых, он обладает пониженной чувствительностью к изменению оптической плотности объекта; в-третьих, объекты с разным спектром излучения воспринимаются глазом как объекты одинакового цвета; в-четвертых, диапазон его спектральной чувствительности уже, чем у спектральных приборов. Таким образом, получается, что микроскоп дает информацию, а человеческий глаз ее «не видит».

Рассмотрим длины волн, характерные для биологических объектов, в различных спектральных диапазонах. Известно, что в ультрафиолетовой части спектра содержится информация о белках. Например, типичный белок, не содержащий

простетических групп, имеет максимум поглощения на длине волны 280 нм. Простетическая группа это небелковые (и не производные аминокислот) компоненты. Они связаны с белками и выполняют важные роли в биологической активности соответствующих белков. Простетические группы могут быть органическими (витамины, сахара, липиды) или неорганическими (например, ионы металлов). Нуклеиновые кислоты дают полосу поглощения в районе $\lambda=260$ нм.

В видимом диапазоне имеют сильное поглощение различные пигменты и хромофоры. Меланин – пигмент черного или коричневого цвета – имеет максимум поглощения в диапазоне длин волн $\lambda=350-700$ нм. Гемоглобин – белок, содержащийся в эритроцитах, переносит кислород. Гемоглобин с присоединенным кислородом, оксигемоглобин (HbO_2), имеет максимумы поглощения на длинах волн $\lambda_1=415$ нм, $\lambda_2=542$ нм, $\lambda_3=577$ нм. Гемоглобин без кислорода, дезоксигемоглобин (Hb), имеет максимумы поглощения на длинах волн $\lambda_4=431$ нм и $\lambda_5=555$ нм. Билирубин – один из желчных пигментов. При некоторых заболеваниях печени содержание билирубина в крови увеличивается. Билирубин имеет максимум поглощения на длине волны $\lambda_6=460$ нм.

С точки зрения диагностики различных заболеваний ИК-спектральная область наиболее информативна. ИК-диапазон содержит информацию о колебательных спектрах биологических молекул, которые достаточно большие. Появление пиков поглощения на определенных длинах волн связано с возникновением различных заболеваний. С помощью ИК-спектров производится идентификация лекарственных препаратов. За высокую информативность ИК-спектры часто называют «отпечатками пальцев» для молекул.

Возникает вопрос – можно ли создать комплекс, который позволит получить количественную информацию о клетке в более широком спектральном диапазоне и с более высокой чувствительностью. И затем превратить его в прибор для диагностики. В созданном комплексе микроскоп состыкован со спектрофотометром (рис.2). В этом случае информация об объекте исследования поступает и в человеческий глаз, и в спектрофотометр. Стыковка микроскопа со спектрофотометром осуществляется с помощью оптического кабеля. Один конец оптического кабеля устанавливается на оптической оси микроскопа, а второй – подается на вход спектрофотометра. Такой прибор дает количественную информацию о спектральных свойствах клетки в широком диапазоне излучения, имея высокую чувствительность. Давайте посмотрим, какие спектры позволяет исследовать микроскоп-спектрофотометр.

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Если спектрофотометр подключить к инвертированному микроскопу, то можно проводить анализ спектральных характеристик живых клеток, находящихся в чашках Петри. Особо следует заметить, что при данном способе исследования клетки не подвергаются никакому дополнительному вредному воздействию. Для освещения клеток используют только те источники освещения, спектр которых хорошо известен (рис.3). При изучении живых клеток регистрируется спектр поглощения излучения, прошедшего через клетку. В спектре поглощения живой клетки содержится информация о состоянии клетки, о процессах, происходящих в клетке, о наличии различных веществ в ее составе. Существуют несколько задач, решаемых с помощью созданного комплекса. Первая задача состоит в выяснении вопроса – находится ли клетка в нормальном состоянии или она уже погибает. Такая задача исследовалась на ооцитах (яйцеклетках) человека. Обнаружено, что спектры поглощения нормального ооцита и гибнущего ооцита существенно различаются. Нужно ли говорить о том, что при наблюдении глазом в микроскоп это были две прозрачные клетки, практически не различаемые человеческим глазом.

Вторая задача связана с определением однородности колонии клеток. В реальном масштабе времени идет сканирование колонии клеток на микроскопе, когда наблюдают спектры поглощения. Если спектры клеток одинаковы – значит колония клеток однородная. Если имеются клетки с различными спектрами – значит колония клеток неоднородная.

