От спектров к спектральным изображениям

Uwe Einchoff

Bruker BioSpin GmbH; D-76287 Rheinstetten, Германия; E-Mail: Uwe.Eichhoff@bruker-biospin.de

Поступила: 05 ноября 2008 / Принята к опубликованию: 10 сентября 2009

Визуальный анализ неоднородных образцов обычно начинается наблюдением под микроскопом для выяснения их пространственной структуры. Однако, такие исследования не дают никакой информации о химическом составе и молекулярной структуре. Обычные спектроскопические исследования предоставляют такую информацию, но только в интегральном виде. Только объединение обоих методов даёт нам полную картину, т.е. пространственное распределение всех химических составляющих и молекулярной структуры. Развитие медицинских методов визуализации дали большой толчок в этом направлении. Сегодня практически все аналитические методы обладают возможностью пространственной визуализации аналитической и молекулярной информаций. В нашем рассмотрении мы будем ограничиваться теми методами, которые активно развивает фирма Bruker: ИК-Фурье-, Раман-, ЯМР-, ЭПР-, масс-спектроскопия и рентгеновские аналитические методы. Способы пространственного кодирования отличаются для разных аналитических методов. Проще всего – фокуссировать возбуждающее спектр излучение на одной точке и сканировать эту точку либо перемещением образца под микроскопом, либо сканированием точки возбуждения по плоскости образца. Этот метод применяется для ИК-Фурье- , Раман-, MALDI-TOF-масс-спектроскопии и рентгеновских методов. Пренебрегая ограничением из-за пробоподготовки, разрешение при этом ограничивается в первом приближении длиной волны возбуждающего излучения, которая составляет для этих методов несколько микронов или нанометров в случае рентгена.

Для ЭПР и ЯМР длина волн составляет сантиметры и метры, поэтому там применяются совсем другие методы. Резонансные частоты пропорциональны напряжённости магнитного поля.

Табл.1 Методы пространственного кодирования и основные области применения для разных аналитических методов

аналитический метод	метод визуализации	пространственное кодирование	области применения
ИК-Фурье и Раман-спектроскопия	ИК- и Раман-микроскопия ИК- и Раман-визуализация	сканирование под микроскопом плоскостный матричный детектор	медицина, биология, материаловедение, пищевые продукты
время-пролётная масс-спектроскопия с лазерной матричной ионизацией (MALDI-TOF)	MALDI-TOF-визуализация	сканирование точки лазерного возбуждения	медицина
рентгеновская диффракция	визуализация кристаллических фаз	сканирование точки возбуждения	материаловедение
рентгено-флюоресцентная спектроскопия	элементный микроанализ	сканирование точки возбуждения	аналитическая химия материаловедение
ядерный магнитный резонанс (ЯМР)	ЯМР-томография ЯМР-микроскопия	преобразование Фурье градиентное кодирование	медицина, биология, материаловедение
электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)	ЭПР-томография ЭПР-микроскопия	реконструкция по проекциям градиентное кодирование	медицина, биология, материаловедение

В ЯМР на однородное статическое магнитное поле накладываются линейные градиенты по двум или всем трём координатам. Таким образом каждому вокселю соответствует своя

© Uwe Einchoff

индивидуальная резонансная частота и фаза сигнала. Спад свободной индукции после возбуждающего вч- импульса содержит всю эту информацию. Двух- или трёхкратное преобразование Фурье определяет все частоты и соответствующие им амплитуды сигнала, по которым составляется изображение. В импульсном ЭПР сигналы являются слишком быстрыми (наносекунды вместо микросекунд в случае ЯМР).

Поэтому в ЭПР-томографии спектр многократно записывается в стационарном режиме с помощью развёрткой магнитного поля в присутствии градиента, направление которого меняется.

