

# Оптическая диагностика клеток биологических тканей в процессе их культивирования в полимерных средах

С.Н.Летута, В.С.Маряхина, Р.Р.Рахматуллин

*Методом лазерной кинетической флуориметрии исследованы особенности длительной люминесценции экзогенных молекулярных зондов в клетках патогенных и нормальных биотканей, культивируемых на твердой питательной среде. В качестве питательной среды предложено использовать биополимер «Гиаматрикс», созданный на основе нативной, химически не модифицированной гиалуроновой кислоты и содержащий аминокислоты, микроэлементы, витамины и другие компоненты. Обсуждается возможность использования полученных результатов для разработки альтернативного метода флуоресцентной диагностики биотканей.*

**Ключевые слова:** лазерная диагностика биотканей, культивирование клеток, молекулярные зонды, длительная люминесценция.

## 1. Введение

Оптические методы исследования нашли широкое применение в различных областях биологии и медицины, в том числе при разработке методов диагностики патологий в биотканях [1]. При оптической диагностике состояние биотканей или выделенных из них клеток обычно оценивают по интенсивности рассеяния света [2] или по спектрам флуоресценции эндогенных или экзогенных флуорофоров [3–6].

Основная проблема таких исследований – недостаточно высокая точность и воспроизводимость фотометрических измерений. Этих недостатков можно избежать, если в качестве измеряемого параметра выбрать не интенсивность полезного сигнала, а время жизни возбужденных состояний флуорофоров, оцениваемое по кинетике фотопроцессов с их участием. Для разработки методов диагностики требуются живые клетки. Обеспечить требуемую жизнеспособность клеток можно при выращивании их на специальных питательных средах.

В настоящей работе продемонстрирована возможность культивирования соматических клеток, выделенных из нормальных и патогенных тканей животных, в питательной среде «Гиаматрикс» и исследована кинетика длительной люминесценции экзогенных флуорофоров в таких клетках.

## 2. Объекты и методы исследования

Биоматериал «Гиаматрикс» представляет собой полимерную пластину, изготовленную методом фотохимической сшивки макромолекул в гидрогеле на основе нативной, химически не модифицированной гиалуроновой

кислоты [7, 8]. В гидрогель гиалуроновой кислоты добавлялись аминокислоты, микроэлементы, витамины и другие компоненты.

Клетки для культивирования выделялись из молочной железы здоровых самок мышей линии BYRB и особей со спонтанными злокачественными опухолями. Фрагменты ткани молочной железы помещались в раствор коллагеназы с концентрацией 0.5 мг/мл в фосфатном буфере (рН = 7.4) и инкубировались при температуре 37 °С [9].

После завершения ферментативной диссоциации полученную суспензию клеток наносили на биоматериал. Толщина пластины составляла 0.25 мм, плотность материала – 340 кг/м<sup>3</sup>. Биоматериал с клетками помещался в чашку Петри и инкубировался при стандартных условиях [10, 11].

Подготовка срезов биоматериала с клетками для фотографирования осуществлялась по стандартной методике приготовления гистологических препаратов. Электронные спектры поглощения полимерной пластинки измерялись на спектрофотометре Solar CM-2203, а ИК спектры поглощения и нарушенного полного внутреннего отражения – на фурье-спектрофотометре Varian 3100 FT-IR.

Структура биоматериала исследовалась с помощью сканирующего атомно-силового микроскопа (АСМ) СММ-2000. Для получения АСМ-изображений в воздушной среде использовались треугольные кантилеверы (жесткость 0.01 н/м) с пирамидальной иглой, имеющей радиус кривизны  $r \sim 15 - 25$  нм.

