

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ АДГЕЗИВНЫХ КЛЕТОК

Нефедова И.Ф., Россинская В.В., Волова Л.Т., Болтовская В.В., Кулагина Л.Н.

*ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, ИЭМБ, Самара, e-mail: csrl.sam@mail.ru*

В данной работе на примере дермальных фибробластов человека представлен способ адаптации возможностей интерференционного микроскопа МИМ-340 для исследования культур адгезивных клеток. С этой целью авторами был разработан способ стерилизации диэлектрических стекол с зеркальным покрытием. Показана принципиальная возможность выращивания культуры дермальных фибробластов человека на диэлектрических предметных стеклах. Фибробласты проявляют несколько меньшее сродство к диэлектрическим стеклам, чем к обычным, при этом структура клеток и характер их роста остаются без изменений, но пролиферативная активность на протяжении всего эксперимента остается несколько ниже, чем в контроле. Приведена сравнительная характеристика различных методов микроскопического исследования биологических объектов и показаны преимущества интерференционной микроскопии при изучении их поверхности. Были получены фазовые портреты ядер в нативной культуре фибробластов и определена их фазовая толщина.

Ключевые слова: культура клеток, фибробласты, модуляционная интерференционная микроскопия, фазовый портрет.

## USE OF PHASE MICROSCOPY POSSIBILITIES FOR STUDYING THE CULTURE OF ADHESIVE CELLS

Nefedova I.F., Rossinskaya V.V., Volova L.T., Boltovskaya V.V., Kulagina L.N.

*FGBOU VO "Samara State Medical University" of the Ministry of Health of Russia, IEMB, Samara, e-mail: csrl.sam@mail.ru*

In this paper, using the example of human dermal fibroblasts, a method for adapting the capabilities of the MIM-340 interference microscope to study cultures of adhesive cells is presented. With this purpose, the authors developed a method for sterilizing dielectric glass with a mirror coating. The principal possibility of growing a culture of human dermal fibroblasts on dielectric slide glasses is shown. Fibroblasts show somewhat less affinity for dielectric glasses than for conventional ones, while the cell structure and the nature of their growth remain unchanged, but the proliferative activity remains somewhat lower throughout the entire experiment than in the control. Comparative characteristics of various methods of microscopic examination of biological objects are given and the advantages of interference microscopy are shown when studying their surface. Phase portraits of nuclei were obtained in the native culture of fibroblasts and their phase thickness was determined.

Keywords: Cell culture, fibroblasts, modulation interference microscopy, phase portrait.

В настоящее время приобрело широкое распространение тестирование различных препаратов, изделий медицинского назначения и физических факторов на культурах адгезивных клеток [1]. Разработано и используется множество протоколов для проведения данных доклинических исследований. Оценка результатов осуществляется различными лабораторными методами, среди которых одним из основных является морфологический.

В последние годы наблюдается устойчивый рост интереса к сверхразрешающим методам оптической микроскопии. Однако широко применяемые в медико-биологических исследованиях методы электронной, атомно-силовой, конфокальной и когерентной микроскопии ограничены вследствие низкого (150...200нм) латерального разрешения [2, 3], высокой погрешности измерений, многочисленных артефактов и трудоемкой пробоподготовкой.

Относительно недавно был предложен метод модуляционной интерференционной микроскопии, на основе которого разработано новое поколение быстродействующих оптических профилометров с разрешением в плоскости XY 10–100 нм. Метод интерференционной микроскопии позволяет не только получить изображение структуры с нанометровым разрешением, но и провести комплексный анализ оптических свойств объекта [4]. Одним из таких профилометров является модуляционный интерференционный микроскоп (МИМ).

Сравнительные характеристики возможностей различных микроскопов представлены нами в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика различных методов микроскопического исследования поверхности биологических объектов

Метод	Увеличение	Рабочая среда	Изображение	Воздействие на образец	Пробоподготовка
Световая микроскопия	$10^3$	воздух жидкость	2D	инвазивное неинвазивное	фиксация окраска
Сканирующая электронная микроскопия	$10^6$	вакуум	2D	инвазивное	фиксация сушка
Сканирующая зондовая микроскопия	$10^9$	вакуум воздух жидкость	3D	инвазивное	сушка фиксация
Флуоресцентная микроскопия	$10^9$	воздух жидкость	3D	инвазивное	фиксация окраска
Конфокальная микроскопия	$10^9$	воздух	3D	инвазивное	фиксация окраска
Интерференционная микроскопия	$10^9$	воздух	3D	неинвазивное	---

В литературе описаны результаты исследования методом интерференционной микроскопии клеток крови [5,6], бактерий [7], спор микроорганизмов [8], опухолевых клеток [9], нейрон-глиальной сети [10]. Данных по изучению культур адгезивных клеток в доступной литературе нами обнаружено не было.

