

Jarosław Korczyński^{1,✉}

Katarzyna Kubiak²

Edyta Węglowska²

¹Centrum Doradztwa Naukowo-Badawczego Kawa.ska Sp. z o.o., Piaseczno

²Laboratorium Biotechnologii Molekularnej, Bionanopark Sp. z o.o., Łódź

✉Centrum Doradztwa Naukowo-Badawczego Kawa.ska Sp. z o.o., ul. Techniczna 5, 05-500 Piaseczno; tel.: 667 623 100; e-mail: jaroslaw.korczynski@kawaska.pl

Artykuł otrzymano 26 stycznia 2017 r.

Artykuł zaakceptowano 31 stycznia 2017 r.

Słowa kluczowe: Mikroskopia konfokalna, widmo Ramana, spektroskopia ramanowska, mikroskopia CARS

Wykaz skrótów: APD - ang. *Avalanche Photodiode*; CARS - ang. *Coherent anti-Stokes Raman Scattering*; GSD - ang. *Ground State Depletion*; HyD - ang. *Hybrid Detector*; NDDs - ang. *Non-Descanned Detectors*; NIR - ang. *Near Infrared*; PMT - ang. *Photo Multiplier Tube*; SHG - ang. *Second Harmonic Generation*; STED - ang. *Stimulated Emission Depletion*; SRS - ang. *Stimulated Raman Scattering*

STRESZCZENIE

Mikroskopia CARS (ang. *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*) jest metodą pozwalającą na kontrastowe obrazowanie niewybarwionych próbek: zarówno preparatów biologicznych jak również próbek w przemyśle spożywczym lub kosmetycznym. W mikroskopii tej światło z zakresu bliskiej podczerwieni generowane przez laser wchodzi w interakcję z wibrującymi cząsteczkami w próbce, co powoduje zmianę ich energii i emisję sygnału CARS. Sygnał ten jest wykorzystywany do specyficznej wizualizacji różnych frakcji cząsteczek w preparacie, dzięki temu możemy badać morfologię próbki jak i analizować jej skład. W niniejszym artykule pokazujemy niektóre zastosowania metody obrazowania CARS: obrazowanie kropeł tłuszczu wewnątrz komórek ludzkiej linii HaCaT oraz analizę składu produktów kosmetycznych. Możliwość wykonywania trójwymiarowych rekonstrukcji niewybarwionego materiału, jak również weryfikacji jego składu chemicznego, otwiera dla mikroskopii CARS drogę do wielu innych zastosowań w biologii i medycynie.

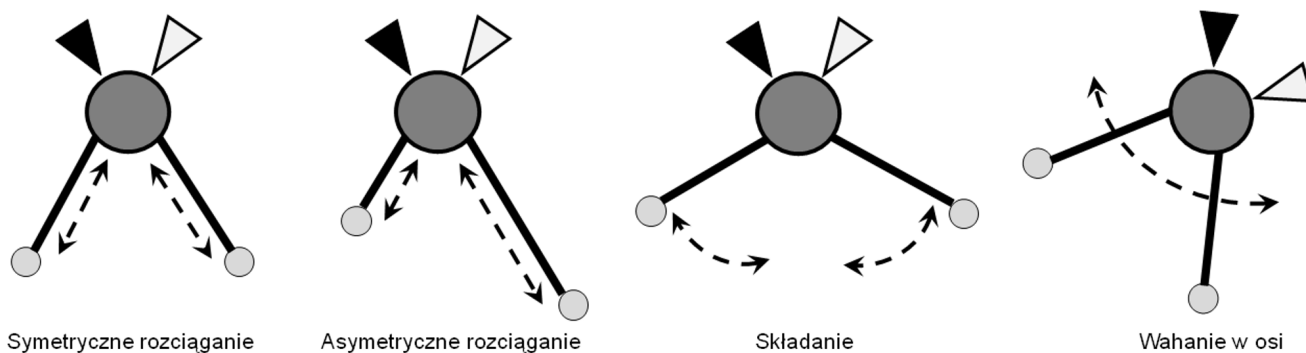
WPROWADZENIE

„Musisz z całych sił biec, aby pozostać w tym samym miejscu. Aby posuwać się naprzód, trzeba biec dwa razy szybciej”, te ciekawe słowa Czerwonej Królowej z książki „Alicja po drugiej stronie lustra” są aktualne nie tylko w książkowej Krainie Czarów Lewisa Carrolla, ale znajdują również potwierdzenie w świecie realnym, w dziedzinie nauki! Odkrycia dokonywane w różnych dziedzinach nauki nie tylko poszerzają naszą wiedzę na dany temat, ale również mogą pomóc w rozwoju technik badawczych, które pozwolą jeszcze szybciej posuwać się naprzód w tym pędzie do wiedzy. Wystarczy wspomnieć, że odkrycia z dziedziny chemii i fizyki związane z rozwojem mikroskopii fluorescencyjnej wysokiej rozdzielczości, za które w 2014 roku została przyznana Nagroda Nobla, są już powszechnie wykorzystywane w praktyce w postaci modułów mikroskopowych typu STED (ang. *Stimulated Emission Depletion*) czy GSD (ang. *Ground State Depletion*) [1]. Moduły te pozwalają na obrazowanie struktur biologicznych z rozdzielczością wyższą niż wynosił ustalony w XIX wieku teoretyczny limit rozdzielczości dla mikroskopii świetlnej. Przesuwanie sformułowanych wcześniej granic możliwości poznawania świata to niewątpliwie przykład tego „dwa razy szybszego biegu” z pierwszego zdania wstępu. Również tematem niniejszego artykułu będzie metoda, która obecnie pozwala przewyżczać kolejne ograniczenie mikroskopii świetlnej: potrzebę fluorescencyjnego znakowania materiału w mikroskopii konfokalnej.

CARS - PODSTAWY FIZYCZNE

Konwencjonalne techniki mikroskopii konfokalnej pozwalają tworzyć rekonstrukcje preparatów, jeśli wcześniej zostały one wybarwione specyficznymi sondami fluorescencyjnymi lub wykazują autofluorescencję. Ograniczenia wynikające z takich metod są oczywiste: barwniki fluorescencyjne często blakną z upływem czasu, a ich obecność może zakłócać subtelne procesy biochemiczne zachodzące w żywych komórkach, m.in. barwniki fluorescencyjne mogą być odpowiedzialne za powstawanie efektów fototoksycznych, a co za tym idzie wpływać na wynik eksperymentu. Co więcej, obecność fluorochromów może maskować ciekawe informacje w próbce prowadząc do powstawania nieprawidłowych wniosków [2]. Pewnym ograniczeniem w badaniach preparatów barwionych fluorescencyjnie jest również czasochłonne przygotowywanie próbek oraz brak dostępności odpowiednich barwników dla wszystkich typów próbek i eksperymentów.

Z pomocą w przewyżczeniu ograniczeń wynikających z obecności barwników w preparacie może przyjść technika CARS (ang. *Coherent anti-Stokes Raman Scattering*), wykorzystująca do obrazowania specyficzne wibracje charakteryzujące biomolekuly obecne w preparacie (Ryc. 1). W tym przypadku za kontra-



Rycina 1. Przykłady możliwych rodzajów wibracji cząsteczki CH_2 .

