

Микроскопия с многофотонным возбуждением для идентификации и оперативного контроля компонентов внеклеточного матрикса тканей организма

© Ю.В. Кистенев^{1,2}, В.В. Николаев^{1,3}, А.В. Борисов^{1,2}, О.Б. Заева¹, А.И. Князькова^{1,3}, Н.А. Кривова¹

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, 634050 Томск, Россия

³ Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения РАН, 634055 Томск, Россия

e-mail: yuk@iao.ru

Поступила в редакцию 11.12.2019 г.

В окончательной редакции 12.02.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Процесс выделения внеклеточного матрикса (ВКМ) требует оперативного контроля, поскольку при неоптимальных параметрах процесса существует опасность разрушения основных белков клеточного матрикса. С использованием многофотонной микроскопии исследована структура коллагена, целостность клеточной мембраны и содержание эластина в процессе выделения ВКМ из различных тканей организма крыс (мозг, дерма, мышца). Показано, что многофотонная микроскопия является эффективным инструментом контроля качества выделения ВКМ.

Ключевые слова: многофотонная микроскопия, внеклеточный матрикс, коллаген.

DOI: 10.21883/OS.2020.06.49412.50-20

Введение

Исследование внеклеточного матрикса (ВКМ) и его компонентов является одним из наиболее актуальных направлений для клеточной биологии и физиологии, тканевой инженерии в силу его интегрирующей роли для тканей организма [1,2].

В настоящее время для анализа отдельных компонентов ВКМ используется набор биохимических методов, которые потенциально могут давать смещенные оценки, например для протеомного анализа требуется исключение попадания внутриклеточных белков [3–5]. При разработке протоколов выделения ВКМ необходима идентификация его компонентов и оперативный контроль эффективности разделения клеточной и внеклеточной фаз. Протоколы децеллюляризации, как правило, разрабатываются для целей тканевой инженерии, создания скаффолдов и включают в себя физические, ферментативные и химические этапы. К физическим методам относятся механическое воздействие, циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком. При ферментативной децеллюляризации используются трипсин, эндо- и экзонуклеазы. Широко применяются и химические детергенты — кислоты и щелочи, ферменты, гипертонические и гипотонические растворы, ионные и неионные детергенты, хелатирующие агенты и бимодальные детергенты. Эти реагенты существенно нарушают структуру белков, которые являются компонентами ВКМ и делают невозможным их анализ из-за множественных артефактов [6].

Метод многофотонной микроскопии (МФМ) позволяет визуализировать *in vivo* объекты микронного уровня, при этом с возможностью проникать в глубину до нескольких сотен микрометров [7]. Метод МФМ основан на нелинейном взаимодействии оптического излучения с веществом, при котором в одном элементарном акте поглощения участвует несколько фотонов с энергией $h\nu$. Во время процесса поглощения происходит переход из начального квантового состояния с энергией E_1 в конечное состояние с энергией E_2 , при котором разница энергий состояний равна сумме энергий поглощенных фотонов.

Использование режима измерения времени жизни флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) дает возможность оценить пространственное распределение нескольких флуорофоров в ткани в условиях наложения сигналов флуоресценции. Режим FLIM позволяет исследовать концентрацию ионов в биоткани, компонентный состав клеток, оценивать метаболическое состояние тканей и клеток [8–12]. Чаще всего для анализа данных времени жизни автофлуоресценции используют двухэкспоненциальную модель:

$$F(x, y, t) = a_1(x, y)e^{-\frac{t}{\tau_1(x, y)}} + a_2(x, y)e^{-\frac{t}{\tau_2(x, y)}}. \quad (1)$$

где x и y — координаты пикселя, a_1 , a_2 — амплитуды, τ_1 , τ_2 — короткое и длинное времена жизни автофлуоресценции [13].