Третья задача возникает при типировании клеток – когда необходимо определить типы клеток, населяющих колонию. Для этого заранее, на этапе обучения на чистых культурах, формируют эталонные спектры различных типов клеток. Затем, при работе с исследуемой культурой, спектр исследу-

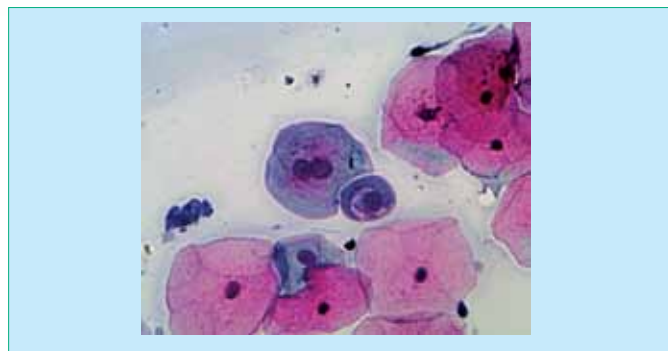


Рис.1 Эпителиальные клетки человека

емой клетки сравнивают с эталонными спектрами. После этого принимают решение – к какому из ранее изученных типов относится клетка. Если такой спектр не найден, то его относят к нераспознанному типу. Из решения данной задачи выросло интересное техническое предложение по сортировке клеток. Довольно просто создать ручной сортировщик. Для этого на инвертированный микроскоп устанавливают два простых микроманипулятора и на них крепят двойные держатели с микроинъекторами. Таким образом, можно производить ручную сортировку клеток на четыре класса. После того, как клетка была идентифицирована и отнесена к одному из четырех классов, ее засасывают в соответствующий микроинжектор.

Четвертая задача – определение стволовых клеток. Она усложняется неопределенностью на начальном этапе, когда не известно, является ли данная клетка стволовой или нет. В этом случае эталонные спектры формируются другим путем. Регистрируют спектры выбранных для исследования клеток и следят за их развитием. Лишь после завершения цикла развития можно определить, какие клетки были правильными, а какие нет. Затем из спектров правильных клеток формируют эталонный спектр. Рассуждая логически, можно заключить: если клетка, которую мы пускаем в эксперимент, имеет правильный спектр, то высока вероятность того, что она будет развиваться по правильному пути.

Пятая задача – количественное определение содержания отдельных компонентов в клетке. Например, содержание гемоглобина. Нам заранее известен спектр поглощения гемоглобина. Тогда содержание гемоглобина в отдельных эритроцитах определяют по интенсивности его спектров. При этом следует иметь в виду, что эритроциты не окрашены, и работу производят с каплей свежей крови. А различия в спектрах оксигемоглобина и дезоксигемоглобина позволяют отдельно оценить содержание этих белков.

СПЕКТРЫ ОКРАШЕННЫХ КЛЕТОК

При оценке степени окраски клеток глазом играет роль высокая степень субъективизма, даже если человек не дальтоник. При регистрации степени окраски спектрофотометром мы получаем принципиально более достоверную информацию об окраске

клеток. Вполне возможно, что клетки при апоптозе будут окрашиваться немного по-другому, но глаз не замечает этих различий. (Апоптоз – запрограммированная гибель клетки, отличается от некроза – неконтролируемого разрушения клетки).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОИДНОСТИ КЛЕТОК

Если использовать комплекс в качестве фотометра, то открываются новые пути к исследованиям плоидности клеток. Плоидность – число наборов хромосом, находящихся в ядре клетки или в ядрах клеток многоклеточного организма. Нарушение плоидности ведет к серьезным болезненным изменениям. Получая информацию о количестве красителя, которое поглотила заданная клетка, сразу можно определить количество хромосом в ядре. А по нему и определить плоидность клетки. Таким образом, можно выделять диплоидные и полиплоидные клетки. Как известно, наличие полиплоидных клеток является важным параметром для диагностики онкологических заболеваний.

ИЗУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Если состыковать спектрофотометр с флуоресцентным микроскопом, то появляется ряд новых принципиальных возможностей. Стандартный метод работы с флуоресцентными метками заключается в том, что препарат облучают на определенной длине волны. Флуоресценция возникает на других волнах, более длинных. Из них, используя спектральные фильтры, выделяют рабочую длину волны, наиболее интенсивную. В новом методе удаляют отсекающий фильтр и регистрируют полный спектр флуоресценции. Появляется возможность более тонкого анализа флуоресценции при работе не с одним, а с несколькими флуоресцентными зондами.