Рис. 1: Примеры изображений полученных разными аналитическими методами

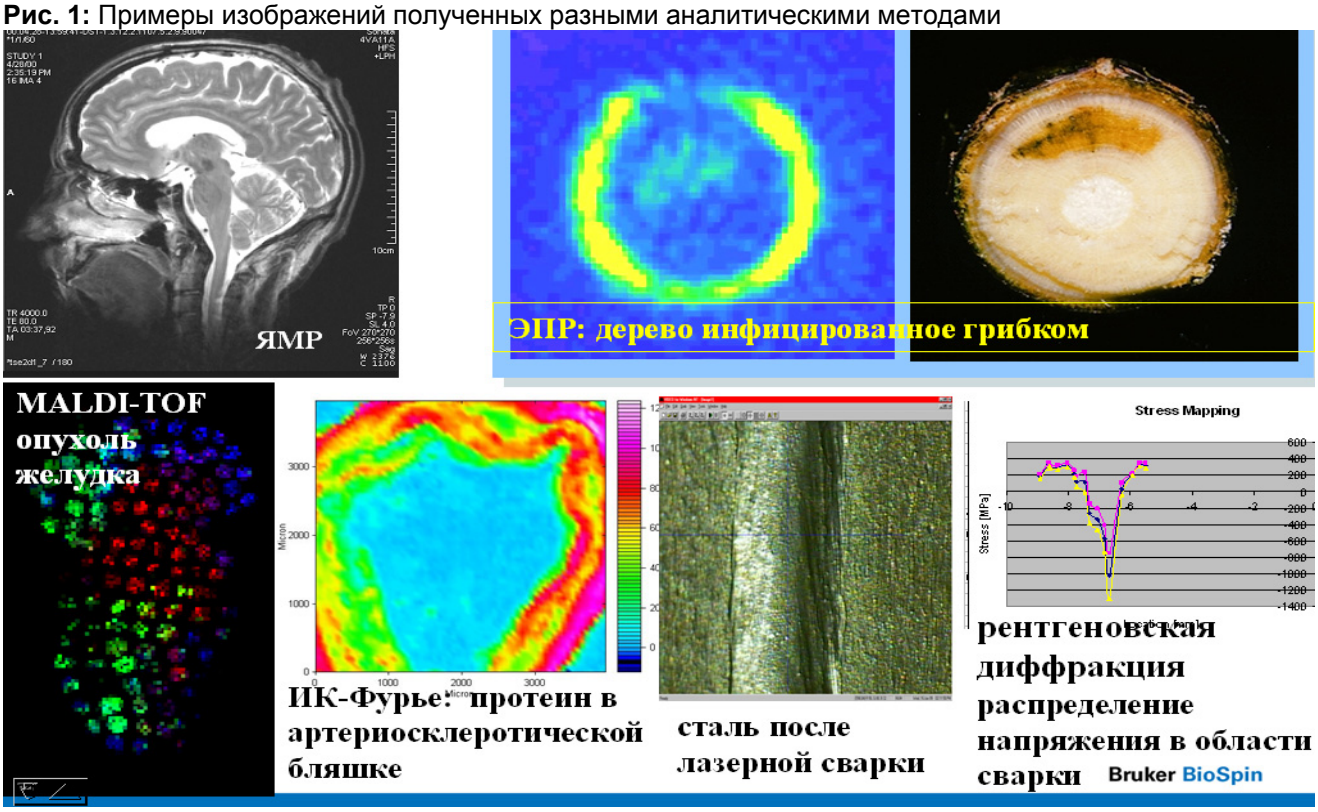
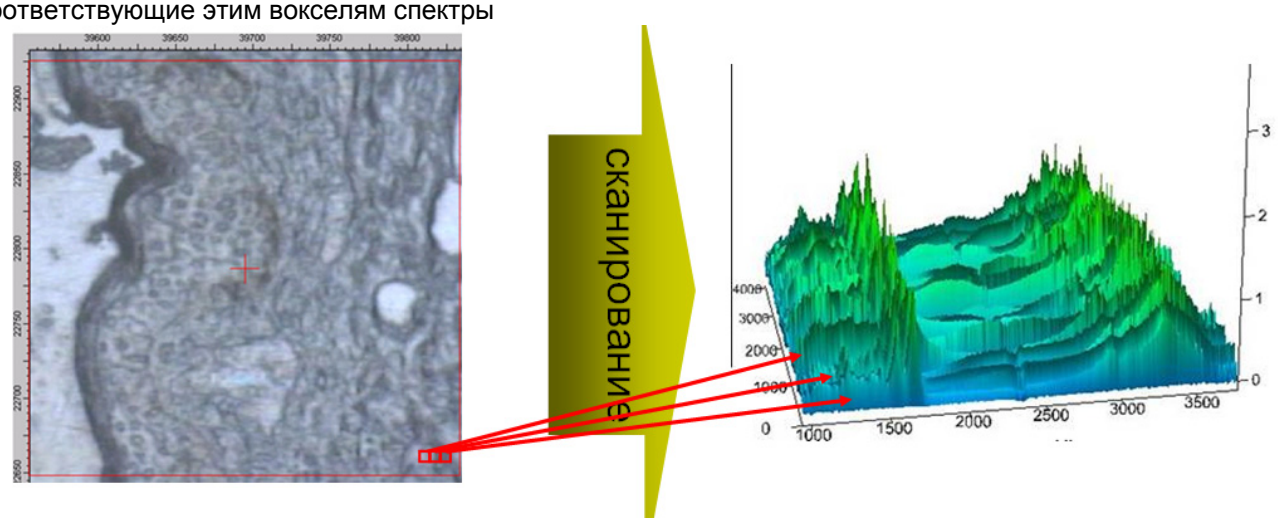


Рис.2: Слева: изображение под световым микроскопом (в левом углу помечены три векселя); справа: соответствующие этим векселям спектры



Изображение потом восстанавливается методом реконструкции по проекциям аналогично рентгеновской компьютерной томографии.

В рис.1 составлены изображения полученные разными аналитическими методами. ЯМР-томография (МРТ) широко применяется в медицинской диагностике (сагиттальное сечение головного мозга). ЭПР представлен сечением инфицированного грибком дерева. Инфекция приводит к появлению свободных радикалов, которые наблюдаются в спектре ЭПР. Матричная лазерная десорбционная масс-спектроскопия (МЛДИ, MALDI-TOF) показывает характерные для опухоля протеины (красный цвет) на фоне здоровых мукозной и эпителиальной тканей. В ИК-Фурье-изображении определяется распределение протеинов в артериослеротической бляшке. Рентгеновская диффракция представлена изображением стали после лазерной сварки, на основе которого можно определить распределение напряжения в материале.

ИК-ФУРЬЕ- И РАМАН-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

Для ИК- и Раман-визуализации образец помещается под микроскопом и возбуждающий ИК-луч или лазерное излучение (для Рамана) фокуссируется в маленькой точке (вокселе) образца. Точка перемещается и спектр каждого вокселя записывается. Суммарная информация представляется в виде контурного или пикового изображения (рис.2). При этом в зависимости от объектива ИК-микроскопа спектры записываются в режимах пропускания, зеркалного отражения, полного внутреннего отражения или отражения под скользящим углом.

Даже при коротком времени измерения 10 сек. для одного спектра, на изображение со средним разрешением (1024 точек) требуются 2.8 часов (рис.3). Однако, за последние годы плосткостные матричные детекторы (FPA : focal plane array detector) , изначально разработанные для военной промышленности, стали доступными для аналитических применений. Они представляют собой плоскую матрицу миниатюрных скоростных MCT-детекторов (MCT: mercury,cadmium,tellur) для средней или InSb-детекторов (антимонид индия) для ближней ИК-области (табл.2). Образец отображается на плоскость этого детектора и спектры всех вокселов записываются одновременно. Таким образом время измерения для всего изображения соответствует времени измерения единичного спектра (рис.3).

Спектрометр для ИК- и Раман-визуализации как правило оснащён двумя детекторами, одним для измерения спектра в одной точке и плоскостным матричным детектором для скоростной визуализации, которые переключаются от центрального компъютера спектрометра.