Кислородопроницаемость питательной среды исследовалась методом лазерного флеш-фотолиза и оценивалась по тушению молекулярным кислородом замедленной флуоресценции (ЗФ) и фосфоресценции молекулярных зондов, помещаемых в биоматериал. В качестве зондов использовались органические красители ксантенового ряда – эритрозин, бенгальский розовый и эозин. Выбор данного класса красителей обусловлен их спектрально-люминесцентными характеристиками: высоким

С.Н.Летута, В.С.Маряхина, Р.Р.Рахматуллин. Оренбургский государственный университет, Россия, 460018 Оренбург, просп. Победы, 13; e-mail: letuta@mail.osu.ru

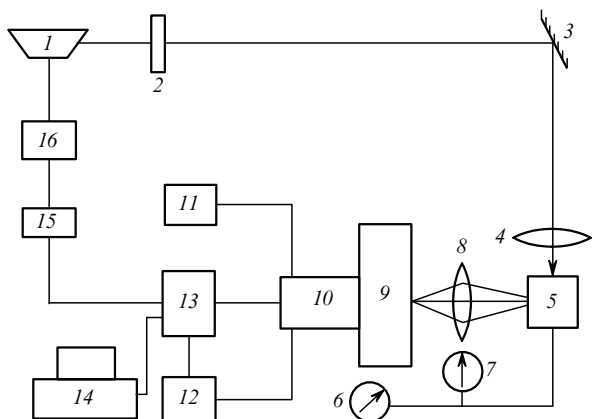


Рис.1. Схема экспериментальной установки:  
 1 – твердотельный Nd:YAG-лазер; 2 – светофильтр СЗС-22; 3 – поворотное зеркало; 4, 8 – фокусирующие линзы; 5 – вакуумируемая камера с исследуемыми образцами; 6 – вакуумный насос; 7 – манометр; 9 – монохроматор МДР-41; 10 – ФЭУ-84; 11 – блок питания ФЭУ-84; 12, 15 – генераторы импульсов; 13 – крест КАМАК; 14 – компьютер; 16 – блок питания и управления работой лазера.

квантовым выходом в триплетное состояние, интенсивной ЗФ и фосфоресценцией [12], хорошей растворимостью в воде, способностью проникать внутрь клеток [13].

Основой установки для исследования кинетики затухания ЗФ и фосфоресценции молекул красителя являлся твердотельный Nd:YAG-лазер, работающий в импульсно-периодическом режиме (рис.1). Для возбуждения молекул использовалось излучение на частоте второй гармоники ( $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ нм}$ ). Длительность импульса составляла 10 нс, а его энергия варьировалась от 10 до 50 мДж. Замедленная флуоресценция зондов регистрировалась с помощью монохроматора МДР-41 и ФЭУ-84. Образцы для исследования помещались в специальную вакуумируемую камеру. Давление воздуха (концентрация кислорода) над поверхностью окрашенного биополимера изменялась от 0.01 до 760 мм рт. ст. Скорость уменьшения давления воздуха в камере подбиралась такой, чтобы концентрация кислорода в клетках уменьшалась, но заметного испарения внутриклеточной жидкости или ее замерзания не происходило. Сбор, накопление и первичная обработка экспериментальных данных осуществлялись на автоматизированной установке, включающей в себя персональный компьютер и крест КАМАК с длительностью фронта переходной характеристики 200 нс.

### 3. Результаты и их обсуждение

На рис.2 представлена структура биополимера «Гиаматрикс». Размер области сканирования АСМ-изображения составлял  $1.7 \times 1.7 \text{ мкм}$ . Светлый отрезок на рис.2,а показывает участок, на котором исследовалась зависимость высоты рельефа  $h$  от координаты  $x$  (рис.2,б). Разность высот, на которых находятся начало и конец отрезка, равна 35.02 нм, а разность высот точек пересечения вертикальных маркеров с полученной зависимостью – 2.235 нм (маркерами отмечены границы полости). Координата первого маркера – 354.9 нм, а второго – 435.8 нм, т. е. размер полости составляет 80.88 нм. В целом по образцу размер полости между нитями изменяется от 50 до 200 нм.

