Новые подходы к трехмерной микроскопии живых клеток*

В.Рихтер, М.Ранг, А.Генрих, Х.Шнекенбургер

Описаны методы микроскопии для трехмерной визуализации живых клеток, в том числе их проблемы и ограничения. Представлены новые устройства, использующие эти методы в сочетании с оптической 3D-печатью.

Ключевые слова: *трехмерная микроскопия, флуоресценция, световой лист, оптическая 3D-печать.*

1. Введение

Для экспериментальных и доклинических исследований живых клеток традиционно используются двумерные клеточные культуры, т. к. их легко создать, однако значимость получаемых при этом результатов ограничена отсутствием у клеток физиологического микроокружения. Напротив, трехмерные (3D) культуры клеток, например многоклеточные опухолевые сфероиды, сохраняют свойства, похожие на свойства тканей, и, следовательно, обеспечивают более реалистичную основу для таких экспериментальных исследований, как диагностика тканей или скрининг фармацевтических агентов [1, 2]. Технологии 3D-культивирования обычно предотвращают прикрепление клеток к поверхностям, например с помощью метода висящей капли или нанесения на поверхности специальных покрытий. Трехмерные сфероиды можно выращивать из клеток различных типов, например клеток почек, молочной железы, печени и других органов (см., напр., обзор работ в [3, 4]). Хотя в трехмерных системах часто отсутствует сосудистая сеть, которая могла бы снабжать ткани кислородом и питательными веществами, в недавних работах сообщалось о полностью васкуляризированных органоидах [5]. В настоящей работе представлены результаты экспериментов с трехмерными сфероидами клеток яичника китайского хомячка, флуоресценция в которых определяется связанным с мембраной зеленым флуоресцентным белком (CHO-pAcGFP1-Mem).

Основные проблемы визуализации трехмерных образцов состоят в том, что толщина образца обычно превышает глубину резкости обычного микроскопа, а рассеяние света влияет на качество изображения. Поэтому предпочтительнее применять методы, основанные на оптическом послойном изображении, например на конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM) [6, 7], микроскопии со структурированным освещением (OS-SIM) [8] или на флуоресцентной микроскопии плоскостного освещения (LSFM) [9, 10]. В указанных методах изображения поочередно записываются в каждой из следующих друг за другом плоскостей, а результирующие трехмерные графики строятся уже в процессе последующей обработки. Проблема заключается в размещении трехмерных образцов в микроскопе с использованием, например, специальных кювет [11] или микролунок на предметных стеклах камеры (https://ibidi.com). В настоящей работе описывается возможность изготовления микролунок на предметных стеклах микроскопа или покровных стекол путем применения аддитивной технологии, а также использования получаемой 3D печатной оптики для определения местоположения и визуализации трехмерных опухолевых сфероидов.

2. Техника микроскопии

2.1. Методы

Часто диаметр трехмерных образцов (обычно не менее 100 нм) значительно превышает глубину резкости традиционного микроскопа. Следовательно, обычное широкопольное изображение состоит из изображения фокальной плоскости и множества несфокусированных изображений, так что результирующее изображение сильно размыто (рис.1,*а*). Для повышения качества изображения применяются методы оптического послойного изображе-

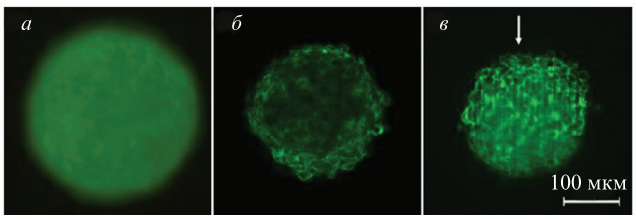

Рис.1. Изображения сфероидов клеток CHO-pAcGFP1-Mem, записанные с помощью обычной флуоресцентной микроскопии (*а*), конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (*б*) и флуоресцентной микроскопии с плоскостным освещением (*в*). На рис.1,*б* и *в* показаны плоскости на глубине 60 мкм. Стрелка указывает направление падения света (длина волны возбуждающего света 488 нм, флуоресценция детектируется при $\lambda \geqslant 505$ нм). Данный рисунок с некоторыми изменениями взят из работы [12].

* Перевод с англ. В.Л.Дербова.

V.Richter, H.Schneckenburger. Institute of Applied Research, Aalen University, 73430 Aalen, Germany;
e-mail: herbert.schneckenburger@hs-aalen.de
M.Rank, A.Heinrich. Center for Optical Technologies (ZOT), Aalen University, 73430 Aalen, Germany

Поступила в редакцию 8 октября 2021 г.