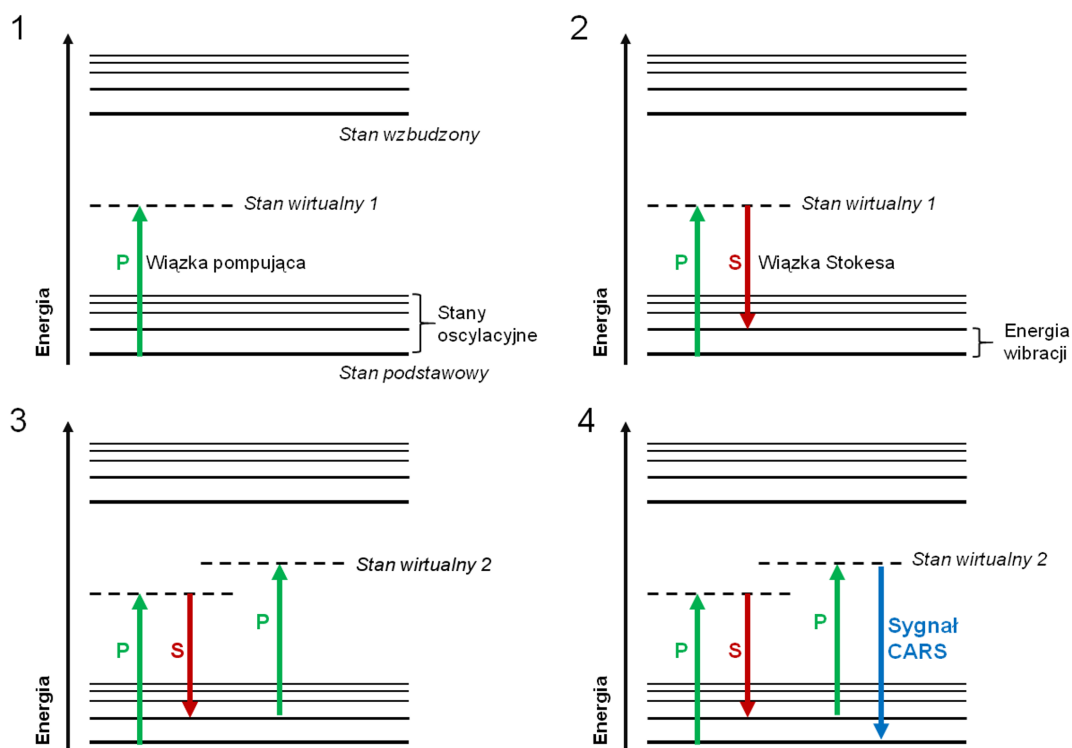
stowe uwidocznienie poszczególnych elementów próbki są odpowiedzialne już same cząsteczki tworzące tę próbkę, a nie molekuly fluorochromów dołączone do nich: czy to za pomocą przeciwciał, czy też, bezpośrednio, wiązaniami chemicznymi. Sam preparat nie wymaga w tej metodzie dodatkowych przygotowań i pozostaje prawie nie zmieniony. Nietoksyczna i małoinwazyjna technologia CARS otwiera nam więc nowe obszary zastosowań mikroskopu do analizy żywych komórek, małych zwierząt, czy też do badań materiałowych [3].

Sygnal CARS jest generowany poprzez wibrację cząsteczek wchodzących w skład danej próbki. Różne rodzaje cząsteczek mają indywidualne energie drgań, które mogą

być stymulowane za pomocą różnych długości fal (Tab. 1). Sygnal CARS jest generowany poprzez dwie impulsowe wiązki laserowe: wiązkę pompującą o krótszej długości fali oraz wiązkę Stokesa o dłuższej fali, obie wiązki światła muszą jednocześnie znaleźć się w punkcie na płaszczyźnie ogniskowej preparatu. Technologia CARS jest niemal wolna od zaburzających obrazowanie zjawisk, takich jak: transformacje elektronowe, wyświecanie czy formowanie stanów tripletowych cząsteczek, ponieważ zoptymalizowana konfiguracja systemów do tej techniki obejmuje wzbudzenie w bliskiej podczerwieni, które wykorzystuje mniejszą energię fotonów, niż energia potrzebna do wytworzenia przejść elektronowych [4]. Przykładowo, w dostępnych komercyjnie systemach [5] wiązka Stokesa ma stałą długość fali

Tabela 1. Przykładowe rodzaje związków, które mogą być obrazowane w komercyjnie dostępnym systemie CARS [5].

Związek	Tryb wibracji	Fala wzbudzająca [cm ⁻¹]
Alkilobenzeny	wibracje $\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}$	1205
Benzeny	wibracje pierścienia	1215
n-alkany	skręty i wibracje CH_2	1243
Cis-dialkylu etyleny	odkształcenia w płaszczyźnie CH	1261
n-alkany	CH_2 w fazie skrętu	1300
Trans-dialkylu etyleny	odkształcenia w płaszczyźnie CH	1302
Grupa izopropylowa	deformacje CH	1340
n-alkany	deformacje	1377
Naftaleny	rozciąganie pierścienia	1380
Antraceny	rozciąganie pierścienia	1400
n-alkany	deformacje CH_2	1460
n-alkany	deformacje CH_3	1466
Pochodne benzenu	rozciąganie pierścieni	1590
Aminy pierwszorzędowe	wibracje NH_2	1620
Cykliczne kwasy karboksylowe	symetryczne rozciąganie wiązania C=O	1652
Ketony alifatyczne	rozciąganie wiązania C=O	1713
Aldehydy alifatyczne	rozciąganie wiązania C=O	1730
Acetyleny alkilowe	rozciąganie wiązania C=O	2130
Nitryle alifatyczne	rozciąganie wiązania C=N	2242
Dialkilo-acetyleny	rozciąganie wiązania C=C	2266
Tiole	rozciąganie wiązania SH	2575
n-alkany	symetryczne rozciąganie CH_2	2855
n-alkany	symetryczne rozciąganie CH_3	2884
Pochodne benzenu	rozciąganie wiązania CH w pierścieniach aromatycznych	3050
Aminy pierwszorzędowe	rozciąganie NH_2	3380