Многофотонная накачка среды короткими (фемтосекундными) импульсами позволяет также генерировать

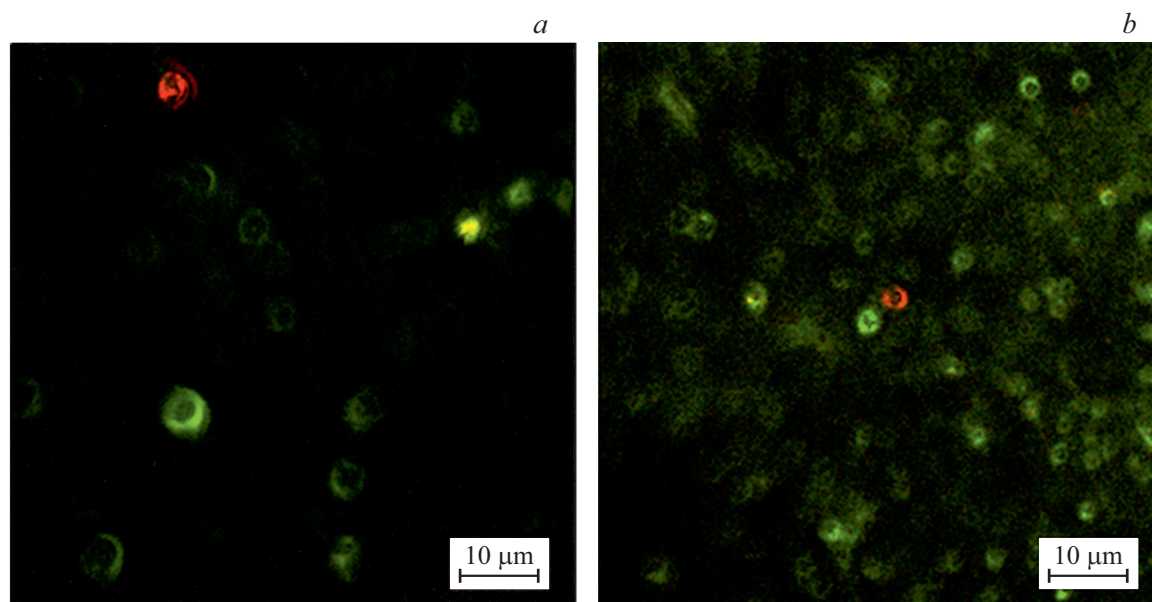


Рис. 1. Ткани мышцы после обработки на магнитной мешалке в течение 1 h в фильтрате (а), в осадке (б). Сигнал АФ показан зеленым цветом, сигнал ГВГ — красным.

различные гармоники в зависимости от симметрии отдельных молекул. На практике, как правило, используется сигнал генерации второй гармоники (ГВГ) для визуализации коллагена.

Таким образом, МФМ позволяет получать подробную информацию о морфологии живой ткани в режиме реального времени с использованием комбинации автофлуоресценции (АФ) и ГВГ. МФМ позволяет проводить *in vitro* и *ex vivo* диагностику необработанных тканей без маркировки или окрашивания [14,15]. Показано, что данные методы визуализации позволяют анализировать ВКМ в естественной среде без артефактов [16–18]. Данные достоинства МФМ для визуализации ВКМ были учтены в настоящем исследовании.

Целью работы является исследование возможности оценки качества выделения ВКМ с использованием метода МФМ.

Материалы и методы

В экспериментах использовали крыс-самцов Вистар, масса тела 200–250 g, полученных из питомника Института фармакологии СО РАМН. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

После слабого эфирного наркоза и последующей эвтаназии с помощью гильотины у крыс были взяты образцы тканей: лобной доли мозга, мышц и кожи. Образцы тканей были выбраны с учетом различия их структурно-функциональной организации — объема ВКМ, количества функциональных клеток, плотности

тканей. Образцы кожи обрабатывались дополнительно: с помощью скальпеля отделяли дерму от эпидермиса и в дальнейшем обрабатывали только дерму как наиболее функционально активную часть кожи.

Образцы (массой примерно 150 mg) промывали от крови, механически измельчали скальпелем и заливали 5 ml физиологического раствора (0,9% NaCl). Образцы ткани мозга разделяли и готовили: 1) гомогенат с помощью УЗ гомогенизатора Sonica по стандартной методике и 2) отмывка ВКМ с помощью магнитной мешалки ПЭ-6110. Образцы дермы и мышц обрабатывали только с помощью магнитной мешалки.

