

УДК 61:57.086+615.84

МЕТОД КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

© 2013 В. П. Захаров¹, Л. Т. Волова², П. Е. Тимченко¹,
Е. В. Тимченко¹, В. В. Болтовская², В. В. Россинская²

¹Самарский государственный аэрокосмический университет
имени академика С.П. Королёва (национальный исследовательский университет)

²Институт экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ, г. Самара

Показано применение метода конфокальной лазерной микроскопии в оценке жизнеспособности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга кролика с разрешением не менее 400 нм. Получена трёхмерная структура клеток с помощью данного метода.

Конфокальная микроскопия, лазерная флуоресценция, контрастность, шум, культура мезенхимальных стромальных клеток (МСК), костный мозг кролика.

Введение

Одной из актуальных и недостаточно разработанных проблем современной артрологии является диагностика больных с локальными травматическими повреждениями и заболеваниями суставного хряща [1-2]. Данные явления сложно прогнозировать на этапе изготовления имплантата. Следовательно, для обеспечения качества операции трансплантации необходим динамический контроль процесса остеоинтеграции, который, в свою очередь, должен быть неразрушающим и обеспечивать разрешение на клеточном уровне. В настоящее время возрастает потребность в продуктах регенераторной медицины – тканеинженерных конструкциях, содержащих в своём составе живые клетки. В связи с этим возникла настоятельная необходимость разработки комплексных методов оценки качества и эффективности таких материалов [3].

Традиционные оптические методы визуализации тканей и клеток – световая микроскопия не обладают должным разрешением, т.к. биологическая ткань является сильно рассеивающей средой [4,5]. Нивелировать данные недостатки возможно за счёт перехода к методу конфокальной микроскопии, который способен обеспечить увеличение контраста изображения за счёт применения сфокусирован-

ного излучения и диафрагмирования рассеянного излучения в плоскости наблюдения.

Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200:1 и их локализацию как в плоскости объекта, так и вдоль оптической оси. Дальнейшее увеличение контраста возможно за счёт эффекта лазерной флуоресценции, используя либо естественные флуорофоры биологической ткани, либо специальные окрашивающие вещества. Следует отметить, что метод флуоресцентной микроскопии обладает более низким разрешением по сравнению с электронной или атомно-силовой микроскопией. Однако, в отличие от последних, он позволяет наблюдать не только за внутренней микроструктурой клеток, но и даёт информацию о пространственном расположении исследуемого объекта. Благодаря этому флуоресцентная микроскопия оказалась оптимальным методом объёмной визуализации с последующим изучением тонкой организации и механизмов функционирования организмов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях [6-8].

Действительно, изменение структурных клеточных характеристик под действием различных факторов как нега-

тивного, так и позитивного характера сопровождается изменением оптических характеристик тканей, что позволяет использовать данный факт для контроля динамики их состояния.

Цель исследования – осуществить динамический контроль жизнеспособности МСК костного мозга кролика *in vitro* методом конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии.

Материалы и методы исследования

В работе использованы 28 разнополых кроликов породы «Шиншилла» массой 2,5-3кг. Забор костного мозга проводили в стерильных условиях с соблюдением правил асептики и антисептики под наркозом путем пунктирования гребня подвздошной кости. Полученный костный мозг разбавляли в соотношении 1:1 раствором гепарина и направляли в лабораторию культуры клеток животных, где по

стандартным методикам клетки выделяли и получали культуру. МСК четвертого пассажа переседали в культуральные чашки Петри (Orange Scientific, Бельгия) из расчёта $5,0 \times 10^3$ кл/см² с добавлением модельной среды альфа-МЕМ (Биолот, Россия) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия).

Клетки исследовали с помощью экспериментального стенда [9-10], который был реализован на базе конфокального оптического микроскопа и лазерного комбайна (ANDOR) (скорость сканирования до 25 слоёв в секунду). Стенд обеспечивал два режима микросъёмки: режим конфокальной микроскопии в видимом свете и режим лазерной флуоресценции (рис. 1). В первом случае в качестве источника излучения использовали широкополосный источник (галогеновая лампа), а во втором – лазерные излучатели мощностью 100 мВт (с возможностью управления с шагом 0,1 мВт) на длинах волн 488 нм и 561 нм.