Rycina 2. Podstawy fizyczne wzbudzenia w technice CARS. Sygnał CARS jest generowany poprzez wibracyjne ruchy cząsteczek w próbce. Różne rodzaje cząsteczek wykazują charakterystyczną dla nich energię drgań. Energia z fal elektromagnetycznych o odpowiedniej długości fali (podczerwień) wywołuje w cząsteczkach te drgania. (Rycina na podstawie literatury [5], zmieniona). Aby wygenerować wystarczająco silną energię drgań, ponad istniejący w preparacie szum, używana jest wiązka pompująca o regulowanej długości fali, która pobudza daną frakcję cząsteczek ze stanu podstawowego do stanu wirtualnego. Energia fotonu użytego do wzbudzenia musi być mniejsza niż różnica pomiędzy energią stanu podstawowego a pierwszego poziomu oscylacyjnego stanu wzbudzonego (a więc wymagane jest ustawienie odpowiedniej długości fali tej wiązki). Przy jednoczesnym oświetleniu cząsteczek przez drugą wiązkę światła (wiązkę Stokesa) o dłuższej fali, cząsteczka przechodzi ze stanu wirtualnego do żądanego stanu wibracyjnego. Ponieważ możemy regulować różnicę częstotliwości dwóch wiązek wzbudzających $\omega_{\Delta} = \omega_p - \omega_s$ (zwaną również rytmem częstotliwości) – możemy ten układ wzbudzający dopasowywać do pożądanej energii drgań cząsteczek, które chcemy zobrazować. Aby następnie zobaczyć sygnał pochodzący z wibrujących w danym miejscu molekuł, kolejny impuls z wiązki pompującej przenosi układ do drugiego energetycznego stanu wirtualnego $\omega_p + \omega_{\Delta}$. Z tej pozycji cząsteczka może już powrócić do stanu podstawowego emitując foton światła użyty do obrazowania ($\omega_{\text{CARS}} = \omega_p + \omega_{\Delta}$). Energia wyemitowanego fotonu jest większa od energii fotonów z wiązki pompującej – sygnał CARS jest przesunięty w kierunku niebieskiej części widma światła (przeciwnie do reguły Stokesa). Dzięki koherentnemu wzbudzeniu wibracji w cząsteczce – sygnał CARS jest około 10^3 razy silniejszy od sygnału generowanego przez konwencjonalne widmo Ramana. Za sprawą tego wzmocnienia możliwe jest nawet przyżyciowe obrazowanie w technice CARS z dużą prędkością odczytu.

1064 nm, natomiast długość fali wiązki pompującej jest regulowana w zakresie od 780 nm do 940 nm, w zależności od typu cząsteczki, której wibracje chcemy zobrazować. Jeśli różnica pomiędzy energią fotonów, tworzących te dwie wiązki światła, będzie odpowiadała energii drgań cząsteczek w próbce, powstanie silny sygnał CARS o długości fali krótszej, niż ma każda z wiązek użytych do wzbudzenia. Sygnał ten jest wykorzystywany do obrazowania (Ryc. 2). Jest on generowany tylko w płaszczyźnie ogniskowej obiektywu mikroskopu, co umożliwia, podobnie jak w mikroskopii konfokalnej, selektywne skanowanie poszczególnych przekrojów optycznych materiału i tworzenie trójwymiarowej wizualizacji próbki z rozdzielczością sub-komórkową (do około 350 nm).

WYMOGI SYSTEMU DLA TECHNIKI CARS

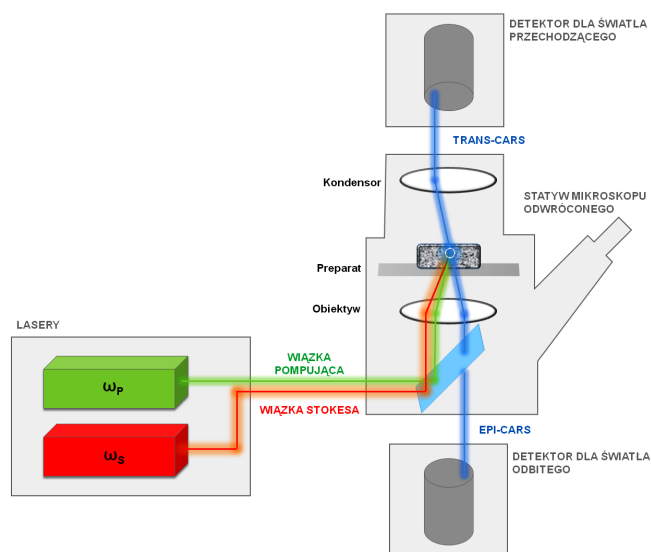
Aby wygenerować obraz CARS badanej próbki, należy użyć jako źródła światła dla mikroskopu idealnie skonfigurowanych wiązek laserowych o odpowiednich długościach fal. Praktyka wskazuje, że jak na razie, najlepszym źródłem światła dla tego typu zastosowań są pikosekundowe lasery impulsowe o regulowanej długości fali emisji w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). Emitują one światło, które ze

względu na długość fali (zwykle > 800 nm) oraz czas trwania impulsu (2–7 pikosekund) wykazuje niskie prawdopodobieństwo wywołania wzbudzenia wielofotonowego cząsteczek autofluorochromów w preparacie. Dzięki temu istnieje mniejsze ryzyko fotouszkodzeń badanego materiału, a otrzymany obraz CARS jest bardziej kontrastowy i posiada wysoki współczynnik sygnału do szumu [3]. Dodatkowo długofalowe światło podczerwone ulega mniejszemu rozproszeniu w próbce, a co za tym idzie umożliwia głębszą penetrację materiału. Systemy CARS pozwalają więc użytkownikowi badać większe próbki materiału o grubości do 300–500 μm , bez potrzeby ich wybarwienia (które przy tej wielkości preparatu może już powodować spore problemy), co otwiera szerokie możliwości aplikacyjne dla tej techniki [6].

Dla wygenerowania sygnału CARS molekuła, której wibracje chcemy wzbudzić i zarejestrować, musi zaabsorbować energię fotonów z dwóch różnych wiązek światła jednocześnie. Warunki dla powstania takiego zdarzenia istnieją jedynie w ognisku obiektywu o wysokiej aperturze numerycznej, gdzie gęstość fotonów jest największa, sygnał CARS będzie więc generowała tylko płaszczyzna

fokalna preparatu, o największej ostrości [4]. Taka sytuacja daje możliwość akwizycji sygnału CARS z poszczególnych warstw preparatu i wykonania trójwymiarowej rekonstrukcji próbki podobnie jak to ma miejsce w konwencjonalnej mikroskopii konfokalnej. O ile jednak w mikroskopii konfokalnej, przy jednofotonowym wzbudzeniu, należy użyć przysłony konfokalnej (ang. *pinhole*) dla odcięcia sygnału nie pochodzącego z płaszczyzny fokalnej preparatu, o tyle w mikroskopii CARS przysłona *pinhole* staje się niepotrzebna, gdyż sygnał w próbce nie jest już emitowany z warstw poza ogniskiem obiektywu [7]. W systemach CARS możemy więc prowadzić detekcję sygnału na zewnętrznych detektorach punktowych podłączonych bezpośrednio do statywu mikroskopu, jak najbliżej próbki, bez potrzeby angażowania dodatkowych elementów optycznych w skanerze mikroskopu (są to detektory NDDs, ang. *Non-Descanned Detectors*) [8]. Jako detektory NDDs można użyć konwencjonalnych detektorów PMT (fotopowielaczy), bądź też o wiele czulszych detektorów HyD będących hybrydą: fotopowielacza mającego fotokatodę wykonaną z arsenku galu (GaAsP) z fotodiodą lawinową (APD) [9]. Detektory NDDs mogą być umieszczone za obiektywem mikroskopu, analizując sygnał, który został zebrany przez obiektyw (*epi-CARS*) lub też za kondensorem, do detekcji sygnału, który przeszedł przez badany materiał (*trans-CARS*). Pierwsza konfiguracja (*epi*) sprawdza się lepiej przy analizie grubszych preparatów, tkanek lub nawet całych organizmów, podczas gdy druga (*trans*) doskonale nadaje się do badania cienkich próbek [3].