Существуют две основные флуоресцентные методики. Первая состоит в регистрации свечения флуорохромов, которыми метятся клетки. Флуорохромы – вещества, применяемые в флуоресцентной микроскопии. Флуорохромами окрашивают клетки. Под действием ультрафиолетового света они начинают светиться видимым светом. При этом спектральный подход оказывается особенно эффективным при работе

с несколькими флуорохромами. Данный подход используется в методе MFISH (Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization), когда клетки одновременно окрашивают различными флуорохромами. Вторая методика состоит в регистрации собственного свечения клетки. Спектральный подход позволяет оценить однородность состава клетки [1].

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ОТРАЖЕНИЯ

Наряду с изучением спектров поглощения комплекс позволяет регистрировать изучение спектров отражения. В этом случае внешний осветитель расположен сбоку от объекта, а его отраженный спектр попадает в объектив микроскопа. Данный метод применим при оценке через микроскоп биоптатов, небольших кусочков ткани или органа, направляемых на исследование. Но особенно он эффективен при диагностике заболеваний кожи. Для этого спектрофотометр соединяется со стереомикроскопом. Стереомикроскоп на выносной штанге устанавливают над исследуемым участком кожи человека и оценивают состояние поверхности кожи и ее подповерхностных слоев. Анализ спектра позволяет судить о состоянии кровеносной системы. С помощью этой же методики можно диагностировать меланому. Дело в том, что меланин обладает особыми спектральными свойствами, и по распределению спектра определяют его содержание [2]. Данный комплекс особенно эффективен в косметологии. Он позволяет более объективно оценить состояние кожи и выбрать правильный метод коррекции. Можно также объективно оценить эффективность процедур, если измерить состояние кожи до проведения процедур и после.

В ботанике очень информативным оказывается изучение спектров отражения от поверхности листа растения. Если растение имеет некоторое заболевание, то его спектр отражения изменяется по сравнению со здоровым. Хлорофилл поглощает синий и красный свет. А значит, спектр поглощения хлорофилла имеет два максимума: $\lambda_1=420$ нм и $\lambda_2=680$ нм. Зеленый свет не поглощается, поэтому листья – зеленые.

Билирубин – оранжево-желтый пигмент, содержится в крови, имеет максимум в спектре поглощения на $\lambda=460$ нм. Определение билирубина в крови можно провести неинвазивно, регистрируя спектры излучения, отраженного от кожи. Для повышения точности метода регистрируют отражение на двух длинах волн, а не на одной.

ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВИ

Одним из методов определения содержания белка является прямая спектрофотометрия (метод Вартбурга). Метод основан на способности ароматических аминокислот поглощать свет на длине волны $\lambda=280$ нм. Интенсивность поглощения пропорциональна количеству белка. В 1956 году Владимиров Ю.А. и Конев С.В. обнаружили явление флуоресценции белков плазмы крови. Таким образом, содержание белка определяют и флуоресцентным методом. Кислород в крови переносится оксигемоглоби-

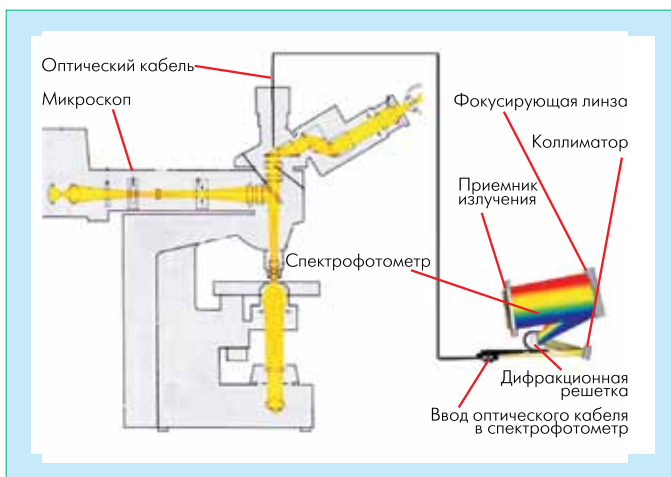


Рис. 2 Оптическая схема микроскопа-спектрофотометра



Рис. 3 Спектры основных источников света, используемых в спектроскопии клеток

ном. Оксигемоглобин имеет фиксированные пики поглощения на длинах волн $\lambda_1=415$ нм, $\lambda_2=542$ нм, $\lambda_3=577$ нм. Количество кислорода в крови определяют по величине интенсивности поглощения на этих длинах волн.

