

Волоконно-оптическая флуоресцентная микроскопия для исследования биологических объектов

А.Н.Морозов, А.А.Лазуткин, И.В.Турчин, В.А.Каменский, И.И.Фикс, Д.В.Безряднов, А.А.Иванова, Д.М.Топтунов, К.В.Анохин

Развит метод флуоресцентной микроскопии, основанный на использовании одномодового волоконно-оптического тракта для получения трехмерных изображений предварительно просветленных биологических объектов на длине волны возбуждающего излучения 488 нм. Поперечное и продольное разрешение метода составляет 5 и 13 мкм соответственно. Поперечные размеры исследуемых объектов до 10 мм. Глубина сканирования зависит от прозрачности образца, экспериментально продемонстрировано сканирование на глубину до 4 мм. Полученные трехмерные изображения цельных органов (сердце, легкие, головной мозг) и плодов животных с использованием автофлуоресценции и флуоресценции экзогенных маркеров демонстрируют высокие контраст и разрешающую способность метода.

Ключевые слова: оптическая микроскопия, светоплоскостная флуоресцентная микроскопия, 3D-визуализация, мозг, биопсия.

1. Введение

Оптические методы получения трехмерных (3D) изображений биологических объектов с пространственным разрешением около 5 мкм, необходимым для визуализации отдельных клеток, являются чрезвычайно востребованными в современной нейробиологии, биологии развития и экспериментальной медицине. Сегодня наиболее распространенным методом такого исследования является конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) [1]. Этот метод используется для получения трехмерных изображений биотканей с субклеточным разрешением на глубину до 200–300 мкм и с одномоментной областью визуализации от 0.1 до 0.5 мм [2]. Однако, для понимания структурной и функциональной организации многих биологических объектов, органов и тканей требуется визуализация их клеточной структуры в масштабах, сопоставимых с размерами этих объектов и органов.

Оптические методы, позволяющие производить подобную визуализацию крупных оптически прозрачных образцов на значительную глубину с клеточным разрешением, стали появляться только в последние годы. Разработка этих методов ведется по двум основным направлениям: оптическая проекционная томография (ОПТ) [3] и светоплоскостная флуоресцентная микроскопия (light-sheet fluorescence microscopy, СПФМ) [4]. СПФМ в текущий момент является наиболее перспективным из этих двух направлений и активно развивается в нескольких

модификациях: микроскопия с освещением в избирательной плоскости (selective plane illumination microscopy) [5], ультрамикроскопия [6], микроскопия с планарным освещением в фокальной плоскости (objective coupled planar illumination microscopy) [7] и другие [4]. Принципиальным отличием СПФМ от КЛСМ является то, что возбуждение флуоресценции происходит лишь в узком слое биоткани за счет использования специальных систем подсветки, а регистрация флуоресценции – в направлении, перпендикулярном плоскости подсветки. Это позволяет избежать попадания прямого лазерного излучения в приемный тракт системы и паразитного фона засветки вне области исследования. Даже при использовании объективов с небольшой числовой апертурой и большим рабочим расстоянием в таких методах достигается высокое разрешение на больших глубинах в оптически прозрачных образцах [6].

В описанных в литературе установках формирование пучков подсветки происходит с использованием открытых систем, что накладывает определенные ограничения на их применение [6]. В настоящей работе была поставлена задача разработать метод волоконно-оптической флуоресцентной микроскопии. С этой целью нами создана компактная система транспортировки лазерного излучения от источника к объекту исследования на основе одномодового волоконно-оптического тракта. Для обеспечения высокого разрешения системы был сформирован тонкий лазерный пучок подсветки с шириной, соответствующей поперечному размеру исследуемого объекта. Ширина пучка составляла не менее 10–20 мм при толщине от 6 до 25 мкм.

Основные достоинства такого решения по сравнению с открытыми системами: высокое качество пучка подсветки в области исследования из-за близости пространственной моды излучения к гауссовой, невосприимчивость системы к внешним воздействиям (температура, вибрации, пыль), простота использования и перемещения. На его основе была создана экспериментальная установка для волоконно-оптической флуоресцентной микро-

А.Н.Морозов, И.В.Турчин, В.А.Каменский, И.И.Фикс. Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46; e-mail: morozov@ufr.appl.sci-nnov.ru
А.А.Лазуткин, Д.В.Безряднов, А.А.Иванова, Д.М.Топтунов, К.В.Анохин. Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН, Россия, 125009 Москва, ул. Моховая, 11; e-mail: k.anokhin@gmail.com

Поступила в редакцию 19 апреля 2010 г., после доработки – 8 июля 2010 г.