Wiązka pompująca (ω_p) i wiązka Stokesa (ω_s), generowane przez pikosekundowy system laserowy, są kierowane do próbki przez układ zwierciadeł dichroicznych. W próbce powstaje sygnał CARS (ω_{CARS}) o wyższej energii od wiązek światła wzbudzającego, który może być zbierany przez zewnętrzne detektory NDDs do światła przechodzącego (*trans-CARS*) lub dla światła odbitego (*epi-CARS*). Kolory użyte do zaznaczania wiązek na schemacie (Ryc. 3) są symboliczne – do wzbudzenia próbki używane jest niewidzialne dla człowieka światło podczerwone.



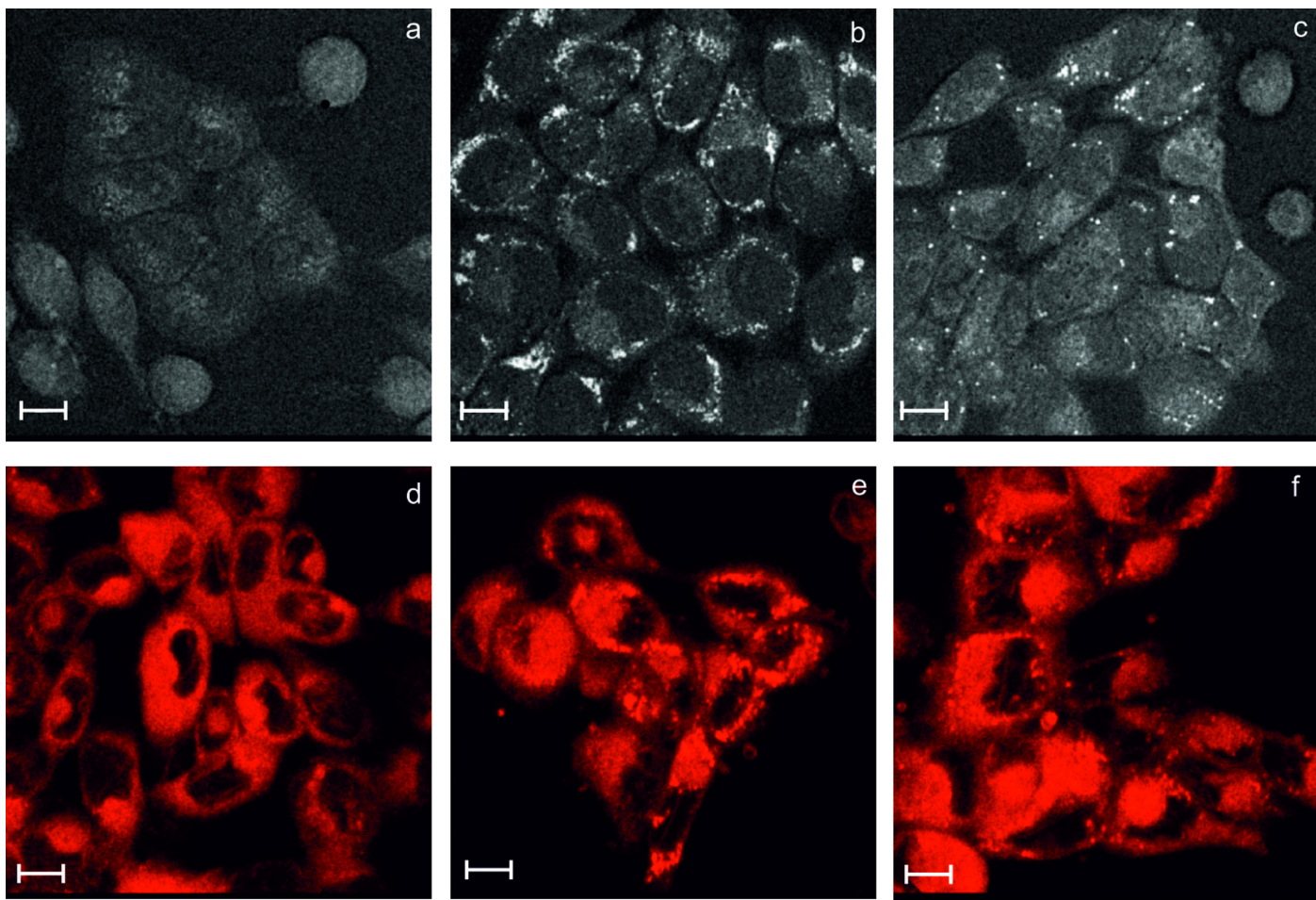
Rycina 3. Schemat wzbudzenia oraz detekcji sygnału CARS.

ZASTOSOWANIA CARS W BADANIACH BIOLOGICZNYCH

Ogromną zaletą mikroskopii CARS jest możliwość wizualizacji różnorodnych preparatów biologicznych, bez konieczności ich utrwalania czy znakowania struktur wewnątrzkomórkowych barwnikami fluorescencyjnymi. Dodatkowo, podobnie jak w obrazowaniu dwufotonowym, preparat pochłania sumarycznie niższą energię, skupioną jedynie w ograniczonym obszarze w płaszczyźnie ogniskowania. Ze względu na tę niską fototoksyczność możliwa staje się wydłużona, przyżyciowa obserwacja materiału biologicznego. Ponadto, w przeciwieństwie do wzbudzania fluorescencji, obserwuje się preparat w formie natywnej, bez zmian, które potencjalnie może wywołać proces przygotowania preparatu do obrazowania (utrwalenie i wybarwienie zwykle stosowane w mikroskopii konfokalnej). Z tego powodu technika CARS już cieszy się stosunkowo dużym zainteresowaniem w naukach biologicznych. Bardzo dobre wyniki uzyskuje się m.in. w badaniach lipidów, co pozwala np. na obrazowanie tkanek także w żywych organizmach (jako alternatywa dla tradycyjnej histologii).

W badaniach biologicznych najpowszechniej dotąd wykorzystywanym ustawieniem wiązki pompującej lasera jest wzbudzenie drgań wiązania C-H (przy częstotliwości ramanowskiej $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$), dzięki któremu jest możliwa wizualizacja obszarów o dużej koncentracji takich wiązań, a zatem przede wszystkim tłuszczowców [10]. W hodowlach komórkowych i badaniach tkanek obrazowanych przy takim ustawieniu modułu CARS, zwykle dobrze widoczne są struktury błoniaste, tj.: błona cytoplazmatyczna i otoczka jądrowa. Aparat Golgiego i siateczka endoplazmatyczna są natomiast trudniejsze do rozróżnienia, obserwowane częściej jako sygnał rozproszony w cytoplazmie (Ryc. 4). Pomimo, że obrazowanie CARS nie pozwala uzyskać np. wyraźnych linii cytoszkieletu, do jakich przyzwyczajeni są badacze stosujący wybarwienie fluorescencyjne aktywny, nadaje się znakomicie do obserwacji zmian w układzie pęcherzyków tłuszczu czy typowych struktur w głębokich warstwach tkanek. Technika CARS jako alternatywa dla badań histologicznych, możliwa do zastosowania *in vivo* budzi duże zainteresowanie i obok SRS (ang. *Stimulated Raman Scattering*) jest uważana za technikę nie tylko wnoszącą nowy wkład w zrozumienie biologii komórki, ale także możliwą do wykorzystania w przyszłości w bezinwazyjnej diagnostyce oraz w celu ewaluacji efektywności terapii [10].