ХОД ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Спектральный метод позволяет регистрировать ход химической реакции в клетке. При стандартной методике регистрируемый сигнал от нескольких молекул достаточно слаб. Новая методика состоит в том, что исследуемый объект (например, цитохром С, маленький глобулярный белок) соединяется с наночастицами золота размером 20 нм. Испытывая давление света, частицы колеблются (плазмотронный эффект). Частоты колебаний соответствуют длинам волн в диапазоне $\lambda=530-580$ нм. В этом случае сигнал гораздо более сильный. Таким образом, можно зарегистрировать систему из нескольких десятков молекул.

Однако знание характерных длин волн еще не гарантирует качественную диагностику организмов. Камень преткновения — это интерпретация полученных спектров. Встает сложная задача выбора алгоритма обработки полученного спектра. Прежде всего, необходимо составить базу данных по различным классам объектов (клеткам). Для каждого класса формируют свои эталонные спектры. Один из методов формирования эталонного спектра определенного класса опирается на усреднение. То есть объединяют несколько десятков спектров объектов заданного класса и затем их усредняют. После того, как эталоны сформированы, приступают к решению задачи идентификации микрообъектов. Для этого вводится метрика в пространстве спектров, и при предъявлении неизвестного объекта его относят к тому классу веществ, расстояние до спектра которого минимально (минимизация невязки). По такому алгоритму ведут поиск образцов-аналогов по составленной заранее базе эталонных спектров. Существуют и другие способы интерпретации спектров:

Распознавание по одной длине волны. Пусть заранее известно, что некоторое вещество поглощает излучение на определенной длине волны. Необходимо определить, имеется ли в поле зрения данное вещество. Для этого достаточно узнать, имеется ли в спектре на определенной длине волны пик поглощения.

Далее, распознавание по двум длинам волн. Измеряется отношение величин поглощения в спектре для двух фиксированных значений длин волн, выбранных в качестве аналитической пары. В зависимости от величины этого отношения принимают решение, к какому классу отнести исследуемый объект. Этот метод используют при экспертизе твердых жиров. Коэффициент отражения определяют на длинах волн $\lambda_1=410$ нм и $\lambda_2=510$ нм.

В-третьих, распознавание по трем длинам волн. Из всего спектра выбирают и сравниваются коэффициенты поглощения только для трех длин волн. Для этого спектральные данные отображаются в двумерном признаковом пространстве. Пространство признаков двумерно, так как три значения нормируются таким образом, чтобы в сумме давать единицу. Другой вариант состоит в анализе двух отношений: отношения первых двух величин к третьей. Этот метод аналогичен трехкомпонентному представлению цветового зрения. Однако в этом случае в качестве базовых используются не красный ($\lambda_k=700$ нм), зеленый ($\lambda_z=500$ нм) и синий ($\lambda_c=400$ нм) длины волн, а наиболее информативные для распознавания длины волн. Это псевдоцвет. Но полученные данные также можно отображать в псевдоцветах на экране монитора. Метод лежит в основе экспертизы мясной продукции. В этом случае измеряется коэффициент поглощения на длинах волн: $\lambda_1=545$ нм, $\lambda_2=582$ нм, $\lambda_3=650$ нм. И еще распознавание по четырем длинам волн. Если для идентификации объектов не хватает информации, получаемой по трем длинам волн, то производится более тонкий анализ на основе коэффициентов поглощения для четырех длин волн. Нарращивание мощности метода можно проводить и дальше, увеличивая количество анализируемых длин волн.

Другая важная задача спектрофотометрии заключается в выборе наиболее информативных длин волн, по которым происходит распознавание. Для этого разрабатывают специальные методики. Существуют различные математические методы улучшения разрешения спектров. В частности, при появлении перекрытия спектральных полос прибегают к методу спектроскопии производных. Главное условие для разработчиков таких методов — исключить зависимость результатов измерений от условий проведения эксперимента, повысить достоверность получаемых данных. Успешное лечение невозможно без качественной диагностики. Для повышения качества диагностики можно использовать уже имеющееся оборудование — микроскоп, спектрофотометр и компьютер. Основная задача — перейти от субъективных и качественных методов диагностики к объективным и количественным методам диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток. — Изд-во: Пушино, 2004.
2. Оптическая биомедицинская диагностика. Том 1–2./ Под ред. Тучина В. — М.:Наука, Физматлит, 2007.