Подобная пространственная организация материала придает питательной среде специфические свойства –

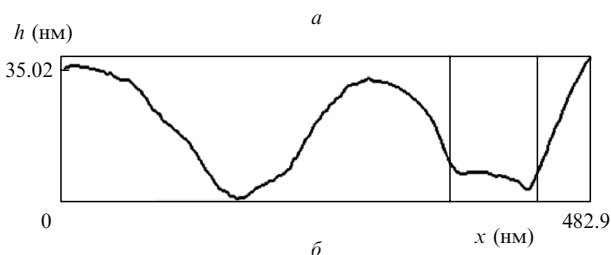
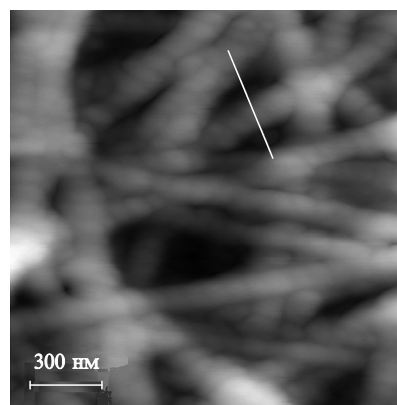


Рис.2. АСМ-изображение (а) и рельеф поверхности (б) биоматериала «Гиаматрикс» вдоль отрезка, показанного на рис.2,а.

пластичность, повышенную адгезию, дренажные качества, прозрачность и др., а также значительно улучшает биосовместимость за счет метаболизации материала в ходе культивирования клеток. Возможные изменения характера межмолекулярных взаимодействий при длительном облучении УФ излучением исследовались методом ИК спектроскопии. На рис.3 представлены ИК спектры поглощения питательной среды «Гиаматрикс» и полимерной пленки, полученной поливом исходного гидрогеля на подложку. После УФ облучения незначительно меняется соотношение интенсивностей полос поглощения и появляется новый максимум на длине волны, соответствующей  $870 \text{ см}^{-1}$ . Наиболее вероятными причинами возникновения этого максимума являются С–С-колебания, симметричные или асимметричные С–О–С-колебания либо деформационные колебания С–Н-групп. Однако в целом при используемых режимах УФ облучения заметной деградации среды не происходит и основная масса макромолекул не разрушается.

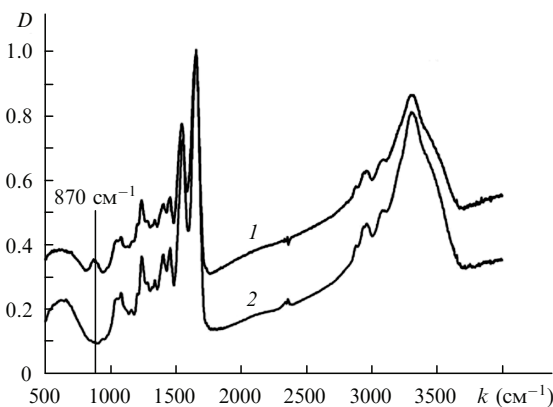


Рис.3. Нормированные ИК спектры поглощения биополимера «Гиаматрикс» (1) и полимера, полученного из исходного гидрогеля без УФ обработки (2).

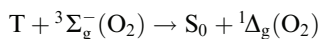
В электронных спектрах поглощения биоматериала проявляются два широких бесструктурных максимума в УФ области. За коротковолновое поглощение ( $\lambda < 230$  нм) в основном ответственны молекулы гиалуроновой кислоты, а длинноволновый максимум поглощения ( $\lambda = 280$  нм) обусловлен суммарным поглощением входящих в состав питательной среды аминокислот.

Для исследования кислородопроницаемости питательной среды и сравнения содержания кислорода в клетках, выделенных из различных тканей, экспериментально измерялась кинетика затухания длительной люминесценции органических красителей после импульсного фотовозбуждения. Замедленная флуоресценция – процесс, селективный по отношению к кислороду, который является эффективным тушителем триплетных состояний молекул-зондов [8–10]. По характеру затухания ЗФ можно однозначно судить о наличии или об отсутствии кислорода в среде.

Кинетическая кривая ЗФ эритрозина в полимерной пленке без клеток представляет собой экспоненту с константой скорости затухания  $K = 1.8 \times 10^4 \text{ с}^{-1}$ . Ксантеновые красители характеризуются небольшим синглет-триплетным расщеплением и обладают термоактивированной ЗФ (ТЗФ) [11, 12]. В отсутствие тушителей этот мономолекулярный процесс для эритрозина имеет время затухания около 700 мкс. Уменьшение времени жизни ТЗФ обусловлено наличием в среде тушителей триплетных состояний молекул. Изменение давления воздуха над поверхностью окрашенной полимерной пленки без клеток от 150 мм рт. ст. до атмосферного практически не влияет на кинетику ЗФ содержащихся в ней красителей. Это свидетельствует о проникновении эритрозина в места питательной среды, малодоступные для кислорода.