Разработанный ОАО «ПО «УОМЗ» (Россия) микроскоп МИМ-340 был передан Институту экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ в рамках договора о временном безвозмездном пользовании в целях проведения фундаментальных медико-биологических исследований (Договор № А0104 от 04.05.2015 г.).

На базе ИЭМБ СамГМУ располагаются лаборатории, где выращивают культуры клеток из различных источников для использования в доклинических исследованиях, в том числе в качестве тест-систем. Такие культуры должны отвечать требованиям, которые задаются соответственно целям и задачам каждого эксперимента. Для этого все культуры

проходят процедуру идентификации с использованием комплекса методов исследования. В связи с этим расширение комплекса методов идентификации является актуальным.

**Цель нашей работы** – адаптировать возможности интерференционного микроскопа МИМ-340 для исследования культур адгезивных клеток.

Согласно руководству по эксплуатации данного микроскопа, изучаемый объект следует помещать под объектив на диэлектрическом предметном стекле с зеркальным покрытием. Препараты из перечисленных выше биообъектов авторы изготавливали непосредственно перед микроскопированием. Если готовить подобным образом препарат из адгезивной культуры, необходимо «снять» клетки с поверхности культурального пластика, где они инкубировались в ростовой среде. Данная манипуляция сильно искажает морфологические характеристики клеток.

Для того чтобы получить возможность изучать нативную культуру с помощью МИМ-340, было принято решение вырастить клетки непосредственно на стекле с зеркальным напылением. Поскольку клетки *in vitro* культивируются только в стерильных условиях, а стекла поставляются нестерильными, необходимо было разработать метод их стерилизации. Данный способ был разработан авторами в 2016 году, подана заявка на патент («Уведомление о поступлении заявки на изобретение» № 20161130601 от 25.07.2016).

### **Материалы и методы**

Было проведено изучение использования возможностей МИМ-340 применительно к культуре адгезивных клеток.

Исследования осуществляли на культурах дермальных фибробластов человека 7 пассажа, которые выращивали в лаборатории культуры клеток ИЭМБ СамГМУ. Первичный материал получали у доноров с соблюдением всех требований биоэтики после подписания информированного согласия. Фибробласты ( $4,5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл полной ростовой среды) высевали на стерильные диэлектрические стекла с зеркальным покрытием (опытная группа) и на стерильные предметные стекла (контрольная группа). Стекла выдерживали во влажной камере в течение 60 минут для обеспечения прикрепления клеток к поверхности, затем помещали в стерильные чашки Петри и заливали ростовой средой. Культивирование проводили в полной ростовой среде следующего состава: среда 199 – 90 %, эмбриональная телячья сыворотка – 10 % (среда и сыворотка – ООО «БиолоТ», РФ), гентамицин – 40 мкг/мл- в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (Sanyo – Incubator, MCO -18AC, Япония) при температуре 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> и постоянной влажности в течение 7 суток. В эксперименте было задействовано 48 объектов (по 24 стекла в каждой группе).

Дермальные фибробласты контрольной серии изучали и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX 41 с цифровой камерой SC100 и программным обеспечением Cell Sence Entry при увеличении 200, 400.

Препараты опытной серии изучали с помощью интерференционного микроскопа МИМ-340. После извлечения стекла с зеркальным покрытием с культурой из ростовой среды по периметру стекла прокладывали спейсер высотой 10–15 мкм. На ограниченную спейсером поверхность наносили 20 мкл ростовой среды и накрывали покровным стеклом. Полученный таким образом препарат помещали под объектив микроскопа. Монослой оценивали в навигационном канале. Так как площадь измерения оптической плотности ограничена пределами стандартной рамки (отображающей площадь интерференционного канала), мы избрали ядро фибробласта в качестве объекта для детального исследования.

Для определения жизнеспособности клеток использовали общепринятую методику окраски витальным красителем трипановым синим. Количество живых и мертвых клеток подсчитывали в 5 полях зрения каждого стекла при увеличении 100, результат выражали в процентах.