Табл.2: Свойства плоскостных матричных детекторов

материал	MCT	InSb
спектральный диапазон	880...5500 cm-1	1900 - 10000 cm-1
размер матрицы	64 x 64	128 x 128
размеры вокселя	62 µm	24 µm
размеры детектора	4 x 4 мм	3 x 3 мм
разрешение с микро-объективом	4 µм / 250 µм	1.5 µм / 200 µм
разрешение с макро-объективом	62 µм / 4 мм	23 µм / 3мм

Рис.3 демонстрирует исследование полимеров с помощью Раман-визуализации. В Раман-спектре смеси двух полимеров выбираются характерные полосы для обеих компонентов и изображение показывает их относительное пространственное распределение, от которой зависят макроскопические свойства этого материала. Другими областями применения ИК-визуализации являются биология и медицина. Выбирая спектральные полосы поглощения для коллагена, липидов и протеинов можно изображать их распределение в препарате ткани артериосклеротической блашки и точно определить место накопления зловредных липидов (Рис.4).

MALDI-TOF-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

Многие заболевания начинаются на уровне геномы. Модификации геномы приводят к изменениям протеомы, в частности в экспрессии протеинов. Процессы метаболизма переносят изменения в протеоме в состав и концентрацию низкомолекулярных метаболитов. MALDI-TOF-масс-спектроскопия (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, ионизация матричной лазерной десорпции; TOF: time of flight, время пролёта) является методом выбора для определения протеинов в биологических структурах и определения их структуры. ЯМР-спектроскопия используется для изучения низкомолекулярных метаболитов. Поэтому оба метода находят всё большее применение в медико-биологических и медицинских исследованиях.

Исходными образцами для таких исследований являются ткани или биологические жидкости.

© Uwe Einchoff

Рис.3 Раман-визуализация смеси двух полимеров. *слева*:Раман-микроскоп. *справа сверху*:спектры отдельных компонентов и изображение относительного распределения компонент полученное сканированием за 2.8 часа. *справа внизу*: изображение полученное с помощью FPA за 10 сек. и линии по которым построены изображения

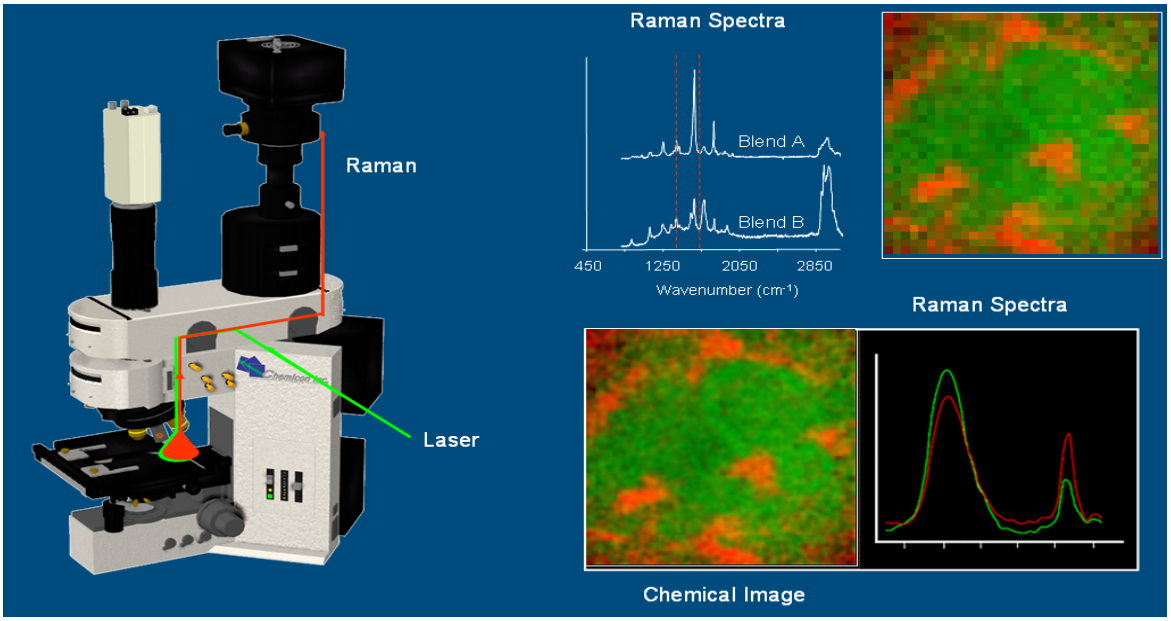
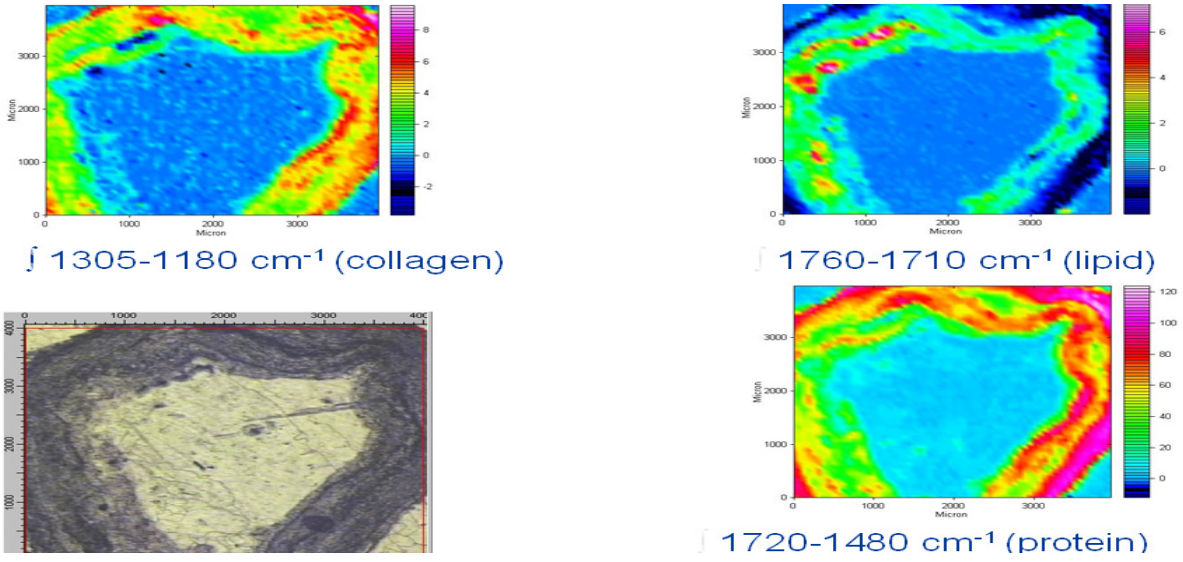