Исследовали влияние длительности обработки на магнитной мешалке на сохранность основных структурных компонентов ВКМ (коллагена и эластина) и полноту удаления клеток и их фрагментов. В то же время крайне важным является определение сохранения целостности клеточных мембран, поскольку внутриклеточное содержимое может контаминировать фазу, содержащую ВКМ. Длительность обработки на магнитной мешалке для образцов мозга составляла 30, 60, 120 min, а для образцов дермы — 3 и 24 h и мышц — 3, 24 и 48 h. Клеточную и матриксную фазы разделяли фильтрованием на бумажном фильтре (синяя лента). В полученных фазах определяли количество клеток и их фрагментов, присутствие и состояние коллагена и эластина.

Снимки сигнала АФ и ГВГ были получены на МФМ МРТflex производства JenLab (Германия). Микроскоп оснащен шарнирным рычагом с NIR-оптикой, что позволяет проводить сканирование практически на любом живом объекте соответствующих размеров. В состав входит программное обеспечение JenLab для обработки изображений с дополнительным модулем для использования

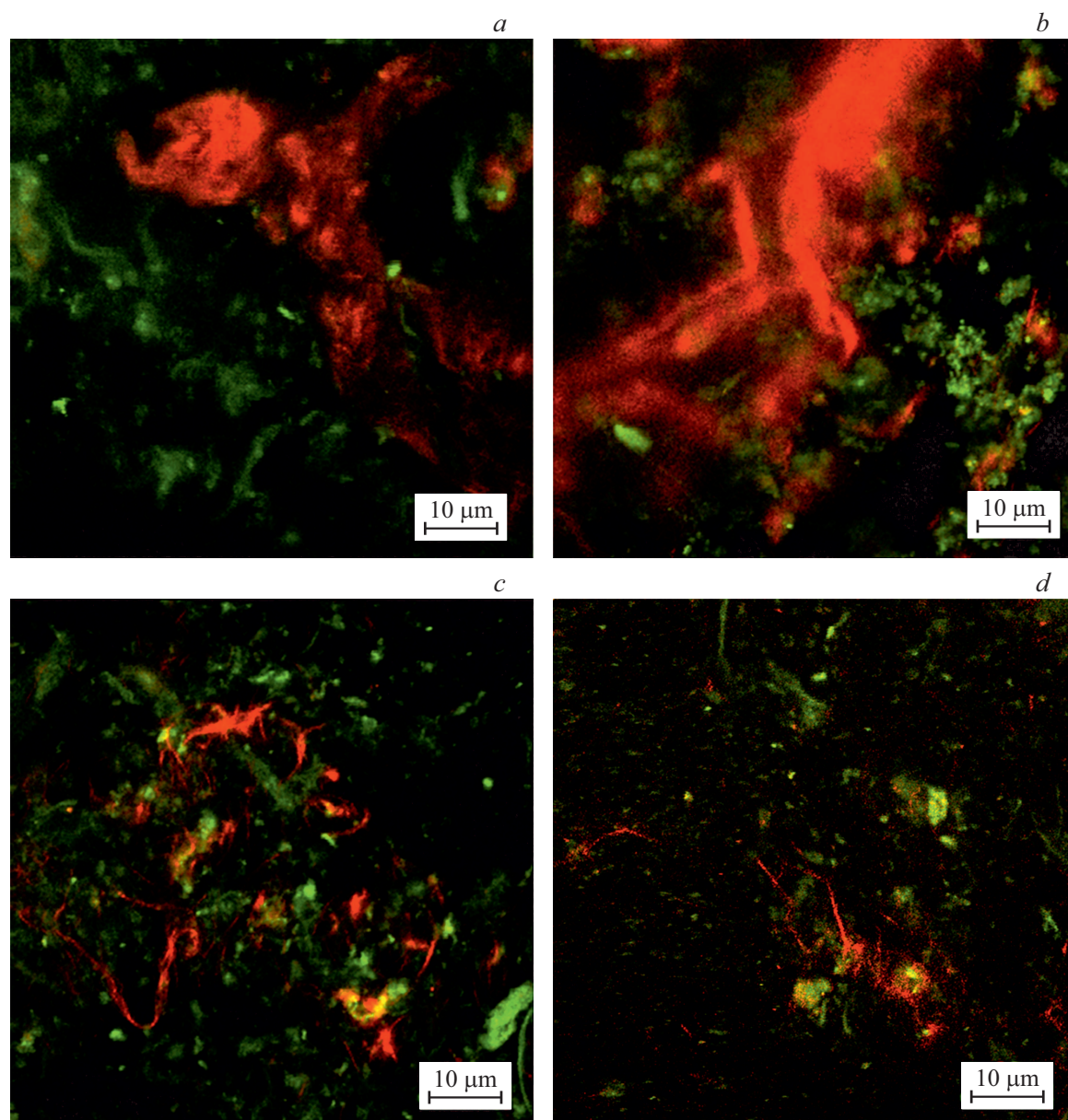


Рис. 2. Примеры МФМ изображений тканей дермы после обработки магнитной мешалкой в течение 3 часов (*a, b*) и в течение 24 часов (*c, d*); на изображениях сигнал АФ кодирован зеленым цветом, сигнал ГВГ — красным цветом.