Сравнительный анализ морфофункционального состояния опытных и контрольных культур в динамике проводили, основываясь на следующих показателях: плотность монослоя, индекс адгезии IA, время удвоения TD, количество удвоений KD. Для этого сначала через 24 часа, а затем каждые 48 часов эксперимента клетки снимали со стекла стандартным способом (по 6 стекол из каждой группы) и считали при помощи ручного автоматического счетчика клеток Scepter (Millipore, США).

Индекс адгезии (IA) рассчитывали по формуле:

$$IA = \frac{N_t}{N_1} \cdot 100$$

где  $N_1$  – посевная доза,  $N_t$  – количество клеток на стекле через 24 часа после посева, и выражали в процентах (%).

Время удвоения культуры (TD) рассчитывали по формуле:

$$TD = t \times \frac{\lg 2}{\lg(N_t/N_0)}$$

где  $t$  – время роста культуры (часы),  $N_0$  – начальное количество клеток,  $N_t$  – количество клеток через  $t$  часов.

Количество удвоений культуры (KD) вычисляли по формуле:

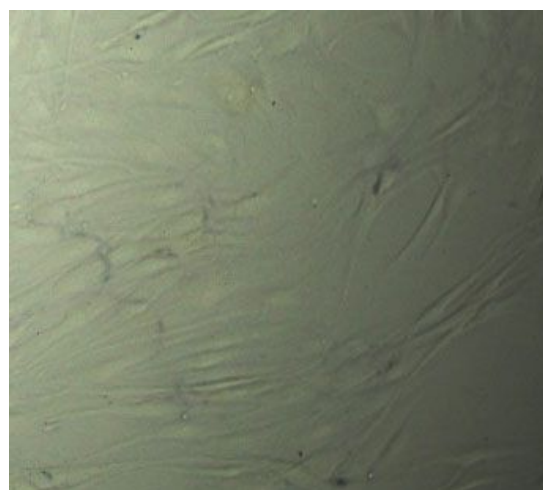
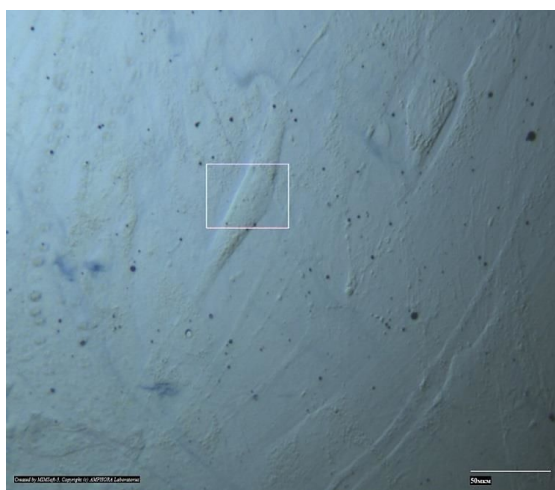
$$KD = \frac{(\lg N_t - \lg N_0)}{\lg 2}$$

где  $N_0$  – количество клеток в монослое через 24 часа после посадки,  $N_t$  – количество клеток в монослое по окончании эксперимента.

**Статобработка.** Статистическая обработка результатов исследования была проведена с помощью операционной системы Windows-7, программного комплекса Microsoft Office Excel 2010. Нормальность распределения количественных признаков определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Результаты были представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартной ошибки выборочной средней (m) [11,12]. Для определения равнозначности сравниваемых групп использовали t-критерий Стьюдента. Значимыми считались отличия при  $p \leq 0,05$  (95 %).

**Результаты и их обсуждение.** Проведенное исследование показало, что и в опытной, и в контрольной серии в течение всего эксперимента фибробласты сохраняли свойственную им форму, размеры, количество ядер и отростков, структуру цитоплазмы, характер роста в монослое. При микроскопировании препарата как с помощью МИМ-340 (камера навигационного канала), так и инвертированного микроскопа мы наблюдали расплавленные клетки веретенообразной формы с 2–4 отростками (рис.1 а,б), контактирующими между собой. Цитоплазма фибробластов гомогенная, ядра с 1–2 ядрышками четко визуализировались. При окраске трипановым синим в монослое выявлялись преимущественно жизнеспособные клетки (табл. 2).