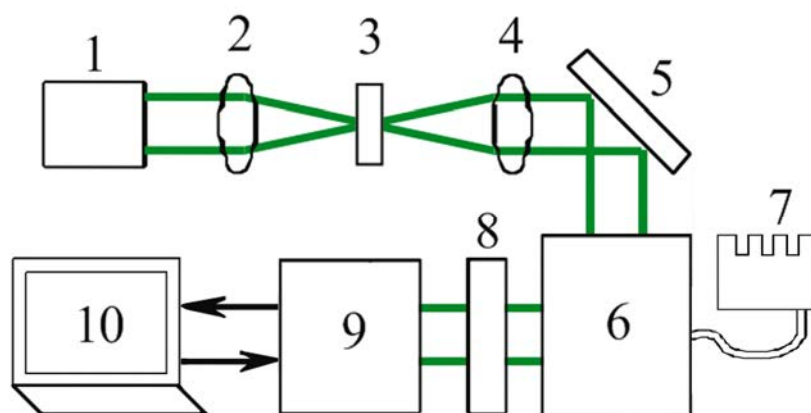


Рис. 1. Экспериментальный стенд флуоресцентной конфокальной микроскопии: 1 – источник видимого света (галогеновая лампа), 2 – коллиматор, 3 – объект, 4 – объектив, 5 – поворотное зеркало, 6 – конфокальный сканирующий блок, 7 – лазерный блок, 8 – блок фильтров, 9 – камера, 10 – компьютер

В режиме конфокальной микроскопии свет от галогеновой лампы 1 (видимый диапазон) через блок фильтров поступал на систему фокусировки 2, которая фокусировала излучение на объекте 3. Прошедшее через объект (рассеянное вперед) излучение собиралось объективом 4 (20x или 40x) и через систему зеркал и призм 5 вводился в сканирующий конфо-

кальный блок 6. Сканирующий конфокальный блок построен по принципу Нипкова [11-12]. Перемещение фокальной плоскости (выделение анализируемого слоя ткани) осуществляли за счёт управляемого с компьютера пьезоэлектрического z-микросканера с установленным на нём объектом исследования. Спектральная фильтрация излучения осуществля-

лась в блоке 8, реализованном в виде системы сменных фильтров, установленных на вращающейся турели. Спектральная фильтрация позволяла повысить контрастность регистрируемого изображения. После блока 8 излучение вводилось в камеру 9 (1024*1024, время экспозиции 40мс-10мин). Для снижения темновых токов (в среднем на 3 порядка) матрица камеры захлаживается до температуры -75°C .

В режиме флуоресценции галогеновая лампа была выключена. Вместо неё использовали либо 4-модульный блок лазеров 10 (в настоящей работе использовали каналы излучения с длинами волн 488 нм и 561 нм), либо ртутная лампа. В обоих случаях применяли волоконный ввод 11, а мощность каждого источника независимо управляли с компьютера (с шагом 0,1%). Фокусировку и согласование падающего излучения осуществляли в блоке 6 при помощи вращающегося диска с микролинзами, синхронизованного с диском Нипкова.

Следует отметить, что при использовании флуоресцентной конфокальной микроскопии для контроля культуры МСК возникает принципиальная задача обработки, распознавания и анализа слабых оптических сигналов на фоне достаточно больших шумов, вызванных тем обстоятельством, что биологическая среда является многократно рассеивающей средой.

Дополнительно осуществлялась обработка шумовых пикселей полученных микроснимков. Для уменьшения шума и увеличения контрастности микроснимков использовался пороговый фильтр с порогом порядка 5% от максимальной интенсивности кадра и заменой его на нулевой сигнал. Обработка отдельных шумовых пикселей осуществлялась в программной среде MathCad.