технологии FLIM. Данный МФМ позволяет получать изображения ткани с боковым разрешением около $1\ \mu\text{m}$ и продольным разрешением меньше $2\ \mu\text{m}$. В устройстве используется два детектора фотонов: первый с фильтром в диапазоне $380 \pm 7\ \text{nm}$ для определения сигнала ГВГ и второй в диапазоне $407\text{--}610\ \text{nm}$. Нами использовалась длина волны лазера накачки около $760\ \text{nm}$. При этом структуры коллагена могли наблюдаться при регистрации сигнала ГВГ на длине волны $380\ \text{nm}$. Размер области сканирования был выбран $100 \times 100\ \mu\text{m}$, мощность не более $25\ \text{mW}$ с временем сканирования $12\ \text{s}$ на кадр. Данные АФ и ГВГ сохранялись в матрице 512×512 пикселей приложением JenlabScan. Данные FLIM сохранялись в матрицу 128×128 пикселей приложением SCP

(Becker & Hickl), накопление сигнала в каждом пикселе составляло не менее 150 фотонов. Также использовалось усреднение в окрестности 3×3 пиксела для улучшения качества кривой затухания сигнала FLIM.

Результаты

С использованием методики, описанной в предыдущем разделе, были зарегистрированы и получены по 3 МФМ-изображения для каждого из 46 образцов.

На основании анализа этих изображений было выявлено, что при обработке тканей мозга в течение 2 h с использованием магнитной мешалки наблюдается полное