Przykładem na zastosowanie mikroskopii CARS w badaniach tkanek może być obrazowanie siatkówki w mysim oku. W badaniach tych udało się uzyskać imponująco dokładny obraz 5 warstw zróżnicowanych komórek (od spójówki po fotoreceptory) bez specjalnego przygotowania preparatu [11]. W innych badaniach przetestowano możliwość obrazowania rogówki z całego oka myszy i oceniono przydatność techniki CARS do uzyskiwania obrazów porównywalnych z histologicznymi [12]. Podobnie satysfakcjonujące wyniki można uzyskać np. śledząc odróżnicowywanie komórek macierzystych w kierunku osteoblastów, przy czym wykorzystując inne częstotliwości ramanowskie uzyskiwano nie tylko sygnał uwidaczniający typowe struktury komórkowe ale także sygnał CARS od odkładanego hydroksyapatytu

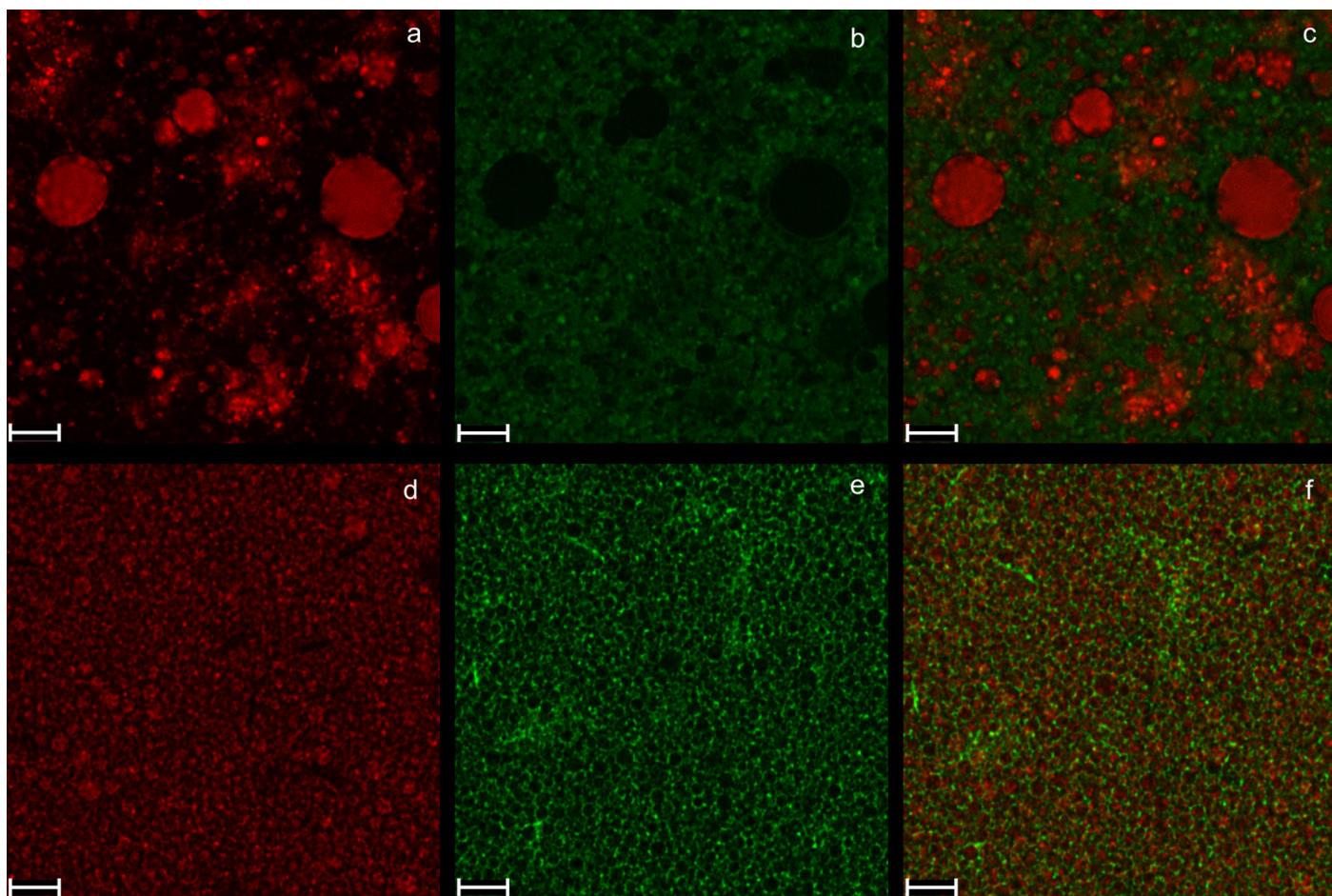


Rycina 4. Ludzkie keratynocyty (komórki linii HaCaT) stymulowane do gromadzenia kropeł tłuszczu przy pomocy kwasu oleinowego i SDS, obrazowane przy pomocy mikroskopii CARS (a, b, c) w porównaniu do obrazowania fluorescencyjnego po wybarwieniu NileRed (d, e, f). Keratynocyty linii HaCaT hodowano w DMEM o stężeniu glukozy 4,5 g/l, 1% FBS, 100 U/ml penicyliny, 100 μg/ml streptomycyny (37°C, 5% CO₂), komórki kontrolne – zdjęcia a, d; komórki inkubowane przez 48 godz. z kwasem oleinowym o roboczym stężeniu 300 μM – zdjęcia b, e; komórki inkubowane przez 20 godz. z SDS o końcowym stężeniu 15 μg/ml – zdjęcia c, f. Skala: 10 μm. Badania wykonano w Laboratorium Biotechnologii Molekularnej Bionanoparku w Łodzi z zastosowaniem laserowo skanującego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 z modulem CARS.

[13,14]. W ocenie stopnia regeneracji tkanek łącznych szczególnie często stosuje się także generowanie efektu drugiej harmonicznej (SHG, ang. *second harmonic generation*), które jest dostępne w systemach mikroskopii dwufotonowej takich jak CARS i uwidacznia strukturę równoległe tworzone przez prawidłowo odkładający się kolagen. Badania prowadzone na skórze wydają się szczególnie bliskie potencjalnemu wykorzystaniu techniki CARS komercyjnie, przez firmy kosmetyczne czy farmaceutyczne. Obecnie jest już możliwa ocena „stanu zdrowia” skóry z wykorzystaniem CARS [15]. Natomiast dzięki specjalnej konstrukcji stosowanego mikroskopu wykonywane jest także obrazowanie skóry myszy *in vivo* oraz śledzenie transportu przez nią np. oleju mineralnego [16]. Obrazowanie transportu konkretnego, niewyznaczonego fluorescencyjnie związku poprzez tkanki lub wręcz wewnątrz komórki to jedno z najatrakcyjniejszych potencjalnych zastosowań CARS. Jest ono teoretycznie możliwe, jednak w praktyce sukces podobnych badań zależy po pierwsze od istnienia odpowiedniego piku w widmie badanego związku, który nie nakładałby się na częstotliwości używane do obrazowania komórek oraz od lokalnego stężenia tego związku, aby siła sygnału była wystarczająca do uzyskania wyraźnego obrazu. Za przykład

badan z tej dziedziny może posłużyć obrazowanie CARS procesu wnikania leków w skórę świni [17].