скопии и проведена ее апробация с использованием целых просветленных образцов биологической ткани.

2. Описание экспериментальной установки

Схема установки для волоконно-оптической флуоресцентной микроскопии показана на рис.1. Для возбуждения флуоресценции в предварительно подготовленных образцах использовался лазер Coherent Sapphire 488 HP (США) мощностью 500 мВт с центральной длиной волны излучения 488 нм и системой ввода излучения в одномодовое оптическое волокно. Волоконно-оптический делитель мощности направлял излучение лазера в два плеча подсветки в соотношении 1 : 1. Использование двусторонней схемы подсветки позволило увеличить эффективную область исследования в образце в направлении *x* (рис.2) почти в два раза. Коллимированный пучок, уширенный до 30 мм в диаметре, проходил через прямоугольную (20×4 мм) апертурную диафрагму и фокусировался цилиндрической линзой на образце, помещенном внутри стеклянной кюветы, заполненной иммерсирующей жидкостью (просветлителем Мюррея [8]).

После диафрагмирования вдоль направления *y* пучок подсветки становился практически однородным, а его ширина составляла 20 мм. В продольном направлении *x*, согласно [9], толщина пучка с гауссовой структурой описывается формулой

$$\omega^2(x) = \omega_0^2 \left[1 + \left(\frac{2\lambda x}{\pi\omega_0} \right)^2 \right],$$

где λ – длина волны лазерного излучения; ω_0 – минимальная толщина пучка. Длина рэлеевской перетяжки $x_R = \pi\omega_0^2/4\lambda$.

Зная размеры кюветы, можно рассчитать величину изменения толщины области подсветки в плоскости образца для определения неоднородности интенсивности подсветки. Для того чтобы охватить широкий диапазон размеров исследуемых объектов (от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров) с оптимальным разрешением, мы использовали в экспериментах набор из

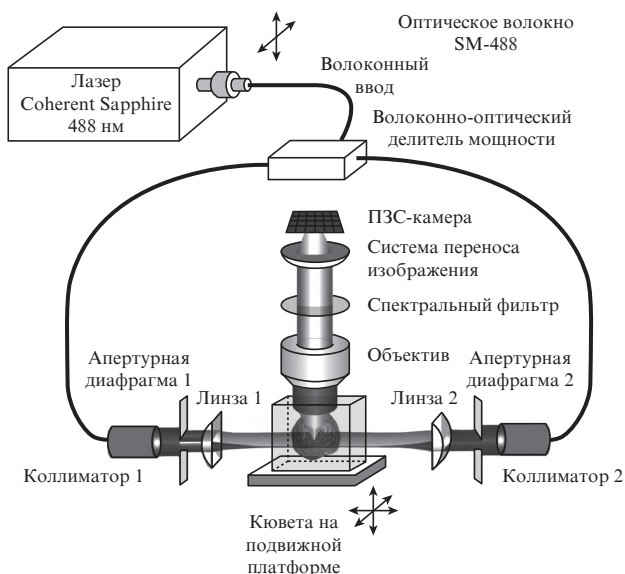


Рис.1. Схема установки для волоконно-оптической флуоресцентной микроскопии.

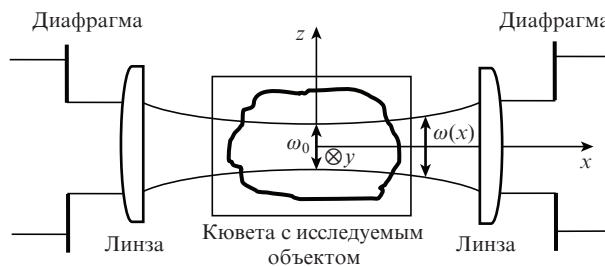


Рис.2. Схема блока подсветки установки флуоресцентной микроскопии.

Табл.1. Минимальная толщина пучка подсветки ω_0 и длина рэлеевской перетяжки x_R при использовании линз с различным фокусным расстоянием F .

F (мм)	ω_0 (мкм)	x_R (мкм)
40	6	62
80	12	251
150	23	873

трех цилиндрических линз фирмы Thorlabs с фокусными расстояниями $F = 40, 80$ и 150 мм. Соответствующие им значения толщины пучка приведены в табл.1.