Рис.4: Микроскопическая картина и артериосклеротической блашки (внизу слева) и ИК-изображение распределения основных компонентов: коллаген, липиды и протеины с указанием соответствующих полос поглощения



Масс-спектроскопия обнаруживает изменения в составе протеинов и позволяет определить их первичную структуру и таким образом и структуру соответствующих им участков ДНК. Изменяя соответствующий ген можно создать трансгенных животных, которые потом могут служить моделью связанного с этим геном заболевания. МР-томография с специально направленными контрастными агентами потом позволяет «ин виво» исследовать механизм

заболевания на клеточном и молекулярном уровнях и разрабатывать методы для его лечения.

Анализ протеомы обычно начинается с двухмерным электрофорезом. Разделённые пятна наносяться на мишень время-пролётного масс-спектрометра. В MALDI-TOF-масс-спепктроскопии образцы помещенные в инертную матрицу подвергаются мягкой ионизации с помощью лазерного облучения и белки с молекулярной массой выше 100.000 далтонов ионизируются в молекулярном виде без фрагментации. После ионизации они ускоряются в электромагнитных полях и летят до детектора. Рефлектор фокуссирует ионы с одинаковой массой, но с разной скоростью. Время пролёта ионов пропорционально корню их массы.

Рис.5 демонстрирует чувствительность и разрешение MALDI-TOF-масс-спектроскопии на примере переваренного бычьего сыворотного альбумина в фемтомолярной концентрации. В спектре наблюдаются девять ионов соответствующие компонентам этого протеина. Эти ионы потом изолируются для дальнейшей фрагментации.

Рис.5 MALDI-TOF-спектр переваренного бычьего сыворотного альбумина в фемтомолярной концентрации

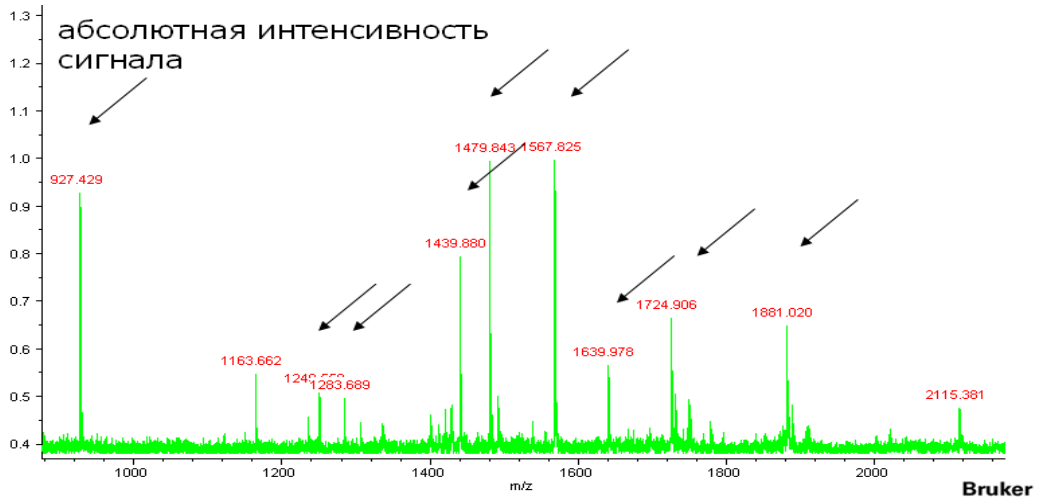
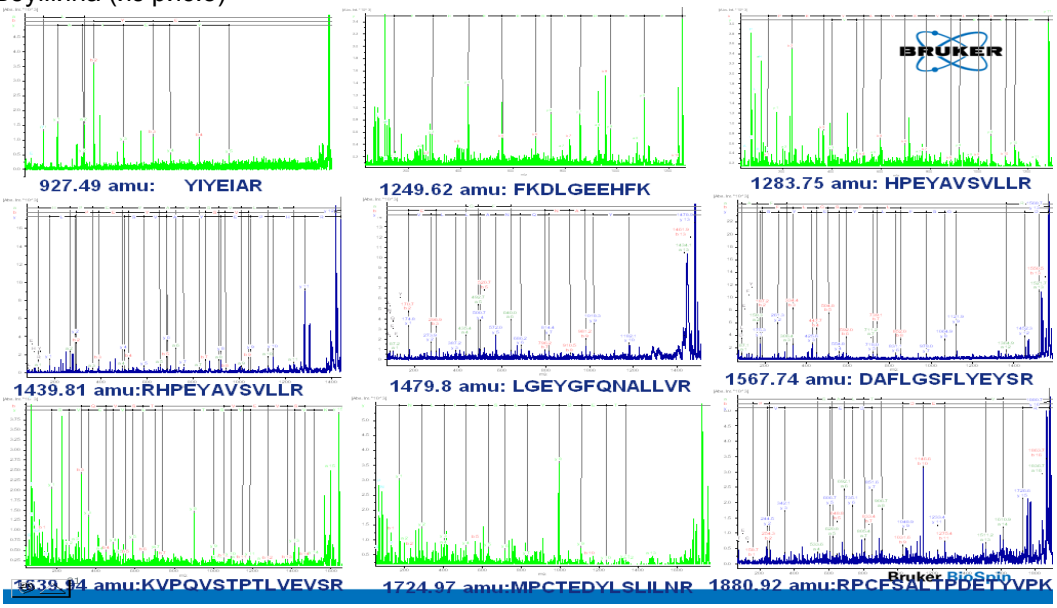