Lipidy zgromadzone w postaci kropeł wewnątrz komórek są obserwowane w mikroskopii CARS jako wysoce kontrastowy, intensywny sygnał przy częstotliwości ramanowskiej ~2850 cm⁻¹ (Ryc. 4). W prezentowanym eksperymencie wywołano efekt gromadzenia kropeł tłuszczu wewnątrz ludzkich keratynocytów celem porównania możliwości obserwacji mikroskopowej przy pomocy CARS i barwienia fluorescencyjnego barwnikiem NileRed, powszechnie wykorzystywanego do określania ilości lipidów. Obrazowanie CARS ma przewagę nad barwieniem zarówno z punktu widzenia czasochłonności przygotowania preparatu jak i czytelności rozróżnienia poszczególnych kropeł tłuszczu z możliwością ich ilościowej oceny przy dalszej analizie uzyskanych obrazów (pomiar wielkości i zliczenie ilości) (Ryc. 4). Badanie dystrybucji i dynamiki tworzenia kropeł lipidowych wewnątrz adipocytów (komórek tłuszczowych) jest jednym z najczęściej publikowanych zastosowań biologicznych CARS. Widowiskowym przykładem takich badań są przyżyciowe analizy CARS w czasie rzeczywistym, których wyniki dostępne także w postaci filmów, ujawniły przebieg procesu tworzenia się i wchłaniania mniejszych



Rycina 5. Obrazowanie frakcji: lipidowej (zdjęcia a i d) i wodnej (zdjęcia b i e) w dwóch emulsjach z użyciem mikroskopii CARS. Badane produkty kosmetyczne to: krem ochronny do rąk (zdjęcia: a, b, c) i nawilżające mleczko do ciała (zdjęcia: d, e, f). Zastosowane częstotliwości ramanowskie: 2848 cm^{-1} dla frakcji tłuszczowej (a, d) oraz 3150 cm^{-1} dla frakcji wodnej (b, e). Zdjęcia c i f stanowią złożenie obrazów dla obu frakcji. Skala: $10\text{ }\mu\text{m}$. Badania wykonano w Laboratorium Biotechnologii Molekularnej Bionoparku w Łodzi z zastosowaniem laserowo skanującego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 z modulem CARS.

kropel lipidowych przez większe [18]. Inne prace świadczą natomiast, że ocena ilości kropeł tłuszczu zgromadzonych w komórkach wątroby przy pomocy CARS może stanowić bardziej czułą alternatywę dla tradycyjnych badań histologicznych wybarwianych preparatów tkanek. Przeprowadzono ocenę skrawków wątroby myszy w różnych stopniach zaawansowania stłuszczenia wątroby i pokazano, że obrazowanie CARS, w połączeniu z analizą intensywności sygnału pochodzącego od kropeł tłuszczu z użyciem programu ImageJ, pozwala na identyfikację wcześniejszych etapów rozwoju choroby niż tradycyjne metody histologiczne [19]. Możliwe jest też zastosowanie analizy ilości i rozkładu kropeł lipidowych w komórkach nowotworu piersi do oceny stopnia złośliwości komórek [20]. W tych badaniach wykorzystano fakt stopniowego zmniejszania się ilości tłuszczu gromadzonego wewnątrz komórek prawidłowych w miarę postępu procesu nowotworzenia. Innym przykładem możliwości rozróżnienia tkanki guza od otaczającej zdrowej tkanki, na podstawie niższej zawartości tłuszczu, uwidacznianej przez technikę CARS jako ciemniejsze obszary preparatu tkankowego, są badania mózgowia myszy z zaindukowanymi ludzkimi guzami glejaka, czerniaka i raka piersi [21]. Uzyskane obrazy mają rozdzielczość porównywalną z klasycznie barwionymi preparatami, a nawet pozwalają na

rozróżnienie pojedynczych komórek na granicy guz/zdrowa tkanka.

Obrazowanie żywych komórek z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej z modulem CARS otwiera przed badaczami specjalizującymi się w inżynierii tkankowej wcześniej niedostępną możliwość monitorowania procesu integracji komórek z trójwymiarowym rusztowaniem w czasie rzeczywistym, bez ingerencji w próbkę [22]. W cytowanych badaniach uzyskano także sygnał drugiej harmonicznej pochodzący od włóknistego biomateriału zastosowanego jako rusztowanie (ang. *scaffold*). Jedynym warunkiem, jaki musi spełnić badana w ten sposób trójwymiarowa hodowla komórkowa to przejrzystość materiału. Jeżeli preparat przepuszcza promieniowanie możliwe jest wykonanie skanu w osi Z w głąb testowanego rusztowania z wrastającymi komórkami na głębokość nawet do $500\text{ }\mu\text{m}$, co zostało osiągnięte podczas obrazowania procesu wrastania neurytów w hydrożel GAG [23]. Jeżeli eksperyment jest wykonywany w odpowiednich naczynkach hodowlanych (o dnie szklanym grubości szkiełka nakrywkowego) po wykonaniu obrazowania komórki mogą nadal być hodowane i monitorowane w kolejnych odstępach czasu bez wpływu na badaną próbkę nawet przez 8 tygodni.

Tabela 2. Obszary potencjalnych zastosowań mikroskopii CARS.

Dziedzina	Przykład możliwych badań
Diagnostyka medyczna	histologia na nieutralizowanej preparacie; ocena stopnia zaawansowania stłuszczenia wątroby; ocena z rozdzielczością komórkową granicy tkanki zmienionej nowotworowo; zmiany skórne; choroby neurodegeneracyjne
Nowotwory	gęstość jądra komórkowego, rozproszenie związków o znanych pasmach ramanowskich w komórkach, stopień zaawansowania procesów nowotworowych w komórkach z biopiatu
Neurologia	mechanizmy transdukcji sygnału, analizy błon, zawartość lipidów w mózgu
Dermatologia	transport i metabolizm lipidów i substancji czynnych w skórze, diagnostyka nowotworów, szlaki sygnałowe transportu przez skórę, dobór formulacji produktów (np. emulsji) do leczenia i pielęgnacji skóry
Choroby cywilizacyjne	cukrzyca, otyłość, choroby kardiologiczne, choroby związane z zaburzeniami procesów gromadzenia kropeł lipidowych wewnątrz komórek (np. stłuszczenie wątroby)
Inżynieria tkankowa	monitorowanie procesu wrastania komórek w materiał stanowiący rusztowanie 3D przez długi czas hodowli; ocena prawidłowości odtworzenia typowych struktur tkankowych, analiza procesu różnicowania komórek macierzystych (np. w kierunku osteoblastów)
Nauki farmaceutyczne	mechanizmy transportu leków, analiza toksykologiczna, szlaki sygnałowe lipidów, oddziaływania pomiędzy związkami, rozwój właściwej formulacji produktów zdrowotnych w postaci emulsji
Przemysł spożywczy	skład żywności, zawartość i rozproszenie tłuszczu, rozwój nowych składników żywności, kontrola jakości żywności, opracowywanie nowych dodatków do żywności poprawiających np. trwałość emulsji czy konsystencję produktu
Przemysł kosmetyczny	badanie kondycji skóry po aplikacji produktów kosmetycznych, dobór właściwego składu produktu dla uzyskania odpowiedniej konsystencji (emulsje), kontrola wpływu składników preparatów kosmetycznych na komórki w czasie długotrwałej ekspozycji

ZASTOSOWANIA CARS W BADANIACH (BIO)MATERIAŁOWYCH

Do jednych z pierwszych opisanych zastosowań techniki CARS należą analizy struktury emulsji typu WOW (water-oli-water) [24], a także zastosowanie jej do rozróżniania nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych w olejach wchłoniętych przez adipocyty [25]. Drugie z wymienionych osiągnięć jest szczególnie atrakcyjne w badaniach metabolizmu tłuszczowców, a zostało zrealizowane poprzez analizę zmian stosunku intensywności sygnałów uzyskanych dla wibracji wiązania C-H (silny sygnał przy częstotliwości 2850 cm^{-1}) i wiązania =C-H (słaby sygnał przy częstotliwości około 3015 cm^{-1}) [25].