Возбуждаемое в образце излучение анализировалось с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus MVX10 (Япония) с планапохроматическим объективом ($M = 1\times$, $WD = 65$ мм, $NA = 0.25$), выделялось с помощью узкополосного спектрального фильтра Chroma Technology ($\lambda = 505-530$ нм) и регистрировалось 3.2-мегапиксельной (2184×1472) охлаждаемой ПЗС-камерой Alta U32 (Arogee Inc., США). Вертикальное перемещение образца относительно плоского лазерного пучка осуществлялось синхронно с перемещением фокуса микроскопа шаговыми двигателями, управляемыми программным обеспечением фирмы Objective Imaging (Великобритания). При каждом новом положении образца производилась автоматическая подстройка фокусирующей системы микроскопа.

Измерения образцов проводились в кварцевых кюветах размером $40 \times 20 \times 20$ мм с толщиной стенок 2 мм. Просветленные по протоколу [8] образцы с помощью небольшой капли цианакрилатного клея приклеивали к покровному стеклу и помещали на дно кюветы. Кювету заполняли просветляющим раствором таким образом, чтобы верхний уровень раствора прикрывал верхнюю границу образца. Сканирование осуществлялось при мощности лазера, необходимой для визуализации сигнала с достаточным отношением сигнал/шум, составляющей не более 50% от общей мощности. В результате согласованного автоматизированного вертикального перемещения предметного столика с образцом и его пошаговой съемки формировался массив двумерных изображений (оптических срезов) флуоресцирующего образца. Время получения массива данных из 300 изображений размером 2184×1472 составляло около 10 мин. Последующие математическая обработка и визуализация трехмерных изображений объекта производились с помощью коммерческого программного обеспечения Amira 4 (Mercury Computer Systems, США).

3. Оценка пространственного разрешения метода

Разрешающая способность метода оценивалась с помощью специально изготовленной модельной среды, содержащей флуоресцентные микрочастицы сферической фор-