ния либо в широкопольном режиме, либо в режиме сканирования. При CLSM лазерный пучок сканирует образец точка за точкой, создавая таким образом двумерное изображение (обычно за несколько секунд). Точечная диафрагма в плоскости сопряженного изображения блокирует дефокусированный свет и позволяет получить изображение в сечении с высокой контрастностью (рис.1,*б*). Информация (например, флуоресценция) от отдельных плоскостей затем используется для реконструкции трехмерного изображения с помощью соответствующего программного обеспечения. Однако вся процедура требует сравнительно большого времени сканирования и яркого освещения, что может повредить живые образцы.

Альтернативная техника получения изображений основана на широкопольной микроскопии. Метод OS-SIM [8] позволяет отделить информацию, приходящую из плоскости фокусировки, от сигналов, генерируемых в плоскостях, не находящихся в фокусе. Для этого в плоскости образца получают изображения оптической решетки в трех фазовых положениях: $\Phi_1 = 0$, $\Phi_2 = 2\pi/3$ и $\Phi_3 = 4\pi/3$, с интенсивностями I_1, I_2 и I_3. По величине $I = [(I_1 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_3)^2]^{1/2}$ можно рассчитать изображение фокальной плоскости, тогда как суммирование дефокусированных изображений дает нуль [12]. При отклонении образца от вертикального положения можно отобразить ряд фокальных плоскостей и рассчитать трехмерное изображение. Полное время сбора данных и облучения светом такое же, как и при CLSM, поэтому риск радиационного повреждения живого образца также весьма высок. Решить данную проблему можно с помощью метода LSFM. В этом методе образец освещается сбоку (под углом 90° к оси микроскопа) с использованием либо цилиндрической линзы, либо сканирующего лазерного пучка. Для получения трехмерного изображения освещаемый слой и объектив микроскопа одновременно перемещаются в аксиальном направлении, так что освещаемая часть образца всегда находится в фокусе объектива (рис.1,*в*). Таким образом могут быть записаны *z*-стеки изображений с низким флуоресцентным фоном для расчета трехмерного изображения.

Основное преимущество LSFM перед OS-SIM заключается в том, что освещаются только те плоскости, изображения которых записываются одновременно, поэтому суммарная освещенность образца значительно ниже. В настоящее время доступны коммерческие микроскопы с плоскостным освещением (например, Carl Zeiss, Olympus, Nikon), а также технические решения с открытым исходным кодом или дополнения к существующим микроскопам [13, 14]. Метод OS-SIM недавно был объединен с другими инновационными методами, такими как спектральная визуализация или визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM) с использованием коррелированного по времени счета одиночных фотонов (TCSPC) [15], а также технологии с применением быстродействующих камер во временной [16] или в частотной области [17].

2.2. Проблемы и ограничения

Основной проблемой при визуализации трехмерных клеточных культур является рассеяние света, которое снижает качество изображений из-за ослабления света, размывания и потери контраста. Очевидно, что для трехмерных образцов эти проблемы более серьезны, чем для двумерных, поскольку рассеяние не только происходит в определенной плоскости обнаружения, но и создает фоновые сигналы от всего освещенного образца. Методы оптического послойного изображения (см. выше) уменьшают влияние рассеяния, как видно из рис.1. Однако использование CLSM обычно приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции в более глубоких слоях образца, а при LSFM рассеяние увеличивается в направлении распространения пучка. В этом случае неизбежны также полосы в направлении падения света (рис.1,*в*). Уменьшить рассеяние света можно за счет использования более длинноволнового освещения с более низким коэффициентом рассеяния (например, в многофотонной микроскопии [18, 19]) или путем согласования показателей преломления образца и окружающей среды. Такие методы оптического просветления все чаще применяются для визуализации глубоко лежащих слоев кожи, мозга и других органов, а также для трехмерных сфероидов [20], но, как правило, несовместимы с визуализацией живых клеток.