Результаты исследования и их обсуждение

Динамика роста культуры МСК была исследована в модельной среде (в чашке Петри). Наблюдения проводились в течение нескольких суток с регистрацией изображений (в том числе серийных) в режиме конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии.

Характерный микроснимок культуры МСК кролика представлен на рис.2. Конфокальная микроскопия в проходящем свете дала возможность получить объёмное изображение нативных клеток, что позволило визуализировать вышеописанные процессы (рис. 2). При световой микроскопии в живой культуре распластанные клетки выглядят более плоскими и прозрачными. Достигнутое разрешение составляет 400 нм на пиксель.

Полученные результаты позволили детально описать динамику развития остеобластов в модельной среде: через 2 часа после пересева большая часть их пристаёт ко дну культуральной посуды и расплывается по нему; через сутки формируется неполный равномерный монослой, в котором клетки соединены своими отростками. На вторые сутки количество клеток увеличивается, отростками клетки соединяются друг с другом (рис.2). Вследствие этого изображение имеет низкую величину контраста - не более 0,2-0,3, рассчитанного по формуле

$$K = \frac{I_{об} - I_{фон}}{I_{об}},$$

где $I_{об}$ – интенсивность света для области объекта, $I_{фон}$ – интенсивность света для области фона.

Основное рассеяние даёт мембрана клетки и её ворсинки, что не позволяет должным образом визуализировать внутреннюю структуру клетки. Дальнейший рост количества клеток приводит к формированию равномерного монослоя. На шестые сутки образуется полный монослой, а на седьмые сутки происходит насыщение и процесс переходит в стационарную фазу.

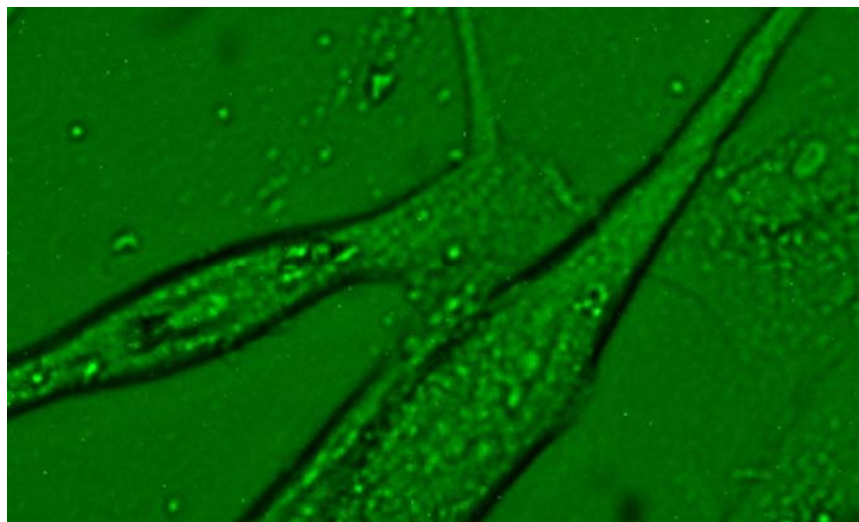


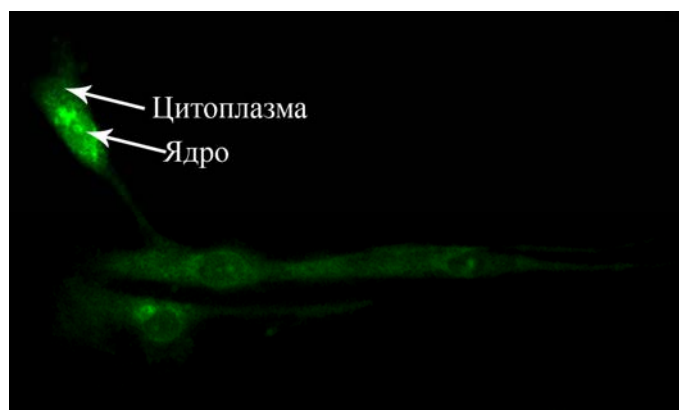
Рис. 2. Культура МСК кролика.
4-й пассаж, первые сутки после пересева. Увеличение 800

Переход в режим флуоресценции позволяет выделять не только клетки, но обеспечить и визуализацию ядра и оргanelл клетки. Для реализации режима флуоресценции был использован флуорофор, который при введении в среду концентрировался в цитоплазме клеток и возбуждался на длине волны 561 нм (рис.3). За счёт того, что подсветка возбуждающим лазером производится со стороны объектива, а флуорофор содержится только в клетках, интенсивность фонового излучения на длине волны флуоресценции минимальна и контрастность изображения превышает 0,9.