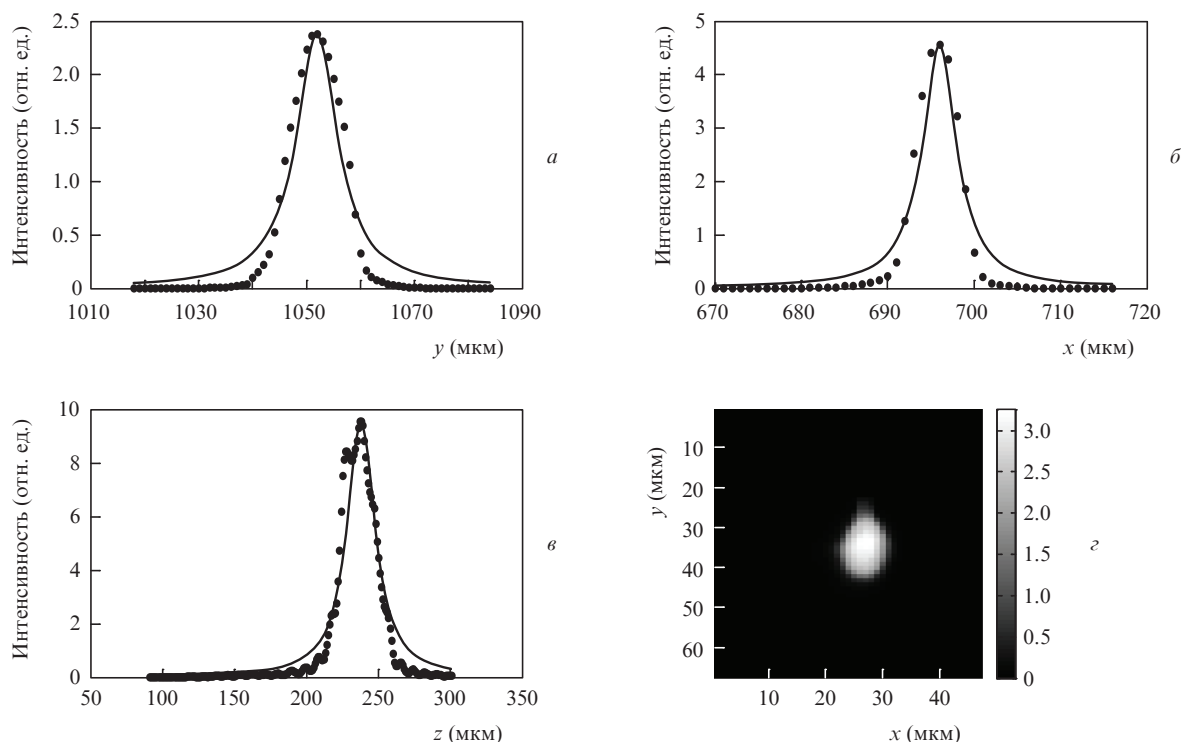


Рис.3. Сечения профиля интенсивности флуоресценции калиброванной микросферы диаметром 4 мкм, аппроксимированные лоренцевой кривой (сплошная кривая), вдоль осей y (а), x (б), z (в) и в плоскости xy (г).

мы диаметром 4 мкм с центральными длинами волн возбуждения/эмиссии, равными 505/515 мкм соответственно (FluoSpheres[®], Invitrogen, США). Микросферы помещались в 1%-ный агарозный гель с низкой точкой плавления (Sigma, США), после чего изготавливались кубы объемом 5 мм³. Полученные модельные объекты, погруженные в дистиллированную воду, сканировались на ультрамикроскопе (шаг сканирования по глубине 1 мкм) с использованием планапохроматического объектива ($M = 1\times$, $NA = 0.25$), увеличения 6.3 \times и линз блока лазерной подсветки с фокусным расстоянием 40 мм. Размер одного пикселя ПЗС-камеры на полученных изображениях составлял 1.7 мкм.

Полученные после сканирования пакеты двумерных изображений использовались для определения размеров флуоресцирующих областей. На рис.3 показаны сечения профиля интенсивности флуоресценции калиброванной микросферы в трех плоскостях и их аппроксимация лоренцевой кривой, т.к. известно, что функция размытия точки близка к функции Лоренца. Если два точечных объекта находятся на расстоянии, превышающем ширину лоренцевой кривой, вычисленную по уровню 0.77, то их можно детектировать раздельно. Поэтому данную ширину примем за разрешение метода флуоресцентной микроскопии. Расчетные значения среднего оптического разрешения и его среднеквадратичного отклонения (СКО), вычисленные по ансамблю реализаций, приведены в табл.2.

Табл.2. Значения поперечного и продольного оптического разрешения метода флуоресцентной микроскопии.

	z	y	x
Среднее (мкм)	13	7	5
СКО (мкм)	6	3	1

4. Результаты 3D-визуализации

Были получены оптические срезы и трехмерные изображения предварительно просветленных образцов биологических тканей (целых легких, сердца, мозга зародышей мышей и плодов мыши) с использованием специфичного окрашивания тканей и излучения автофлуоресценции.

Образцы мозга двухсуточных мышат были окрашены на белок Egr1 с использованием специфических антител и флуорофора Alexa488 (Invitrogen, США). Экспрессия белка Egr1 в мозге, запускаемая нервной активностью, отражает пластические перестройки в нервных клетках и используется в картировании областей и клеток мозга, вовлеченных в обучение, память и реакцию на стресс [10, 11]. Окрашенные препараты после оптического просветления составом Мюррея [8] становились полностью оптически прозрачными, что позволило производить их сканирование на всю толщину (3.0 мм). На оптических срезах мозга, полученных с использованием линз лазерной подсветки с фокусным расстоянием 80 мм, отдельные ядра нейронов, содержащие белок Egr1, становились различимыми начиная с увеличения 2.5 \times . Поле зрения, охватываемое камерой при таком увеличении, составляло 6 мм по наибольшей стороне. Это позволяло получать изображения оптических срезов мозга новорожденных мышат целиком. Таким образом, максимальные размеры исследуемых образцов целого мозга новорожденного мышонка составили 5.5 \times 4.7 \times 3.0 мм. Примеры оптического среза и трехмерной реконструкции, построенной из 200 оптических срезов с шагом 15 мкм и увеличении 2.5 \times , представлены на рис.4.