Все методы послойного изображения требуют многократного освещения, но только для LSFM каждое изображение получается из единственной освещенной плоскости, тогда как во всех других методах широкоугольного освещения и лазерного сканирования для изображения каждого слоя должен быть освещен весь образец. Это означает, что необходимая для получения трехмерного изображения суммарная доза облучения часто превышает предел фототоксичности. Допустимые световые дозы определены в [21] и находятся в диапазоне от 25 Дж/см^2 (375 нм) до 200 Дж/см^2 (633 нм) для культур естественных клеток, что соответствует освещению солнечными лучами (около 100 мВт/см^2) в течение 430 мин. При окрашивании клеток флуоресцентным красителем или трансфекции флуоресцентным белком типичные нефототоксичные световые дозы составляют ~10 Дж/см^2, что соответствует солнечному облучению в течение 100 с. Таким образом, если с помощью CLSM могут быть безопасно облучены лишь ~20 слоев трехмерного клеточного сфероида, то с помощью LSFM может быть освещено большое число слоев примерно по 100 раз каждый. Это делает микроскопию с плоскостным освещением предпочтительной для длительного наблюдения. Однако освещение образцов сбоку требует использования специальных держателей образцов. Подходящими устройствами представляются микрокюветы или коммерческие предметные стекла с несколькими лунками (см. выше), но для массового применения необходимы более гибкие дешевые и одноразовые компоненты. Поэтому в настоящее время нами проводятся исследования соответствия этим требованиям микрооптики, напечатанной на 3D-принтере. Первые результаты, касающиеся использования 3D печатной оптики для микроскопии плоскостного освещения в сочетании с гидрогелями, были опубликованы в работах [22, 23], однако нашей целью было применить более общую концепцию, подходящую для любого типа трехмерной клетки или образца ткани.

3. 3D печатная оптика

3.1. Методы

Основные требования к держателям образцов, напечатанным на 3D-принтере, таковы:

а *б*

Рис.2. Схема напечатанного на 3D-принтере держателя образца (микрокамеры) при плоскостном освещении и обычной микроскопии клеточного сфероида (*а*), а также напечатанные на 3D-принтере микрокамеры на предметном стекле микроскопа (*б*).

– использование стандартных процедур печати микрокамер на предметном или покровном стекле микроскопа;

– небольшой внутренний объем камеры с перпендикулярными стенками;

– высокая прозрачность и низкое рассеяние света печатным материалом.

В частности, небольшой внутренний объем необходим для точной локализации образца и для экономии (дорогих) питательных сред или реагентов, в то время как перпендикулярные и прозрачные стенки камеры нужны для высокого качества плоскостного освещения. Для печати квадратных камер с внутренней поверхностью 2 × 2 мм, высотой 0.1 мм и толщиной стенки 0.5 мм мы применяли стандартную систему проекционной микростереолитографии (PμSL) (Autodesk Ember) (рис.2). Смола, чувствительная к УФ излучению, отверждалась локально слой за слоем в соответствии с маской цифрового микрозеркального устройства (DMD). Многослойный процесс требует, чтобы стенки отделения для кювет были шириной в несколько пикселей. И широкая стенка, и слои вызывают рассеяние, которое влияет на результаты микроскопии. Поэтому была установлена модифицированная система печати, которая позволяет сделать стенки намного тоньше для большей прозрачности. В специально изготовленном 3D-принтере используется DMD-модуль из PμSL-системы для отверждения маски в капле смолы между двумя подложками в один слой. Когда УФ свет проникает в смолу через одну подложку, смола прилипает к ней, в то время как при соответствующих настройках (освещенность и продолжительность воздействия) другую подложку можно впоследствии удалить, чтобы смыть всю неотвержденную смолу. На рис.2,*а* схематически показано, как используется микрокамера для микроскопии с плоскостным и традиционным освещением, а на рис.2,*б* приведены напечатанные на специальном 3D-принтере микрокамеры на предметном стекле микроскопа. Могут применяться как одиночные микролунки, так и последовательности микрокамер. Единственное предварительное условие – это то, что они должны быть доступны для плоскостного освещения, создаваемого либо цилиндрической линзой, либо сфокусированным сканирующим лазерным пучком.