Рис.6: Спектры фрагментации (MS/MS или TOF/TOF) девяти компонент из бычьего сыворотного альбумина (из рис.5)

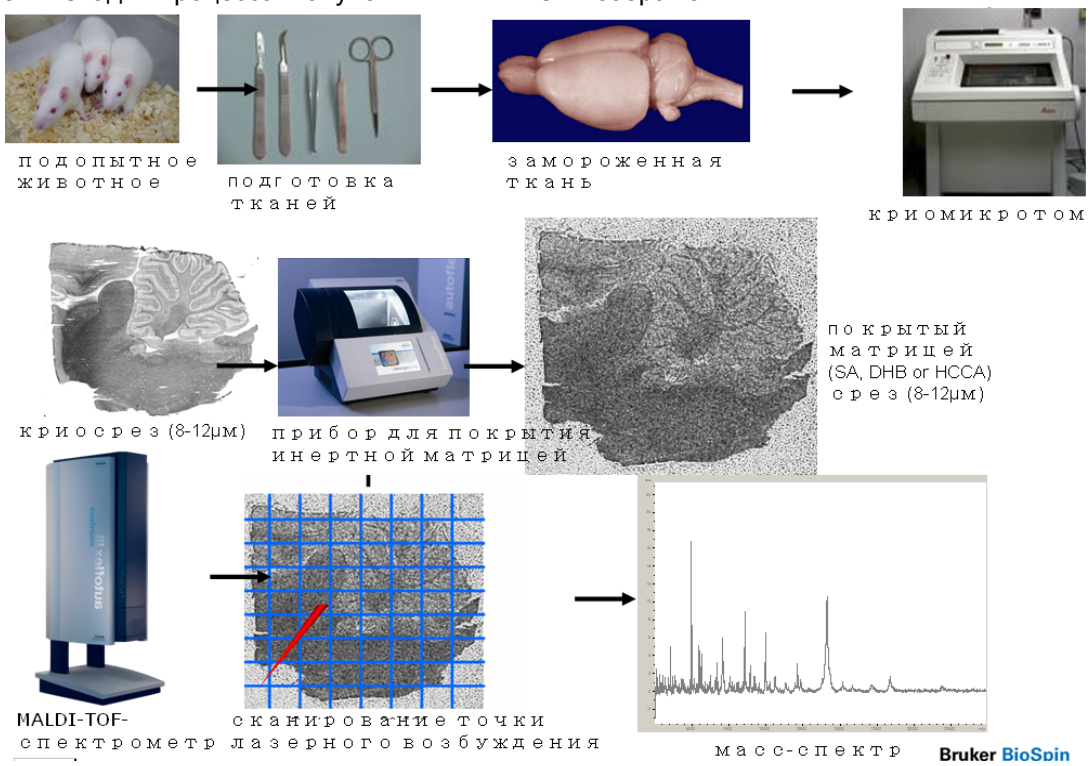


© Uwe Einchoff

При фрагментации (рис.6) рвутся исключительно пептидные связи и расстояния между пиками отражают массы отдельных аминокислот. Названия отдельных аминокислот указаны под спектрами (A:аланин, C:цистеин, D:аспартат, E:глутамат, F:фенилаланин, G:глицин,H:гистидин,I:изолейцин,K:лизин,L:лейцин,M:метионин,N:аспарагин, P:пролин, Q:глутамин,R:аргинин,S:серин,T:треонин,V:валин,W:триптофан,Y:тирозин). Массы всех 20 аминокислот известны, поэтому их можно читать прямо из спектров и таким образом определить первичную структуру протенина, т.е. аминокислотную последовательность.

Сканированием лазерного луча можно получить спектры разных точек образца и таким образом выбирая отдельные массы в спектре в качестве параметра изображения построить картину распределения отдельных протеинов в образце. Самим трудным шагом в получении MALDI-TOF-изображения является подготовка образца (рис.7). Из подопытного животного вырезается ткань, из которого после замораживания готовится криосрез толщины несколько микронов. Этот срез потом покрывается инертной матрицей методом вибрационного распыления. Это процесс тщательно контролируется детектором на базе светорассеяния. Большие капли приводят к хорошей экстракцией но к плохому разрешению, маленькие капли к слабой экстракци но к хорошему разрешению. И здесь мы имеем дело с свойственным практически всем аналитическим методам компромиссом между разрешением и чувствительностью.

Рис. 7 Стадии процесса получения MALDI-TOF-изображения



Эта трудоёмкая пробоподготовка, однако, окупается уникальной информацией, которая может быть получена из MALDI-TOF-изображений. Изображение мозга крысы (рис.8) по отдельным массам с разрешением 80 микронов показывает, какие протеины преимущественно встречаются в отдельных анатомических структурах мозга. Специфичность отдельных масс для разных анатомических структур уже указывает на то, что MALDI-TOF-спектры и полученные из них изображения могут быть использованы для поиска биомаркёров для разных заболеваний. Для терапии иногда требуется ещё более точная информация. Некоторые опухолы могут выглядеть одинаково в гистологии, но при этом могут вести себя совершенно по разному при химиотерапии. Литературные данные указывают на возможность их классификации с помощью MALDI-TOF

Рис.8 MALDI-TOF-изображение мозга крысы по отдельным массам (протеинам)