На рис.5 приведены результаты 3D-визуализации, основанной на автофлуоресценции биологических тканей. Целый ряд молекул, содержащихся в тканях организма (окисленные формы флавинов, порфирины, аромати-

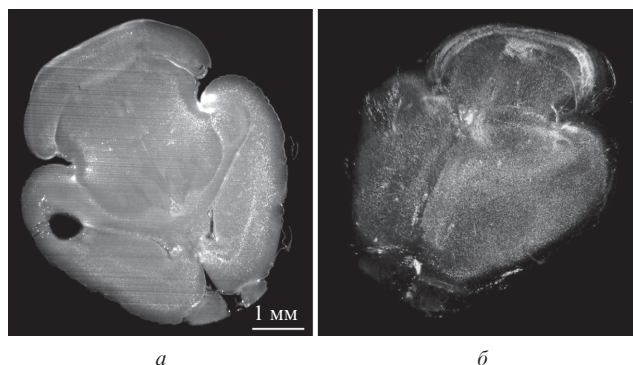


Рис.4. Визуализация белка Egr1 в целом мозге двухсуточного мышонка: оптический срез на глубине 1.5 мм (а) и трехмерная реконструкция (б).

ческие аминокислоты, пиридоксин, меланин, некоторые структурные белки – коллаген, эластин) представляют собой эндогенные флуорофоры [12]. Было показано, что органы и ткани с высоким содержанием этих молекул (кровеносные сосуды, селезенка, лимфатические узлы) обладают особенно высоким уровнем автофлуоресценции [12]. Наши наблюдения и данные других авторов [12, 13] свидетельствуют о возможности использования автофлуоресценции для получения дополнительной ценной информации об исследуемом объекте, в частности, для выявления морфоанатомических и гистологических границ и особенностей органов и тканей без использования контрастирующих агентов. В настоящей работе с помощью экспериментальной установки для волоконно-оптической микроскопии исследована автофлуоресценция в препаратах целых органов и плодах мыши.

Образцы целых органов (сердца и легких мышей) сканировались с использованием линз лазерной подсветки с фокусным расстоянием 80 мм. Сканирование производилось на всю глубину органа. Размеры визуализируемых образцов после оптического просветления составляли 11×5×4 мм для сердца и 10×8×3 мм для легкого мыши. На оптических срезах, полученных при сканировании, четко различалась гистологическая структура органов. Морфологические особенности, различимые на оптических срезах, оставались различимыми и на 3D-реконструкциях: в сердце хорошо прослеживались ход мышечных волокон и васкуляризация (рис.5,а), в легком – структура бронхов и ветвление бронхиол (рис.5,б). Отсут-

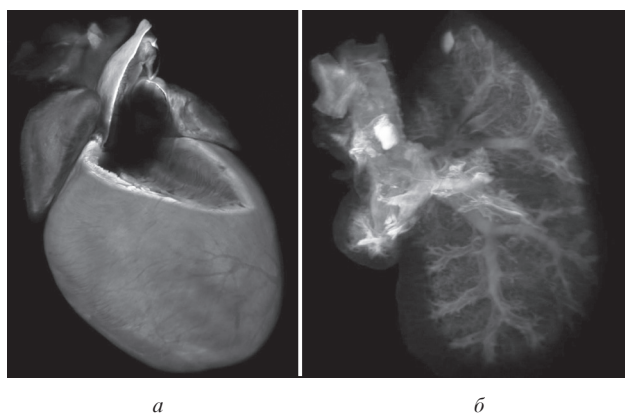


Рис.5. Трехмерная реконструкция строения сердца с сечением в верхней части левого желудочка (а) и доли легкого (б) мыши с помощью автофлуоресценции.

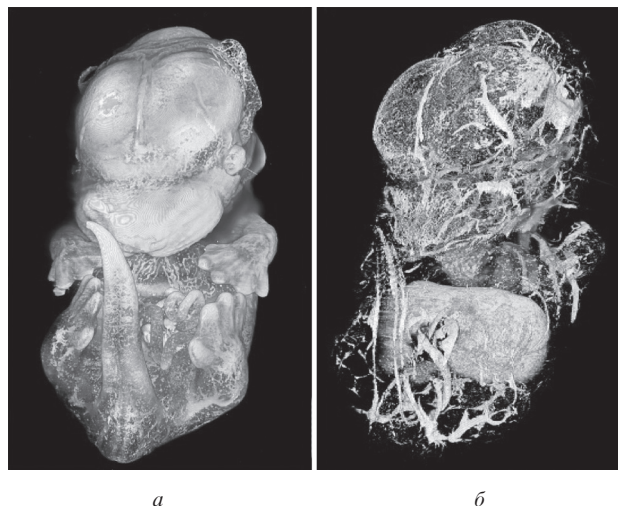


Рис.6. Трехмерная визуализация строения 14-дневного плода мыши: реконструкция поверхности (а) и внутренней структуры (б).