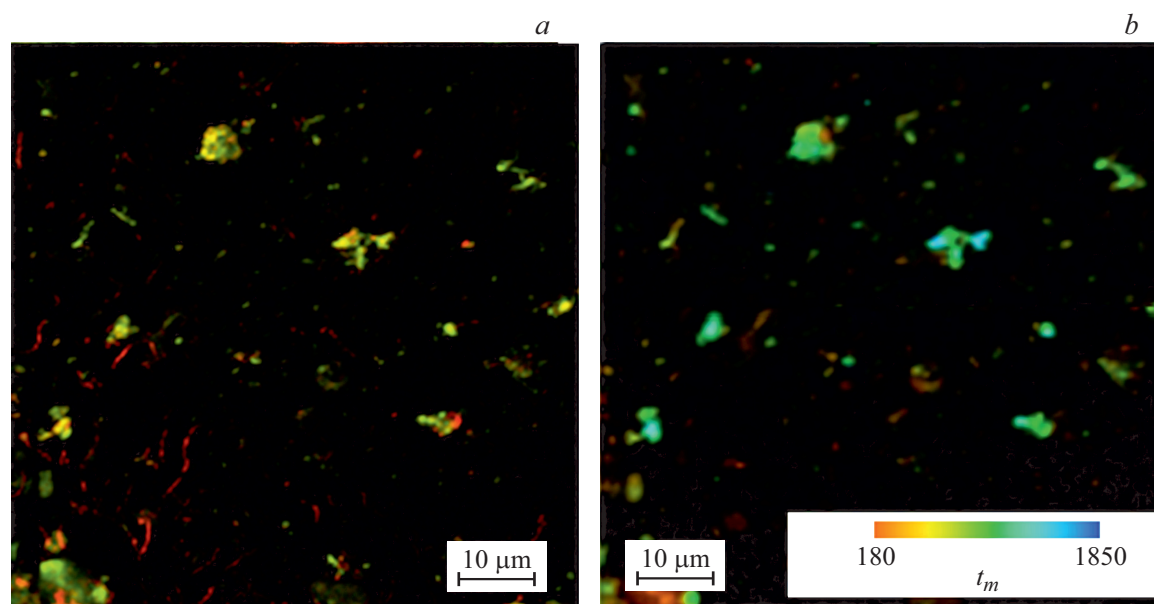


Рис. 3. Фильтрат тканей мозга. *a* — сигнал АФ показан зеленым цветом, сигнал ГВГ — красным цветом, *b* — время жизни флуоресценции t_m .

Параметры тканей, измеренные методом МФМ

№	Проба (время обработки в часах)	t_1 , ps	t_2 , ps	t_m , ps	SAAID	
					Q2	Q3
1	Мозг (0.5 h)	752 ± 456	3385 ± 1015	1496 ± 350	3.24	14.1
2	Мозг (1 h)	372 ± 174	2957 ± 566	1243 ± 316	3.86	17.2
3	Мышца (3 h)	1061 ± 400	4312 ± 1096	1765 ± 250	3.64	26.4
4	Мышца (24 h)	986 ± 214	3225 ± 629	1312 ± 161	4.96	11.64
5	Дерма (3 h)	1015 ± 380	3629 ± 1260	1526 ± 174	1.01	35.4
6	Дерма (24 h)	923 ± 264	3768 ± 1419	1494 ± 282	1.21	24.3

растворение образца, обработка в течение 0.5–1 h сохраняет отдельные клетки и их фрагменты. При обработке тканей мышц на магнитной мешалке клетки сохраняют четкую структуру как в осадке, так в фильтрате и при обработке в течение 3 h не теряют своей формы. Это хорошо видно при визуализации распределения эластина (сигнал АФ) и коллагена (сигнал ГВГ) (рис. 1).

Образцы ткани мышцы после 24 h обработки на магнитной мешалке сохраняли отдельные клетки, наблюдалось наличие клеточных конгломератов, коллагена и эластина. При обработке ткани мышцы на магнитной мешалке в течение 48 h наблюдалось полное разрушение клеток и деградированное состояние коллагена.

Образцы дермы после обработки на магнитной мешалке демонстрировали сохранность отдельных клеток как при 3 h обработке, так и при обработке в течение 24 h (рис. 2).

После короткой обработки ткани дермы (3 h) коллаген имел нативную структуру (рис. 2, *a, b*), а после длительной обработки (24 h) коллаген разделяется на более мелкие волокна (рис. 2, *c, d*).

В таблице приведены параметры времени жизни АФ: среднее время жизни $t_m = (a_1 t_1 + a_2 t_2) / (t_1 + t_2)$, где t_1 , t_2 — подгоночные параметры в соответствии с (1), индекс „старения кожи“, показывающий отношение сигнала ГВГ к сигналу АФ — в литературе обозначают SAAID (SHG-to-AF aging index of dermis). Индекс вычисляется по формуле $SAAID = (ГВГ - АФ) / (ГВГ + АФ)$. В таблице значения данного индекса представлены в виде границ второго-третьего квартилей распределения измеренных значений.

Видно, что происходит увеличение среднего значения отношения SAAID для тканей после длительной обработки. Мы связываем данные изменения с понижением уровня белка, что снижает АФ и тем самым увеличивает значение SAAID. Что касается времени жизни АФ, мы наблюдали заметное снижение короткого времени t_1 после длительной обработки ткани с помощью магнитной мешалки. Длинное время t_2 также уменьшается, однако это уменьшение не столь существенно. Пример изображения тканей мозга в фильтрате после 2 h обработки на магнитной мешалке представлены на рис. 3. Часто

изменение времени жизни АФ связывают с изменением метаболического статуса [19], таким образом, представленные результаты свидетельствуют и об изменении данного статуса при выделении ВКМ.