Вместе с тем дермальные фибробласты человека с самого начала эксперимента проявили несколько меньшее сродство к диэлектрическим стеклам: индекс адгезии опытной культуры составил 85 %, по сравнению с 96 % в контроле. Время удвоения опытной культуры, отражающее ее пролиферативную активность, было стабильным на всем протяжении эксперимента, сохраняясь достоверно ниже контрольного показателя (таб. 2), что, по-видимому, связано с более слабым сцеплением клеток с зеркальной поверхностью. В результате формирование монослоя в опытной серии происходило равномерно и диффузно, с сохранением характера роста, свойственного нормальной культуре дермальных фибробластов человека, но плотность монослоя в течение всего эксперимента значимо меньше, чем в контроле. За 7 суток в опытной группе произошло 4,0691 удвоение, в контрольной группе – 4,7558 удвоений.



а

б

Рис.1. Культура дермальных фибробластов человека, 5 суток. Окраска трипановым синим.  
а) МИМ, камера навигационного канала; б) световой микроскоп. Ув. 400

Таблица 2

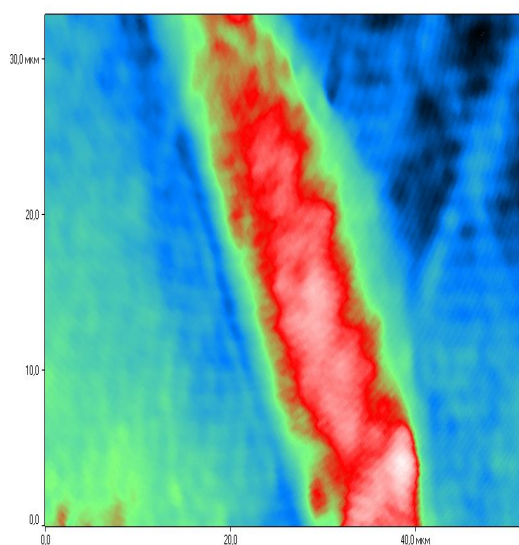
Сравнительная характеристика культур фибробластов при посеве на обычные и диэлектрические предметные стекла

Показатель	1 сутки эксперимента		3 суток эксперимента		5 суток эксперимента		7 суток эксперимента	
	Конт роль	Опыт	Конт роль	Опыт	Конт роль	Опыт	Конт роль	Опыт
Плотность монослоя, кл/1 мм <sup>2</sup>	43,20±1,23	38,25±1,51*	139,97±4,53	97,92±3,97*	404,51±12,21	250,68±17,92*	1169,03±25,49	641,74±18,98*
Время удвоения, ч	-	-	28,30±0,83	35,40±1,62*	31,35±0,61	35,39±1,17*	31,35±0,89	35,39±1,24*
Живые клетки в монослое, %	96,41±0,56	94,62±1,02	97,61±2,14	95,53±1,57	96,51±1,73	95,63±0,94	96,42±1,66	94,61±1,42

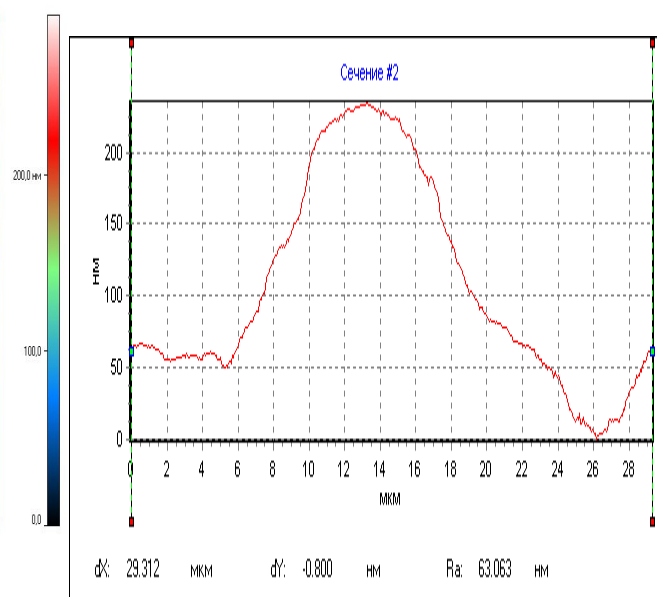
Примечание: \* – p < 0.05 по сравнению с контролем.

Фазовые изображения, полученные с помощью МИМ-340, представляют собой оптическую разность хода интерферирующих лучей. Физиологические процессы, происходящие в клетке, а также фазы клеточного цикла приводят к изменениям оптических параметров (изменение оптической плотности). Используя разработанный нами способ выращивания клеток на диэлектрических стеклах, мы получили возможность определять фазовую высоту ядер нативных фибробластов в культуре (рис. 2,3). Фазовый портрет

представляет собой временную последовательность профилей фазовой толщины по скан-линии при периодически многократном сканировании объекта. Команда «Сечение» позволяет задавать начальную и конечную точку произвольного сечения и выводить его график в отдельном окне. При средних размерах ядер живых дермальных фибробластов (длина –  $27,14 \pm 2,4$  мкм, ширина –  $16,7 \pm 3,2$  мкм) средняя фазовая высота их к концу эксперимента составила  $142,17 \pm 21,7$  нм. Следует обратить внимание на несовпадение терминов «геометрическая толщина» и «фазовая толщина» объекта [8].