Obserwacja rozmieszczenia przestrzennego tłuszczu w emulsjach może okazać się interesująca z praktycznego punktu widzenia – np. dla przemysłu spożywczego czy kosmetycznego podczas opracowywania formulacji nowych produktów. Wielkość i stopień jednorodności kropeł tłuszczu ma wpływ na konsystencję, a zatem właściwości organoleptyczne produktu. Natomiast np. zawartość frakcji tłuszczowej w stosunku do frakcji wodnej zmienia przeznaczenie kosmetyku. Ewidentne różnice w strukturach wewnętrznych dwóch emulsji uwidocznione przy pomocy CARS (Ryc. 5) dobrze odzwierciedlają odmienne funkcje, jakie mają spełniać badane produkty (porównano ochronny krem do rąk z nawilżającym mleczkiem do ciała).

Innym aspektem badań biologicznych na styku z materiałowymi jest śledzenie losu cząsteczek, w tym nanocząsteczek, podawanych do hodowli komórkowych bez ko-

nieczności chemicznej modyfikacji badanych związków polegającej na dodaniu ugrupowań fluoroforowych, których obecność może w sposób znaczący wpływać na transport przez błonę komórkową i końcową lokalizację wewnątrz komórki. Przykładowo, przy pomocy mikroskopii CARS dowiedziono możliwości wnikania nanodiamentów do wnętrza komórek HeLa [26].

Dotychczas nieliczne są prace wykorzystujące mikroskopię CARS w badaniach komórek roślinnych, ale powstało dość obszerne opracowanie dotyczące obrazowania materiałów pochodzenia roślinnego: skrobi oraz włókien bawełny [27], co poszerza możliwości zastosowania tego sposobu charakteryzowania próbek spożywczych czy tekstylnych. Konfokalna mikroskopia CARS jest również wykorzystywana w badaniach materiałowych sensu stricto – np. do obrazowania trójwymiarowej sieci porowatej membrany PVDF optymalizowanej do zastosowania np. w bateriach litowo-jonowych [28], zatem zainteresowanie tą techniką przekracza nauki pokrewne biologii i biochemii.

Podsumowując, dotychczasowe zastosowania mikroskopii CARS w badaniach biologicznych i (bio)materiałowych świadczą o dużym potencjale techniki i w najbliższym czasie należy spodziewać się poszerzenia listy znanych aplikacji CARS, jaka została przedstawiona w Tabeli 2. Mamy nadzieję, że do pomnożenia znanych aplikacji CARS przyczyni się dostępność pierwszego takiego systemu w Polsce w Bionanoparku w Łodzi. Możliwa jest współpraca z Laboratorium Biotechnologii Molekularnej zarówno na zasadach komercyjnych jak i naukowych.

PODSUMOWANIE

Nauka ciągle rozwija się, biegnie, wymykając się utartym schematom. Być może wykorzystanie widm Ramana w generowaniu obrazów niewyznakowanych cząsteczek w preparacie otworzy furtkę do zupełnie nowego działu mikroskopii? Istnieją niewątpliwe zalety tego typu obrazowania [3], które można podsumować w kilku punktach:

1. Przede wszystkim technologia CARS pozwala na obrazowanie próbek z wykorzystaniem kontrastu tworzonego na podstawie wewnętrznych drgań molekularnych próbki. Eliminuje to potrzebę stosowania zewnętrznych znaczników fluorescencyjnych oraz zmniejsza możliwość występowania efektów fototoksycznych w preparacie.
2. Technologia Coherent Anti-Stokes Raman Scattering zapewnia 10^5 razy silniejszy sygnał niż analogiczny, spontaniczny sygnał z widma Ramana generowany przez wibrację cząsteczek. Pozwala to na szybszą akwizycję obrazów w mikroskopie, a więc również obserwację żywych próbek biologicznych w czasie rzeczywistym.
3. Sygnał CARS emitowany przez próbkę ma większą energię, niż wiązki fali wzbudzającej (jest więc przeciwny do reguły Stokesa). Stąd też jego detekcja odbywa się przy krótszych długościach fali co eliminuje nakładanie się sygnału CARS z sygnałem z fluorescencji wzbudzanych cząsteczek.
4. Nieliniowy charakter wzbudzania sygnału CARS powoduje jego generowanie tylko w płaszczyźnie ogniskowej obiektywu. To z kolei daje możliwość tworzenia sekcji optycznych i trójwymiarowej rekonstrukcji preparatu.
5. Światło podczerwone (NIR) użyte do wzbudzania sygnału CARS mniej rozprasza się w próbce i może ją penetrować do głębokości 0,5 mm. Technika CARS nadaje się więc do analizy grubszych preparatów.

Należy również wspomnieć o istniejących obecnie ograniczeniach mikroskopii CARS, które trzeba jeszcze przezwyciężyć, m.in.:

1. Ograniczona liczba rodzajów cząsteczek, które mogą być modułem CARS wzbudzane – praca nad źródłami światła o szerszym zakresie emitowanych długości fal światła powinna pomóc poszerzyć tę listę.
2. Rozdzielczość powstałego w technice CARS obrazu obecnie wynosi powyżej 350 nm – w dobie mikroskopów superrozdzielczych (rozdzielczość poniżej 200 nm) nie jest to technika umożliwiająca dokładną rejestrację morfologii nanometrowych organelli komórkowych. Z drugiej jednak strony rozdzielczość ta jest zupełnie wystarczająca do analizy materiałowej większych próbek czy grubszych fragmentów tkanek.
3. Technika CARS wymaga wykonywania dokładnej kalibracji wiązek wzbudzających dla pikosekundowych laserów NIR. Są już jednak obecnie na rynku komercyjne systemy do obrazowania CARS dostępne jako moduł dla

laserowego mikroskopu konfokalnego [5] z intuicyjnym oprogramowaniem sterującym, które może maksymalnie uprościć procedurę akwizycji obrazu CARS.