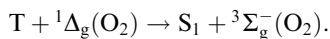
Культивируемые клетки располагаются преимущественно в тонком слое на поверхности биополимера. Анализ поперечных срезов биоматериала с клетками, окрашенными гематоксилин-эозином, указывает на то, что в приповерхностном слое фактически формируется монослой клеток.

Характер кинетики длительной люминесценции красителей в клетках существенно отличается от экспоненциального (рис.4). В клетках, находящихся в поверхностном слое питательной среды содержится кислород, который свободно диффундирует в жидкой внутриклеточной среде. При этом в ходе сенсibilизированного заселения в реакции



образуется синглетный кислород  ${}^1\Delta_g(O_2)$ .

В начальный момент времени концентрация  ${}^1\Delta_g(O_2)$ -возбужденный равна нулю и регистрируется только ТЗФ. Затем сигнал ЗФ нарастает в течение некоторого времени, придавая кинетической кривой типичный горбообразный вид. Как показано в [14–17], это обусловлено аннигиляцией оставшихся (непотушенных) триплетных возбужденных молекул красителя с мигрирующими молекулами  ${}^1\Delta_g(O_2)$ , в результате которой образуются синглетные состояния  $S_1$  флуорофоров, дающие дополнительный вклад в ЗФ:



Таким образом, регистрируемая кинетика ЗФ представляет собой суперпозицию двух различных по своей

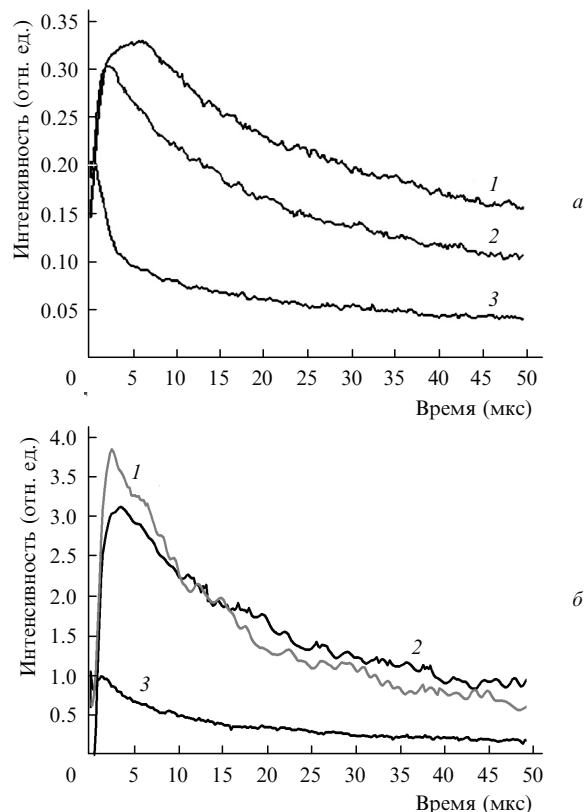


Рис.4. Кинетика затухания ЗФ эритрозина в клетках нормальной (1) и опухолевой (2) тканей, а также в биоматериале (3) при давлении воздуха над поверхностью образцов 150 мм рт. ст. (а) и при атмосферном давлении (б).

природе сигналов, каждый из которых содержит информацию о состоянии среды.

С изменением концентрации кислорода в клетках наблюдается изменение и интенсивности, и времени жизни ЗФ флуорофоров, что связано с активацией процесса аннигиляции  $T \rightarrow {}^1\Delta_g(O_2)$ . Из экспериментальных кривых отчетливо видно, что кинетика ЗФ в клетках изменяется с ростом давления воздуха над поверхностью образцов. Увеличение интенсивности сигнала и уменьшение времени его накопления свидетельствуют об увеличении концентрации кислорода в клетках [16, 17]. Заметим, что эффективная синглет-триплетная аннигиляция и «разгорание» ЗФ наблюдаются только в живых клетках.