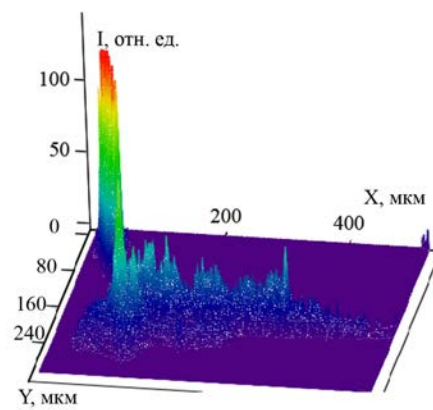
В отличие от красителей, традиционно используемых в гистологии, данный флуорофор нетоксичен и позволяет детально исследовать динамику процессов.

На рис. 3-4 представлена динамика культуры МСК кролика, полученная методом конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии.

На рис. 3, б и 4, б представлены диаграммы пространственного распределения интенсивности флуоресценции используемого флуорофора, накопленного в клетках.



а



б

Рис. 3. Культура МСК кролика. 4-й пассаж, третьи сутки после пересева :
а – флуоресценция (размер снимка 370*370мкм);
б - диаграмма пространственного распределения интенсивности флуоресценции флуорофора GFP

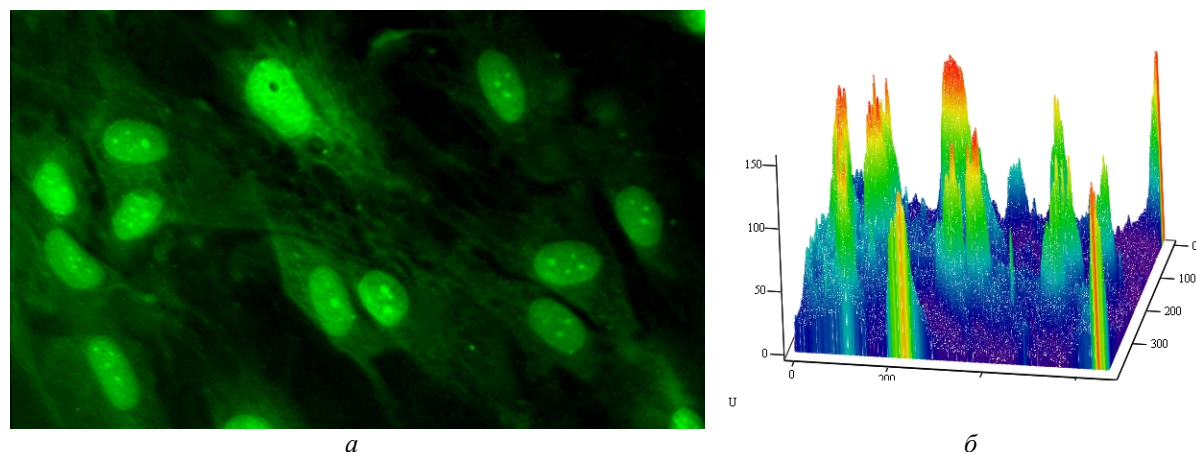


Рис. 4. Культура МСК КМ кролика. 4-й пассаж, седьмые сутки после посева:

а - флюоресценция (размер снимка 370*370мкм);

б - диаграмма пространственного распределения интенсивности флуоресценции флуорофора GFP

Из рис. 3, б и 4, б видно, что интенсивность свечения флуорофора свидетельствует о наличии жизнеспособных клеток в культуре мезенхимальных стромальных клеток костного мозга кролика.