Заключение

В данной работе были продемонстрированы возможности методов МФМ для анализа ВКМ на примере тканей мозга, мышцы и дермы с использованием кратковременной обработки на магнитной мешалке и фильтрования через бумажный фильтр. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что методы МФМ позволяют провести контроль качества выделения ВКМ. Показано, что данные МФМ позволяют оценить качество сохранности клеточной мембраны в клеточной фазе, а также сохранности структуры коллагена в клеточной и матричной фазах. Также показано, что при длительной обработке образцов ткани на магнитной мешалке происходят изменения сигналов ГВГ и АФ, а также изменение времени жизни АФ, что свидетельствует об изменении метаболического статуса тканей в процессе выделения ВКМ.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы, направление III.23, и научного проекта 8.1.11.2019, выполненного при поддержке программы повышения конкурентоспособности ТГУ.

Соблюдение этических стандартов

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. Функциональная морфология и общая патология. М.: Медицина, 1981. 312 с.
- [2] Pischinger A., Heine H. The Extracellular Matrix and Ground Regulation: Basis for a Holistic Biological Medicine. North Atlantic Books, 2007. 232 p.
- [3] de Castro Brás L.E., Ramirez T.A., DeLeon-Pennell K.Y., Chiao Y.A., Ma Y., Dai Q., Halade G.V., Hakala K., Weintraub S.T., Lindsey M.L. // J. Proteomics. 2013. V. 28. N 86. P. 43. doi 10.1016/j.jprot.2013.05.004
- [4] Barallobre-Barreiro J., Didangelos A., Yin X., Doménech N., Mayr M. // Methods Mol Biol. 2013. V. 1005. P. 215. doi 10.1007/978-1-62703-386-2_17
- [5] Немец Е.А., Курсанова Л.А., Басок Ю.Б., Шагидулин М.Ю., Волкова Е.А., Метельский С.Т., Севастьянов В.И. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2017. Т. 19. № 4. С. 70.
- [6] Kular J.K., Basu S., Sharma R.I. // J. Tissue Engineering. 2014. V. 5. P. 1. doi 10.1177/2041731414557112
- [7] Kobat D., Durst M.E., Nishimura N., Wong A.W., Schaffer C.B., Xu C. // Optics Express. 2009. V. 17. N 16. P. 13354. doi 10.1364/OE.17.013354
- [8] Xu C., Webb W.W. // Topics in Fluorescence Spectroscopy. 1997. V. 5. P. 471.
- [9] Huang S., Heikal A.A., Webb W.W. // Biophysical J. 2002. V. 82. N 5. P. 2811. doi 10.1016/S0006-3495(02)75621-X
- [10] Conklin M.W., Provenzano P.P., Eliceiri K.W., Sullivan R., Keely P.J. // Cell. Biochem. Biophys. 2009. V. 53. N 3. P. 145. doi 10.1007/s12013-009-9046-7
- [11] Berezin M.Y., Achilefu S. // Chem. Rev. 2010. V. 110. N 5. P. 2641.
- [12] Becker W. // J. Microsc. 2012. V. 247. N 2. P. 119. doi 10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x
- [13] Vergen J., Hecht C., Zholudeva L.V., Marquardt M.M., Hallworth R., Nichols M.G. // Microsc. Microanal. 2012. V. 18. N 4. P. 761. doi 10.1017/S1431927612000529
- [14] Mazumder N., Balla N.K., Zhuo G.Y., Kistenev Yu.V., Kumar R., Kao F.J., Brasselet S., Nikolaev V.V., Krivova N.A. // Front. Phys. 2019. V. 7. P. 170. doi 10.3389/fphy.2019.00170
- [15] Shirshin E.A., Yakimov B.P., Darvin M.E., Omelyanenko N.P., Rodionov S.A., Gurfinkel Y.I., Lademann J., Fadeev V.V., Priezzhev A.V. // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. N 1. P. 69.
- [16] Schenke-Layland K. // J. Biophotonics. 2008. V. 1. N 6. P. 451.
- [17] Hinderer S., Layland S.L., Schenke-Layland K. // Advanced Drug. Delivery Rev. 2016. V. 97. P. 260.
- [18] Kistenev Y.V., Vrazhnov D.A., Nikolaev V.V., Sandykova E.A., Krivova N.A. // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 108.
- [19] Chakraborty S., Nian F.S., Tsai J.W., Karmenyan A., Chiou A. // Sci. Rep. 2016. V. 13. N 6. P. 19145. doi 10.1038/srep19145