При нормальных условиях в цитоплазме клеток доминирующим процессом, определяющим характер ЗФ эндогенных флуорофоров, является тушение их триплетных состояний молекулярным кислородом с последующей аннигиляцией  $T \rightarrow {}^1\Delta_g(O_2)$ .

Принимая это во внимание и полагая, что миграция молекул кислорода в клетках достаточно эффективна, для описания наблюдаемых процессов можно использовать формальный кинетический подход. Интенсивность суммарной ЗФ молекул в таком приближении определяется выражением [16, 17]

$$I_{DF}(t) = \varphi_n k_2 p_S N_T(t) N_{\Delta}(t) + \varphi_n k_1 N_T(t), \quad (1)$$

где  $\varphi_n$  – квантовый выход флуоресценции;  $p_S$  – вероятность образования состояний  $S_1$  молекул в реакции аннигиляции  $T \rightarrow {}^1\Delta_g$ ;  $k_1$  – скорость синглет-триплетной интеркомбинационной конверсии;  $k_2$  – скорость триплет-синглетной аннигиляции;  $N_T$  – концентрация молекул в

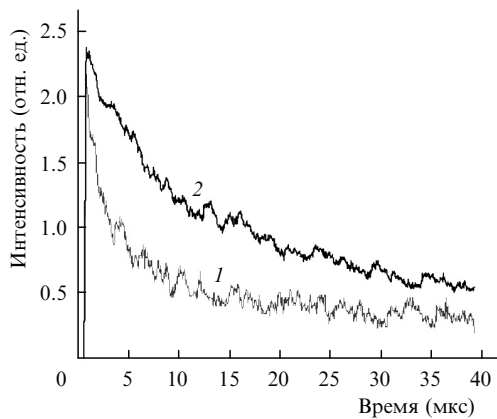


Рис.5. Кинетика затухания фосфоресценции эритрозина в клетках, выделенных из нормальной (1) и опухолевой (2) тканей.

триплетном состоянии;  $N_{\Delta}$  – концентрация синглетного кислорода.

Первое слагаемое в (1) определяет аннигиляционную составляющую люминесценции, а второе – термоактивационную. Кинетика  $I_{DF}(t)$  на малых временах обусловлена, главным образом, множителем  $N_{\Delta}(t)$  в аннигиляционной составляющей, поскольку вклад второго слагаемого в (1) невелик.

Как видно из рис.4,а, при давлении воздуха над поверхностью образцов 150 мм рт. ст. время «разгорания» ЗФ в клетках, выделенных из нормальной ткани (7 мкс), в два раза больше, чем в клетках патогенных тканей (3.5 мкс). При атмосферном давлении (рис.4,б) время жизни ЗФ для молекул в клетках нормальной и патогенной тканей составляет  $35 \pm 3$  мкс и  $20 \pm 2$  мкс соответственно.

В отличие от ЗФ, интенсивность фосфоресценции молекул с течением времени монотонно изменяется. На рис.5 показана кинетика затухания фосфоресценции эритрозина в клетках, выделенных из нормальной и опухолевой тканей, при атмосферном давлении. Длина волны излучения, на которой проводилась регистрация, составляла 680 нм. Отчетливо видно, что в клетках разного типа кинетика фосфоресценции различна. В патогенных клетках фосфоресценция тушится слабее, а время жизни триплетных состояний молекул красителей больше.

Кривые на рис.5 аппроксимируются функцией вида

$$I_{\text{phs}}(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2). \quad (2)$$

Значения параметров  $\tau_1$  и  $\tau_2$  для кривой 1 равны  $2.8 \pm 0.3$  мкс и  $55 \pm 5$  мкс, а для кривой 2 они составляют  $5.2 \pm 0.5$  мкс и  $41 \pm 4$  мкс.

Кинетика ЗФ и фосфоресценции измерялась в течение двух суток в процессе культивирования клеток. В течение этого времени изменений в кинетике процессов обнаружено не было.