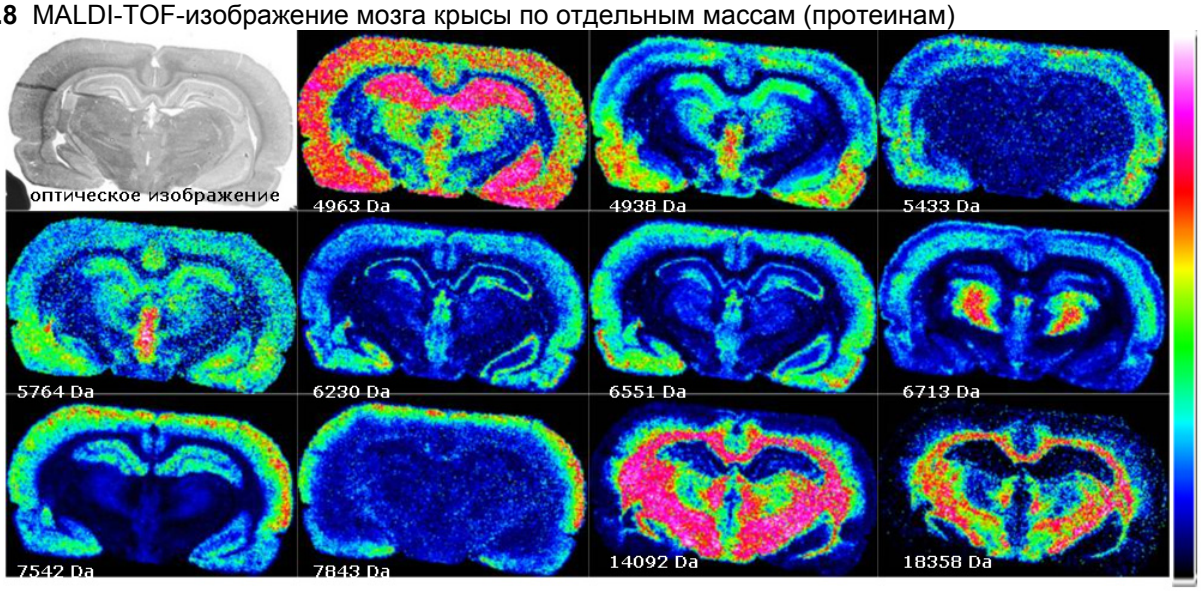
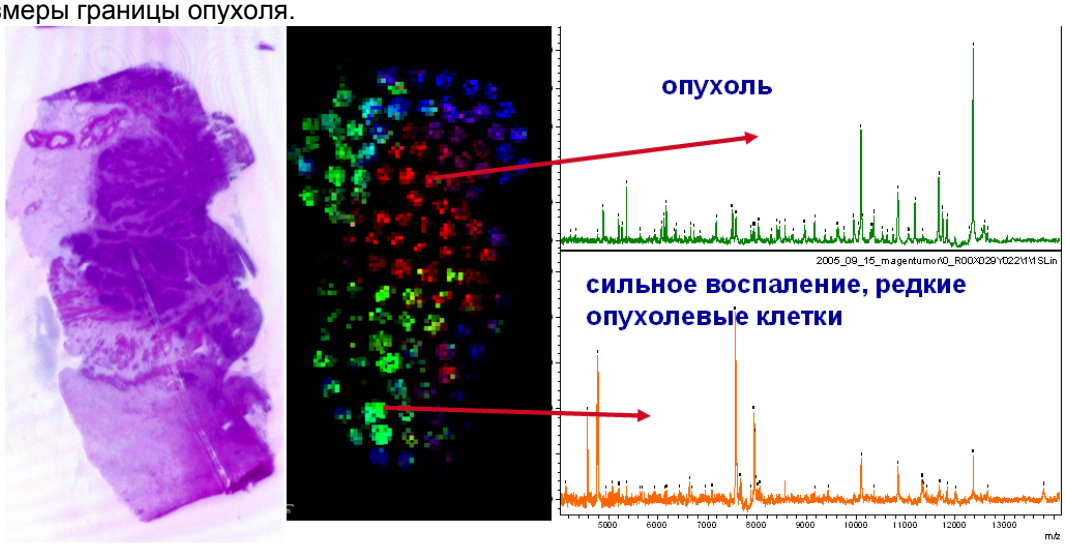


Рис.9: Ткани опухоли желудка. С*лева*:оптическое изображение с окраской гематоиленом (для ядра) и эозином (для цитоплазмы), *в середине*: MALDI-TOF-изображение *справа*: спектры MALDI-TOF-спектры опухелевых тканей желудка (рис.9,справа) сильно отличаются от спектров мукозных и эпителиальных тканей. Картина составленная из характерных для этих компонентов масс позволяет точно определить размеры границы опухоля.



Ярким примером может служить рак груди (рис.10). На некоторые опухоли практически не действует обычная химиотерапия. Это оносится к тем опухолям, в которых переэкспримируется поверхностный протеин Her2. Для этих Her2-положительных опухолей (Her2+) требуется особая весьма дорогая химиотерапия (примерно 30.000 Евро). Дифференциальный диагноз с помощью иммуно-окрашивания является очень ненадёжным. Поэтому любая дополнительная информация является крайне желательной. В MALDI-TOF-спектрах наблюдаются массы характерные для любой опухоли (красный цвет), но массы характерные для Her2-протеина (зелёный цвет) только в Her2-положительных опухолях (Her2+). Наложение обоих изображений показывает присутствие обоих типов опухолевых клеток в Her2+-опухоле (красные и зелёные цвета смешиваются в оранжевый). Этот пример показывает неоценимый вклад MALDI-TOF-изображения в дифференциальную диагностику опухоли и стратегию их лечения.

Другая область применения MALDI-TOF-изображения - это слежение за судьбой

© Uwe Einchoff

медпрепаратов в организме. При этом можно определить остаточную концентрацию действующего вещества и обнаружитиь следы его метаболитов.