Pomimo jednak tych ograniczeń postępy jakie dokonały się w ostatniej dekadzie w rozwoju techniki CARS stawiają ją w gronie najnowocześniejszych i dobrze rozwijających się technik mikroskopowych. Możliwość wykonywania trójwymiarowych rekonstrukcji niewybarwionego badanego materiału, jak również weryfikacji jego składu chemicznego, otwiera dla tej techniki drogę do wykorzystania w biologii i medycynie i analizie materiałowej. W tej pracy wymieniono jedynie niektóre z zastosowań tej techniki. Należy obecnie liczyć na kreatywność i innowacyjność badaczy, którzy znajdą dla metody CARS wiele innych, nawet niekonwencjonalnych i trudnych do przewidzenia zastosowań.

PIŚMIENNICTWO

1. Lalkens B, Testa I, Willig KI, Hell SW (2012) MRT letter: Nanoscopy of protein colocalization in living cells by STED and GSDIM. *Microsc Res Tech* 75: 1-6
2. Mullins JM (1994) Overview of fluorophores. *Methods Mol Biol* 34: 107-116
3. Evans CL, Xie XS (2008) Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. *Annu Rev Anal Chem* 1: 883-909
4. Rodriguez LG, Lockett SJ, Holtom GR (2006) Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy: a biological review. *Cytometry A* 69: 779-791
5. Degenhartt S (2011) An introduction to CARS microscopy. Leica Science Lab <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/an-introduction-to-cars-microscopy/>
6. Ganikhanov F, Carrasco S, Xie XS, Katz M, Seitz W, Kopf D (2006) Broadly tunable dual-wavelength light source for Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt Lett* 31: 1292-1294
7. Korczyński J (2013) Nowy wymiar mikroskopii – skanujący laserowy mikroskop konfokalny. *Kosmos* 299: 149-160
8. Cheng JX (2007) Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy. *Appl Spectrosc* 61: 197-208
9. Suyama M, Lares M (2008) Photomultipliers: Hybrid detector combines PMT and semiconductor-diode technologies. *Laser Focus World* 44
10. Cheng J-X, Xie XS (2015) Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine. *Science* 350: aaa8870
11. Masihzadeh O, Ammar DA, Kahook MY, Lei TC (2013) Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS) microscopy: a novel technique for imaging the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 3094-3101
12. Ammar DA, Lei TC, Kahook MY, Masihzadeh O (2013) Imaging the intact mouse cornea using Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 5258-5265
13. Hofemeier AD, Hachmeister H, Pilger C, Schürmann M, Greiner JF, Nolte L, Sudhoff H, Kaltschmidt C, Huser T, Kaltschmidt B (2016) Label-free nonlinear optical microscopy detects early markers for osteogenic differentiation of human stem cells. *Sci Rep* 6: 26716
14. Moura CC, Tare RS, Oreffo RO, Mahajan S (2016) Raman spectroscopy and Coherent anti-Stokes Raman Scattering imaging: prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration. *J R Soc Interface* 13
15. Breunig HG, Bückle R, Kellner-Höfer M, Weinigel M, Lademann J, Sterry W, König K (2012) Combined *in vivo* multiphoton and CARS imaging of healthy and disease-affected human skin. *Microsc Res Tech* 75: 492-498
16. Evans CL, Potma EO, Puoris'haag M, Cote D, Lin CP, Xie XS (2005) Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy. *PNAS* 102: 16807-16812

17. Belsey NA, Garrett NL, Contreras-Rojas LR, Pickup-Gerlaugh AJ, Price GJ, Moger J, Guy RH (2014) Evaluation of drug delivery to intact and porated skin by Coherent Raman Scattering and fluorescence microscopies. *J Control Release* 174: 37-42
18. Paar M, Jüngst C, Steiner NA, Magnes C, Sinner F, Kolb D, Lass A, Zimmermann R, Zumbusch A, Kohlwein SD, Wolinski H (2012) Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes. *J Biol Chem* 287: 11164-11173
19. Le TT, Ziembra A, Urasaki Y, Brotman S, Pizzorno G (2012) Label-free evaluation of hepatic microvesicular steatosis with multimodal Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy. *PLoS ONE* 7: e51092
20. Potma EO (2010) Tissue Imaging with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy, W: Gokulakrishnan S (red) *Vibrational Spectroscopic Imaging for Biomedical Applications*. McGraw-Hill Professional, AccessEngineering, New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sydney, Toronto, str. 319-342
21. Uckermann O, Galli R, Tamosaityte S, Leipnitz E, Geiger KD, Schackert G, Koch E, Steiner G, Kirsch M (2014) Label-free delineation of brain tumors by Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy in an orthotopic mouse model and human glioblastoma. *PLoS ONE* 9: e107115
22. Brackmann C, Esguerra M, Olausson D, Delbro D, Krettek A, Gatenholm P, Enejder A (2011) Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy of human smooth muscle cells in bioengineered tissue scaffolds. *J Biomed Opt* 16: 021115
23. Conovaloff A, Wang H-W, Cheng J-X, Panitch A (2009) Imaging growth of neurites in conditioned hydrogel by coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *Organogenesis* 5: 231-237
24. Meyer T, Akimov D, Tarcea N, Chatzipapadopoulos S, Muschiolik G, Kobow J, Schmitt M, Popp J (2008) Three-dimensional molecular mapping of a multiple emulsion by means of CARS microscopy. *J Phys Chem B* 112: 1420-1426
25. Heinrich C, Hofer A, Ritsch A, Ciardi C, Bernet S, Ritsch-Marte M (2008) Selective imaging of saturated and unsaturated lipids by wide-field CARS-microscopy. *Opt Express* 16: 2699-2708
26. Pope I, Payne L, Zorinants G, Thomas E, Williams O, Watson P, Langbein W, Borri P (2014) Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy of single nanodiamonds. *Nat Nanotechnol* 9: 940-946
27. Slepko AD, Ridsdale A, Pegoraro AF, Moffatt DJ, Stolow A (2010) Multimodal CARS microscopy of structured carbohydrate biopolymers. *Biomed Opt Express* 1: 1347-1357
28. Jeschke S, Mutke M, Jiang Z, Alt B, Wiemhöfer HD (2014) Study of carbamate-modified disiloxane in porous PVDF-HFP membranes: new electrolytes/separators for lithium-ion batteries. *Chemphyschem* 15: 1761-1771

Watching dance of the molecules - CARS microscopy

Jaroslav Korczynski^{1,✉}, Katarzyna Kubiak², Edyta Wegłowska²

¹Scientific Research Advisory Centre Kawa.ska Sp. z o.o. 5 Techniczna St., 05-500 Piaseczno, Poland

²Molecular Biotechnology Laboratory, Bionanopark Sp. z o.o., 114/116 Dubois St., 93-465 Lodz, Poland

✉e-mail: jaroslav.korczynski@kawaska.pl

Key words: Confocal microscopy, Raman spectrum, Raman spectroscopy, CARS microscopy

ABSTRACT

CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) microscopy is an imaging method for living cells visualization as well as for food or cosmetics material analysis without the need for staining. The near infrared laser source generates the CARS signal - the characteristic intrinsic vibrational contrast of the molecules in a sample which is no longer caused by staining, but by the molecules themselves. It provides the benefit of a non-toxic, non-destructive and almost noninvasive method for sample imaging. CARS can easily be combined with fluorescence confocal microscopy so it is an excellent complementary imaging method. In this article we showed some of the applications for this technology: imaging of lipid droplets inside human HaCaT cells and analysis of the composition of cosmetic products. Moreover we believe, that soon new fields of application become accessible for this rapidly developing branch of microscopy.