*Рис.2. Фазовый портрет ядра фибробласта*



*Рис.3. Профиль фазовой толщины ядра фибробласта*

### **Выводы**

В ходе наших исследований была продемонстрирована возможность выращивания культуры дермальных фибробластов человека на диэлектрических стеклах без изменения структуры клеток и характера их роста. В результате была доказана возможность исследования нативных клеток в монослое с использованием интерференционного канала МИМ-340 максимально длительное время. Были получены фазовые портреты ядер в нативной культуре фибробластов и определена их фазовая толщина.

### **Список литературы**

1. Волова Л.Т. Тестирование костнопластических материалов, используемых в стоматологии, на клетках мезенхимального происхождения / Л.Т. Волова, А.Ю. Розенбаум, В.В. Россинская, А.Ю. Евченко // Морфологические ведомости. – 2013. – № 3. – С.21-27.

2. Barysheva, M.M. Problem of roughness detection for supersmooth surfaces / M.M. Barysheva, B.A. Gribkov, Yu.A. Vainer, M.V. Zorina, A.E. Pestov, Yu.Ya. Platonov, D.N. Rogachev, N.N. Salashchenko, N.I. Chkhalo // Proceeding of SPIE. – 2011. – Vol. 8076 80760M-1.
3. Wyant, J.C. White light interferometry exhibits error / J.C. Wyant // Proceeding of SPIE. – 2002. – Vol. 4737. – P. 98-107.
4. Лопарев, А.В. Высокоскоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований / А.В. Лопарев, П.С. Игнатьев, К.В. Индукаев, П.А. Осипов, И.Н. Мазалов, А.В. Козырев // Измерительная техника. – 2009. – № 11. – С. 60-64.
5. Федорова, Т.А. Интраоперационная реинфузия аутоэритроцитов и показатели морфофункционального состояния эритроцитов у женщин при миомэктомии / Т.А. Федорова, О.В. Рогачевский, И.А. Василенко, А.Ю. Данилов, Д.А. Джабраилова, Д.В. Артемов, Е.П. Сухенко // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 5. – С.58-65.
6. Игнатьев, П.С. Исследование активации лимфоцитов методом когерентной фазовой микроскопии / П.С. Игнатьев, В.П. Тычинский, Т.В. Вышенская, В.Б. Метелин, И.А. Василенко// Альманах клинической медицины. – 2008. – № 17-2. – С.65-67.
7. Арсенюк А.Ю. Исследование процесса L-трансформации в популяции сальмонелл методами электронной лазерной интерференционной микроскопии / А.Ю. Арсенюк, И.Б. Павлова, П.С. Игнатьев // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 6. – С. 55-60.
8. Тычинский В.П. Исследования ранних стадий прорастания спор *Bacillus Licheniformis* методом динамической фазовой микроскопии / В.П. Тычинский, А.Ю. Николаев, В.В. Лисовский, А.В. Кретушев, Т.В. Вышенская, А.Л. Мулюкин, Н.А. Сузина, В.И. Дуда, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С.191-199.
9. Овсянникова, Г.В. Метод компьютерной лазерной морфометрии в диагностике эритродермических вариантов лимфом кожи / Г.В. Овсянникова, И.А. Василенко, В.Б. Метелин, З.З. Кардашова // Альманах клинической медицины. – 2006. – № 9. – С. 94-96.
10. Yang, Su-A Measurements morphological and biochemical alterations in individual neuron cells associated with early neurotoxic effects in Parkinson's disease [Electronic resource] / Su-A Yang, Jonghee Yoon, Kyoohyun Kim, YongKeun Park // Version of Record online: 20 April 2017| DOI: 10.1002/cyto.a.23110. – Accessmode: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto/a/23110/abstract#publication-history/>, free. – Title screen (date of access 10.05.17).
11. Медик В.А. Руководство по статистике в медицине и биологии / В.А. Медик, Б.Б. Фишман, М.С. Токмачев. – М.: Медицина, 2001. – Т.2. – 352 с.
12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.