Выводы

Показано, что метод конфокальной микроскопии позволяет осуществлять динамический контроль структурных характеристик МСК костного мозга кролика *in vitro* и выявить жизнеспособные клетки в модельной среде с разрешением не менее 400 нм.

Внедрение данного метода позволит проводить предимплантационное тестирование, тем самым осуществляя контроль качества создаваемых клеточно-тканевых продуктов для регенеративной хирургии.

Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы.

Библиографический список

1. Зуев, В.П. Остеорепарация посттравматических дефектов нижней челюсти под воздействием гидроксиапатита ультравысокой дисперсности [Текст]/

В.П. Зуев, А.С. Панкратов. // Стоматология. – 1999. — №1. — С.37–41.

2. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органических дисфункций [Текст]/ под ред. В.И. Шумакова, Н.А. Онищенко – М.: Лавр, 2009. – 309 с.

3. Особенности костного обрастания и крепления различных по конфигурации имплантатов в эксперименте [Текст]/ В.А. Шендеров, С. Виноградский, Ю.В. Мошковцев [и др.] // Травматол. и ортопед. России. – 1996. - №2. - С.33–37.

4. Еськин, Н.А. Комплексная оценка повреждений и заболеваний мягких тканей и суставов [Текст]: дис... д-ра мед. наук / Н.А. Еськин. – М., 2000.

5. Pochaeв, V. A beginners guide to practical pitfalls in image acquisition [Text]/ V. Pochaeв – JCB, 2006. - Vol. 172. - №1. - P.9-18.

6. Robert, H. Webb Confocal optical microscopy [Text] / H. Webb Robert - Rep. Prog. Phys, 1996. - №59. – P.427-471.

7. Kino, G. S. Confocal scanning optical microscopy [Text] / G. S. Kino, T. R. Corle - Phys. Today., 1989. - №42. - 55–62.

8. Wilson, T. Scanning optical microscopy [Text] / T. Wilson – Scanning, 1985. - №7. – P.79–87.

9. Применение конфокальной лазерной микроскопии для контроля сеточных имплантатов в герниологии [Текст]/ В.П. Захаров, П.Е. Тимченко, И.А. Братченко

[и др.] // Квантовая электроника. – 2011. – Т.41. – №4 – С.318-323.

10. Оценка жизнеспособности клеток на бионосителе при помощи конфокальной микроскопии [Текст]/ Л.Т. Волова, П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко [и др.] // Морфологические ведомости. – 2011. – №3. – С. 22-27.

11. Webb, R. H. Confocal microscopes [Text] / R. H. Webb - Opt. Photon. News. – 1991. – №2. – P.8-13.

12. Wilson, T. Scanning optical microscopy [Text] / T. Wilson – Scanning, 1985. – №7. – P.79-87.

METHOD OF CONFOCAL LASER FLUORESCENCE MICROSCOPY FOR THE CONTROL OF BONE MARROW CELLS

© 2013 V. P. Zakharov¹, L. T. Volova², P. E. Timchenko¹, E. V. Timchenko¹, V. V. Boltovskaya², V. V. Rossinskaya²

¹Samara State Aerospace University named after academician S. P. Korolyov
(National Research University)

²Institute of experimental medicine and biotechnologies,
Samara Medical University

The paper shows the use of confocal laser microscopy for the assessing of viability of mesenchymal bone marrow stromal cells of a rabbit with the resolution of 400 nanometers. A three-dimensional structure of cells is obtained by this method.

Confocal microscopy, laser fluorescence, contrast, noise, culture of mesenchymal stromal cells (MSCs), rabbit's bone marrow.

Информация об авторах

Захаров Валерий Павлович, доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой радиотехнических устройств, Самарский государственный аэрокосмический университет (национальный исследовательский университет). E-mail: zakharov@ssau.ru. Область научных интересов: биофотоника, нелинейные процессы в лазерах, физика плазмы, физика газового разряда, нелинейная оптика, разработка лазеров и лазерных систем, медицинская лазерная техника.