3.2. Применения

Используя напечатанные на 3D-принтере микрокамеры, мы провели тестовые эксперименты с модулем плоскостного освещения, адаптированным к инвертированному флуоресцентному микроскопу (Axiovert 200M, Carl Zeiss Jena, Германия) и лазеру на фотонно-кристаллическом волокне (NKT Photonics SuperK EXTREME с перестраиваемым на одну линию фильтром SuperK VARIA), работающим на длине волны 470 ± 20 нм и излучающим неполяризованный свет [13]. Для проверки качества плоскостного освещения фокусирующая цилиндрическая линза была повернута на 90°, так что плоскость засветки была ориентирована вертикально. Микролунка заполнялась флуоресцентным раствором (родамин 6Ж, 2.5 мкМ), поэтому с помощью одновременной флуоресцентной и просвечивающей микроскопии мы могли визуализировать перетяжку пучка (рис.3). На расстояниях от –100 мкм до +100 мкм от фокальной плоскости лазерного пучка размер перетяжки не превышал 10 мкм, как недавно было установлено для микрокапилляров [13]. Однако, в отличие от случая капилляров, пучок, показанный на рис.3, имеет некоторые особенности (пятна люминесценции), возникающие из-за рассеяния на стенке камеры и примесях на ее дне, которые также видны на рис.3 и обусловлены аддитивностью процесса изготовления.

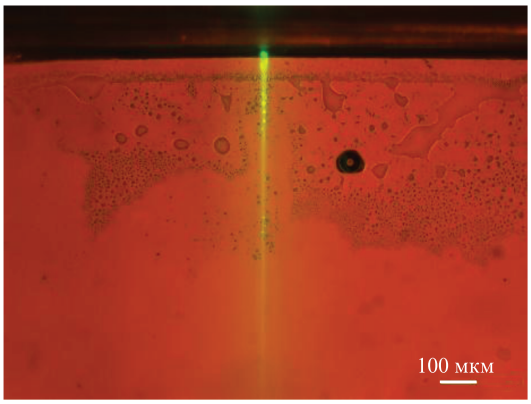

Рис.3. Плоскостное освещение в ячейке, напечатанной на 3D-принтере и содержащей раствор родамина 6Ж (2.5 мкМ), при трансмиссионной и флуоресцентной микроскопии (объектив $10^{\times}$/0.30; длина волны возбуждающего света λ_{ex} = 450–490 нм, длина волны флуоресценции $\lambda_{em} \geqslant$ 515 нм). В верхней части рисунка видна часть стенки камеры.

При возврате плоскости освещения в горизонтальное положение лазерный пучок больше не попадал на дно микролунки, и освещение стало более однородным. Затем метод LSFM применялся к сфероидам клеток CHO-pAcGFP1-Mem с шагом по вертикали 10 мкм (рис.4). На рис.4 на различных расстояниях от дна лунки показан слой клеток с зеленой флуоресценцией, связанной с мембраной. Тень в центральной части сфероида возникает из-за ослабления падающего и флуоресцентного света. Качество отдельных изображений, а также их трехмерной проекции аналогично таковому для микрокювет [13].