Помимо клинической МР-томографии ЯМР-томография и ЯМР-ин виво-спектроскопия животных приобретает всё большее значение. Это связано с созданием животных моделей для многих человеческих заболеваний на базе трансгенных животных. Эти исследования ведутся на клеточном и иногда молекулярном уровнях и требуют предельного разрешения и высокой чувствительности, которые можно реализовать только на высоких магнитных полях.

Рис.10: Рак груди: гистологические и MALDI-TOF-изображения Her2-отрицательных (HER-) и Her2-положительных клеток (Her2+)-

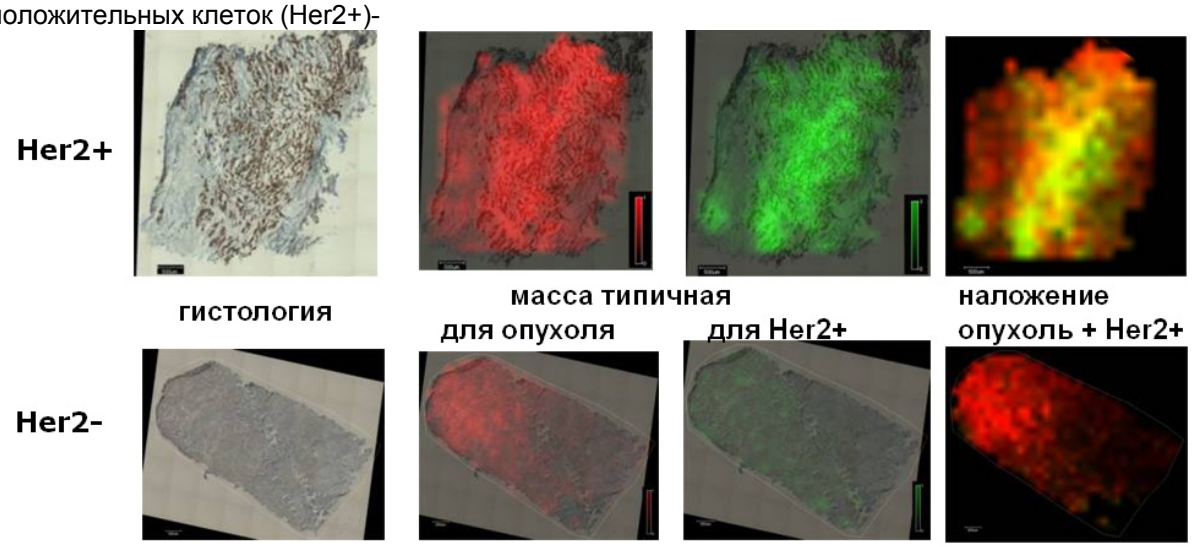


Рис.11 Датчик с восьмью сфазированными катушками и изображения полученные при 11.7 Тесла: мозг крысы, деталь мозжечка и время-пролётная ангиография мозга

Рис.12: изображения с разрешением 30□ полученные криодатчиком *слева*: сравнение с гистологическим срезом (Nissl-окрашивание). справа: мозг крысы

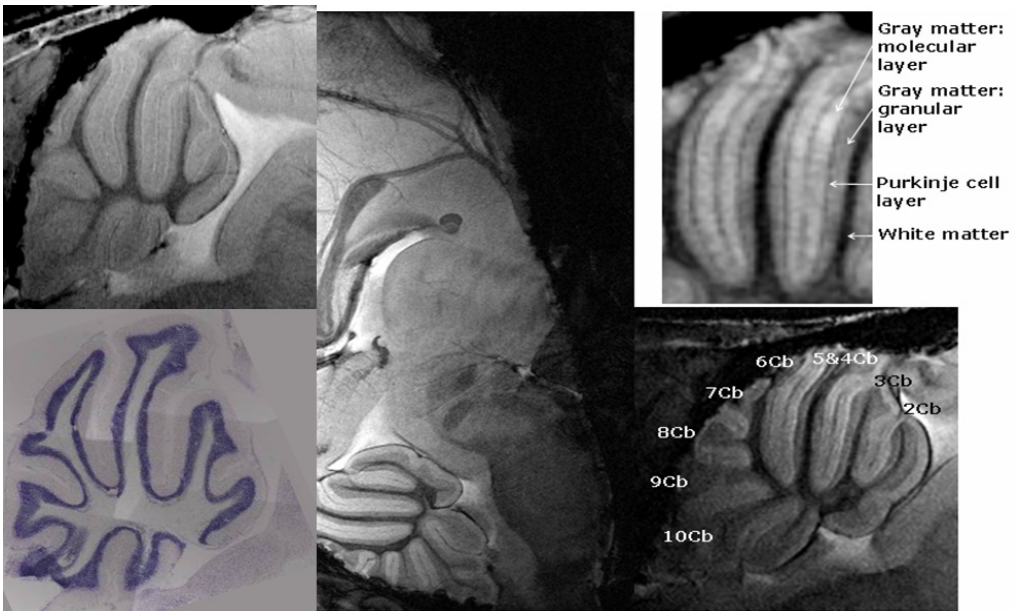


Рис.13: Слева: мозг крысы, функциональная томография с разрешением 80 микронов справа: изображение по тензору самодиффузии полученное с 15 направлениями градиента за 10 минут.