ствие клеточных структур на изображениях объясняется отсутствием строгой локализации эндогенных флуорофоров внутри клеток исследуемых органов.

Примеры трехмерных реконструкций 14-дневного плода мыши показаны на рис.6. Размеры образца составляли 5.5×8×3 мм. Полученные реконструкции позволяли визуализировать поверхность тела плода в трехмерном объеме и выявить отличительные признаки стадий развития, такие как степень развития вибрисс, пальцев конечностей, а также его внутреннее строение (сосуды, сердце, печень и другие внутренние органы). При большом увеличении можно также детально исследовать сеть кровеносных сосудов вибрисс, конечностей и других органов.

Таким образом, на просветленных образцах биологических объектов, тканей и органов продемонстрированы принципиальные возможности созданной экспериментальной установки для волоконно-оптической флуоресцентной микроскопии. Метод позволяет визуализировать экспрессию генов с клеточным разрешением на препаратах с размерами до 6 мм и на глубину до 3 мм, а также тонкие морфологические особенности строения плодов и внутренних органов с размерами до 10–11 мм и на глубину до 4 мм. Получаемые с помощью флуоресцентной микроскопии трехмерные изображения могут найти применение в медико-биологических исследованиях эффектов воздействия новых лекарственных препаратов на молекулярные процессы в тканях организма, в работе с экспериментальными моделями заболеваний (например, ишемических поражений мозга, сердца и др.), биопсийными образцами в медицинской диагностике, а также для картирования экспрессии генов в целых образцах биологических тканей.

5. Заключение

Разработана установка для флуоресцентной микроскопии на основе двустороннего одномодового волоконно-оптического тракта возбуждения флуоресценции на длине волны 488 нм. Получены оптические срезы и трехмерные изображения предварительно просветленных образцов биологических тканей (легких, сердца, перинатального мозга мышей и плодов мыши) с использованием иммуногистохимической окраски и автофлуоресценции. Про-

демонстрировано высокое разрешение метода (5–13 мкм) при больших размерах исследуемых объектов (до 10 мм). Глубина сканирования зависела от прозрачности образца и достигала 4 мм. Эти параметры существенно превосходят аналогичные, достигаемые в традиционной конфокальной микроскопии. Полученные результаты имеют большое значение для детального изучения структурных и функциональных особенностей строения органов и тканей в биологии развития, нейробиологии и экспериментальной медицине.

Авторы выражают благодарность Е.А.Сергеевой и Н.М.Шаховой за полезные обсуждения при написании статьи. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №06-04-08353-офи) и Министерства образования и науки РФ (госконтракт №02.522.11.2002).

1. Powley J.B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (New York: Plenum, 1995).
2. Гладкова Н.Д. *Оптическая когерентная томография в ряду методов медицинской визуализации: Курс лекций* (Н.Новгород: ИПФ РАН, 2005).
3. Sharpe J., Ahlgren U., Perry P., Hill B., Ross A., Hecksher-Sorensen J., Baldock R., Davidson D. *Science*, **296**, 541 (2002).
4. Huisken J., Stainier D.Y. *Development*, **136** (12), 1963 (2009).
5. Huisken J., Swoger J., Del Bene F., Wittbrodt J., Stelzer E.H. *Science*, **305**, 1007 (2004).
6. Dodt H.U., Leischner U., Schierloh A., Jährling N., Mauch C.P., Deininger K., Deussing J.M., Eder M., Zieglgänsberger W., Becker K. *Nature Meth.*, **4**, 331 (2007).
7. Holekamp T.F., Turaga D., Holy T.E. *Neuron*, **57**, 661 (2008).
8. Dent J.A., Polson A.G., Klymkowsky M.W. *Development*, **105**, 61 (1989).
9. Борн М., Вольф Э. *Основы оптики* (М.: Наука, 1973).
10. Guzowski J.F., Timlin J.A., Roysam B., McNaughton B.L., Worley P.F., Barnes C.A. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 599 (2005).
11. Knapska E., Kaczmarek L. *Prog. Neurobiol.*, **74**, 183 (2004).
12. Deeb S., Nasr K.H., Madhy E., Badawey M., Badey M. *Afr. J. Biotechnol.*, **7**, 504 (2008).
13. Monici M. *Biotechn. Ann. Rev.*, **11**, 227 (2005).