Волова Лариса Геордовна, доктор медицинских наук, профессор, директор Института экспериментальной медицины и биотехнологий, Самарский государственный медицинский университет. E-mail: csrl.sam@mail.ru. Область научных интересов: тканевые и клеточные биотехнологии, регенеративная медицина, морфология, биоэтика, разработка новых методов в травматологии, ортопедии, стоматологии, офтальмологии, оториноларингологии с использованием продуктов биотехнологии.

Тимченко Павел Евгеньевич, кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры радиотехнических устройств, Самарский государственный аэрокосмический университет (национальный исследовательский университет). E-mail: timpavel@mail.ru. Область научных интересов: оптические методы диагностики, исследование взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с биологическими объектами, спектроскопия, визуализация многократно рассеивающих сред.

Тимченко Елена Владимировна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры радиотехнических устройств, Самарский государственный аэрокосмический университет (национальный исследовательский университет). E-mail: vorobjeva.82@mail.ru. Область научных интересов: оптические методы диагностики,

исследование взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с биологическими объектами, экологический мониторинг, спектроскопия.

Болтовская Виолетта Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института экспериментальной медицины и биотехнологий, Самарский государственный медицинский университет. E-mail: csrl.sam@mail.ru. Область научных интересов: биоимплантаты, разработка способов оперативного лечения в травматологии, ортопедии, стоматологии, офтальмологии, оториноларингологии, тканевая и клеточная трансплантология.

Россинская Виктория Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник Института экспериментальной медицины и биотехнологий, Самарский государственный медицинский университет. E-mail: csrl.sam@mail.ru. Область научных интересов: биоимплантаты, разработка способов оперативного лечения в травматологии, ортопедии, стоматологии, офтальмологии, оториноларингологии, тканевая и клеточная трансплантология.

Zakharov Valery Pavlovich, doctor of physics and mathematics, head of the department of radio engineering devices, Samara State Aerospace University named after academician S.P. Korolyov (National Research University). E-mail: zakharov@ssau.ru. Area of research: biophotonics, nonlinear processes in lasers, plasma physics, nonlinear optics, laser systems development and design, medical laser equipment.

Volova Larisa Teodorovna, doctor of medicine, director of the Institute of experimental medicine and biotechnologies, Samara State Medical University, professor. E-mail: csrl.sam@mail.ru. Area of research: morphology, cellular and tissue biotechnology, tissue engineering, regenerative medicine in traumatology, orthopedics, stomatology, ophthalmology, otorhinolaryngology, bioethics.

Timchenko Pavel Evgenyevich, candidate of physics and mathematics, assistant of the department of radio engineering devices, Samara State Aerospace University named after academician S.P. Korolyov (National Research University). E-mail: timpavel@mail.ru. Area of research: optical diagnostics methods, spectroscopy, visualization of multi-scattering media.

Timchenko Elena Vladimirovna, candidate of physics and mathematics, associate professor, the department of radio engineering devices, Samara State Aerospace University named after academician S.P. Korolyov (National Research University). E-mail: vorobjeva.82@mail.ru. Area of research: optical diagnostics methods, research of interaction of low-intensity laser radiation with biological objects, ecological monitoring, spectroscopy.

Boltovskaya Violetta Viktorovna, candidate of medicine, senior researcher, the Institute of medicine and biotechnologies, Samara State Medical University. E-mail: csrl.sam@mail.ru. Area of research: bioimplants, development of ways of operative treatment in traumatology, orthopedics, stomatology, ophthalmology, otorhinolaryngology, tissue and cellular transplantology.

Rossinskaya Viktoria Viktorovna, candidate of medicine, leading researcher, the Institute of experimental medicine and biotechnologies, Samara State Medical University. E-mail: csrl.sam@mail.ru. Area of research: bioimplants, development of ways of operative treatment in traumatology, orthopedics, stomatology, ophthalmology, otorhinolaryngology, tissue and cellular transplantology.