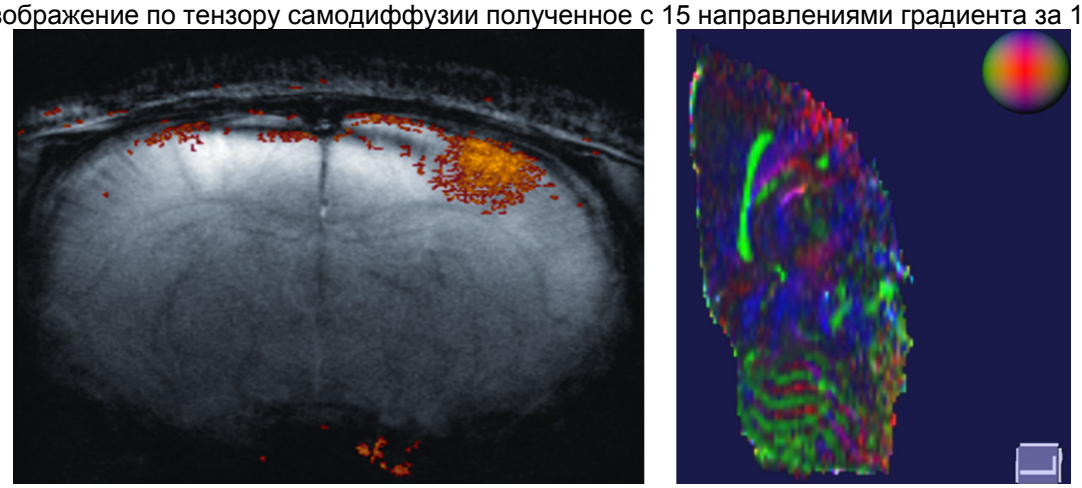


Рис.11 Показывает срезы мозга крысы толщины 1мм с разрешением 70x70 микронов в разных режимах при 11.7 Тесла, полученные датчиком с 16 сфазированными матричными катушками. Ещё более высокое чувствительность можно достигнуть с криодатчиком. При этом увеличение сигнала в два раза позволяет сократить время измерения в 4 раза или увеличить разрешение за то же время измерения.
Такие приборы на поля 11.7 и 16.4 Тесла были установлены в институтах общества Макса Планка в Тюбингене и Кёльне в Германии и рекордный прибор на 17.6 Тесла с тёплым отверстием 26см будет установлен в центре неврологических исследований в Париже.
Помимо новой универсальной для всех ЯМР-спектрометров (ЯМР высокого разрешения, твёрдое тело, ЯМР-томограф) электроники AVANCE III были разработаны новые датчики со сфазированными матричными катушками (phased array coils) , криодатчики, новые мощные блоки питания градиентов с коротким временем нарастания для оптимизации быстрых методов как эхо-планарная томография (EPI) и новая система ретроспективной синхронизации „Intragate“.

Разрешение в этих ин-виво-ЯМР-изображениях вполне может сравниться с гистологическим препаратом и позволяет в мозге крысы идентифицировать тончайшие структуры как отдельные слои в извилинах и Purkinje-волокна (рис.12).

Современные методы функциональной томографии и изображения по тензору самодиффузии требуют быстрых методов, которых можно реализовать лишь с мощными сверхбыстрыми градиентами (табл.2). Причём

© Uwe Einchoff

каждая градиентная система должна быть точно подобрана к свободному отверстию магнита.

Функциональная ЯМР-томография позволяет определить активированные участки мозга. При этом вычитаются изображения полученные до и после воздействия разных стимулов. Разница сигналов составляет лишь несколко процентов, но возрастает с напряжённостью магнитного поля. Такие исследования позволяют соотнести разные функции к разным анатомическим структурам мозга.

ЯМР также позволяет построить изображения по коэффициенту самодиффузии. Вдоль направления нервных волокон диффузия свободна, но перпендикулярно к ним она ограничена защитной миелиновой оболочкой и соответственно компоненты тензора диффузии отличаются. Изменяя направление импульсного градиента можно определить все компоненты тензора самодиффузии. Они отражают направление нервных волокон мозга. В рис.13 диффузия слева-направо показана зелёным цветом, сверху-вниз синим и перпендикулярно к плоскости изображения красным. Из этих изображений можно реконструировать направление нервных волокон.

Быстрые томографические методы также позволяют динамическое исследование кровотока. Эти опыты в мышах и крысах усложняются тем, что сердце у этих грызунов бётся примерно в 10 раз быстрее чем у человека. Только самые быстрые томографичексие методы позволяют наблюдения в реальном масштабе времени. При этих исследованиях важную роль играет бестриггерная ретроспективная синхронизация со сердечным циклом. После инъекции GdDTPA в кровяное русло можно проследить за прохождением контраста от правого желудочка правого предсердия через лёгочную артерию и обратно через лёгочную вену до левого желудочка левого предсердия и через коронарные сосуды до миокарда. (рс.14).

Рис.14: Слежение за прервым проходом контраста после инъекции GdDTPA

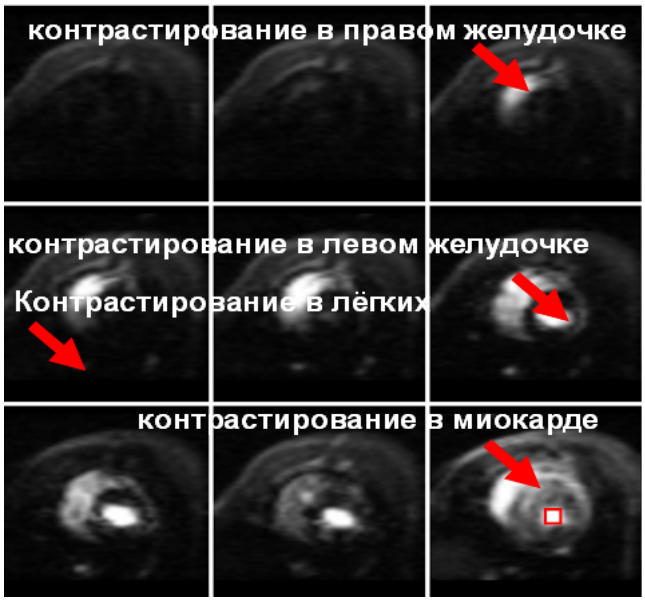


Табл.2 Градиентые системы и их параметры

тип	свободное отверстие	величина градиента	время нарастания
B-GA 20 S	20мм	300 мТ/м	1.080 Т/м/с
B-GA 12 S	12мм	675 мТм	4.670 Т/м/с
B-GA 9 S	9мм	750 мТ/м	6.750 Т/м/с
B-GA 6S	6мм	1.000 мТ/м	11.250 Т/м/с