В работе [18] высказано предположение о гипоксии в патогенных тканях. Результаты наших экспериментов согласуются с этим предположением.

#### 4. Заключение

Для исследования закономерностей длительной люминесценции экзогенных флуорофоров требуются клет-

ки, долгое время сохраняющие жизнеспособность. В качестве питательной среды для клеток можно использовать многокомпонентный биоматериал «Гиаматрикс». Такая питательная среда не только обеспечивает требуемую жизнеспособность клеток в условиях *in vitro*, но и максимально приближает условия экспериментов к условиям *in vivo*, поскольку по своим оптическим характеристикам практически не отличается от живых биотканей.

Надежно регистрируемые различия в кинетике длительной люминесценции экзогенных флуорофоров в клетках нормальных и патогенных биотканей можно использовать для разработки альтернативного метода лазерной флуоресцентной диагностики, основанного на измерении времени жизни триплетных состояний флуорофоров. Мы полагаем, что высокая чувствительность метода позволит обнаруживать патологические изменения в клетках на очень ранней стадии. В качестве экзогенных флуорофоров могут использоваться любые соединения, обладающие интенсивной ЗФ или фосфоресценцией и отвечающие требованиям, предъявляемым к таким препаратам по биологическим критериям.

Авторы выражают благодарность А.М.Салецкому и А.Н.Никияну за помощь в проведении экспериментов по ИК спектроскопии и туннельной микроскопии и полезное обсуждение результатов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09-02-99020) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор № 14 от 01.02.2010).

1. Ненашева Т.А., Машанов Г.И. *Биофизика*, **51**, 454 (2006).
2. Тучин В.В. *УФН*, **167**, 517 (1997).
3. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Меджидов Р.Т. *Оптика и спектроскопия*, **95**, 874 (2003).
4. Tchernyi V.V., Rogatkin D.A., Bychenkov O.A., Polyakov P.Y. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5693**, 336 (2005).
5. Fu Sh., Chia T.Ch., Kwek L.Ch., Diong Ch.H., Tang Ch.L., Choen F.S., Krishnan S.M. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5139**, 199 (2003).
6. Борисова Е., Троянова П., Павлова П., Аврамов Л. *Квантовая электроника*, **38**, 597 (2008).
7. Рахматуллин Р.Р., Поздняков О.А. Патент № 2367476. *БИ*, № 26, 12 (2009).
8. Рахматуллин Р.Р., Барышева Е.С., Рахматуллина Л.Р., Митрофанова И.Р. *Вестник Оренбургского государственного ун-та*, **6**, 88 (2010).
9. Летута С.Н., Маряхина В.С., Рахматуллин Р.Р., Забиров Р.А. Патент № 24009664. Приоритет от 29.04.2009.
10. Лежнев Э.И., Панкратов В.П., Кошевой Ю.В. *Управляемое культивирование клеток* (М.: Наука, 1974, с. 270).
11. Конки Д., Эрба Э., Фрешни Р., Гриффитс Б., Хэй Р., Ласнитски И., Маурер Г., Мораска Л., Вилсон Э. *Культура животных клеток* (М.: Мир, 1989, с. 321).
12. Rohatgi-Mukherjee K.K., Mukhopadhyay A.K. *Indian J. Pure Appl. Phys.*, **14**, 481 (1976).
13. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов* (М.: Наука, 1989, с. 277).
14. Kenner R.D., Khan A.U. *J. Chem. Phys.*, **64**, 1877 (1976).
15. Брюханов В.В., Кецле Г.А., Лауринас В.Ч., Левшин Л.В. *Оптика и спектроскопия*, **60**, 205 (1986).
16. Кучеренко М.Г., Кецле Г.А., Мельник М.П., Летута С.Н. *Изв. РАН. Сер. физич.*, **57**, 175 (1993).
17. Кучеренко М.Г., Кецле Г.А., Мельник М.П., Летута С.Н. *Оптика и спектроскопия*, **78**, 649 (1995).
18. Горенков Р.В., Карпов В.Н., Рогаткин Д.А., Шумский В.И. *Биофизика*, **52**, 711 (2007).