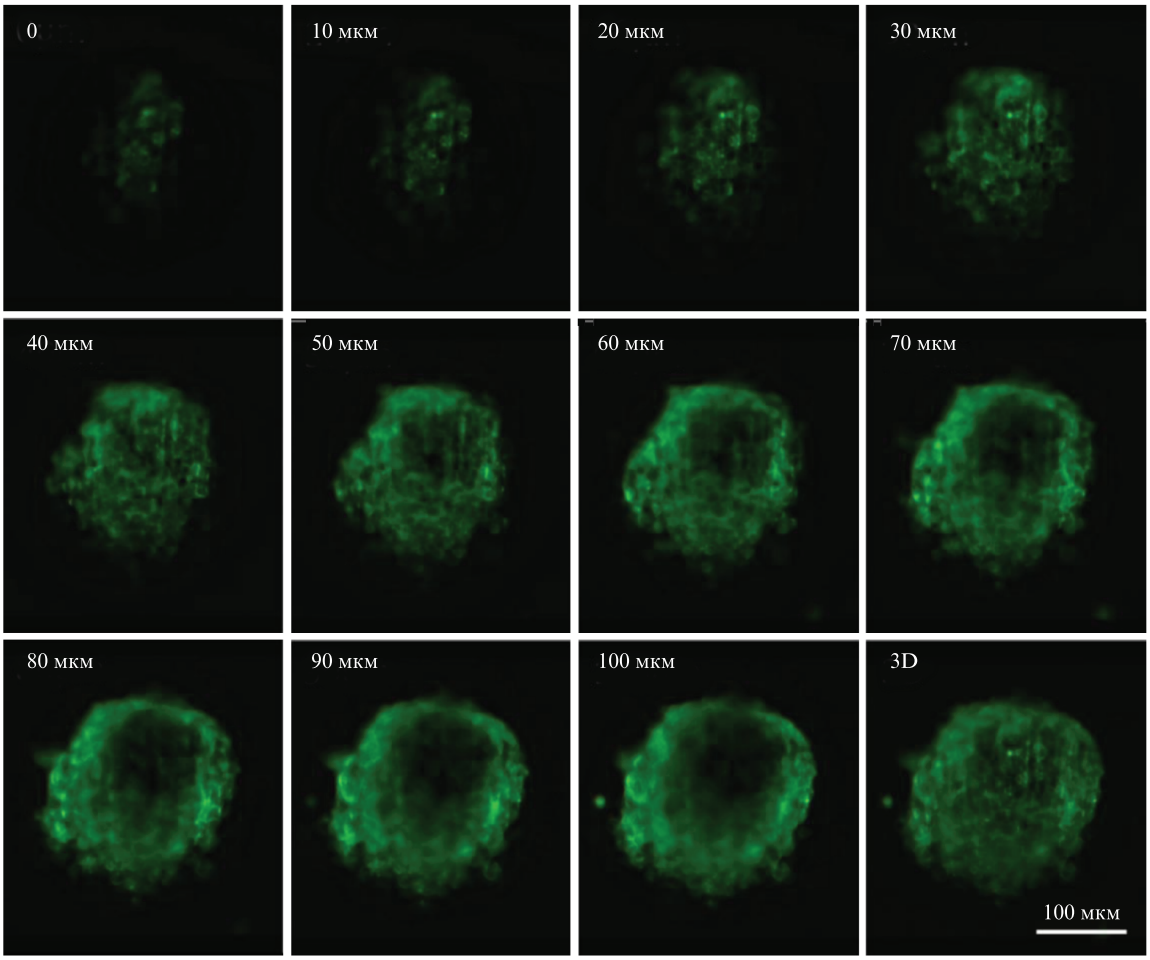

Рис.4. Микроскопические изображения при плоскостном освещении сфероида клеток CHO-pAcGFP1-Mem в лунке, напечатанной на 3D-принтере, на расстояниях 0 – 100 мкм (с шагом 10 мкм) от дна лунки, а также реконструированное 3D-изображение. Размер лунки 1.5 × 1.5 × 1 мм, толщина стенки 1 мм, объектив $10^{\times}$/0.3; λ_{ex} = 450 – 490 нм, $\lambda_{em} \geqslant$ 515 нм.

Время записи для каждого слоя составляло 1 с, а общая экспозиция была намного ниже критического уровня фототоксичности, равного 10 Дж/см^2 [21].

4. Обсуждение и перспективы

Как нами было показано, напечатанные на 3D-принтере лунки на предметных стеклах микроскопа являются привлекательной альтернативой микрокапиллярам или обычным микрокамерам, применяемым для локализации клеточных сфероидов в физиологических условиях. В частности, они имеют множество преимуществ для микроскопии плоскостного освещения, но подходят также и для традиционной просвечивающей или флуоресцентной микроскопии. При использовании объективов с высокой светосилой предметное стекло микроскопа необходимо заменить более тонкой пластиной, например покровным стеклом, при этом важна его механическая стабильность. Кроме того, при большем увеличении микроскопа важную роль играет чистота и однородность дна микролунок.

Микролунки, напечатанные на 3D-принтере, также можно использовать для микроскопии сверхвысокого разрешения за пределами критериев Аббе или Рэлея. Хорошо зарекомендовали себя такие методы, как микроскопия гашения (флуоресценции) вынужденным излучением (STED) [24] и микроскопия локализации одиночных молекул (SMLM) [25, 26], однако их применение чаще всего ограничивается качеством поверхности образцов. Микроскопия сверхвысокого разрешения со структурированным освещением (SR-SIM) двумя или тремя интерферирующими лазерными пучками перспективна для использования в трехмерных культурах клеток. Однако из-за рассеяния света контраст интерференционной картины обычно снижается на глубинах более 20 мкм (это также подтверждается нашими экспериментами [27]), так что применимость метода снова ограничивается слоями клеток, близкими к поверхности образца. В работе [28] сообщалось о большей глубине проникновения света, примерно до 100 мкм, с помощью новой технологии Lattice SIM, использование которой в сочетании с оптикой, напечатанной на 3D-принтере, может оказаться многообещающим. Хорошим компромиссом было бы применение усовершенствованных методов CLSM с заменой точечной диафрагмы на большее число детекторных устройств (сканирующая микроскопия Эйри или сканирующая микроскопия изображений – Airy scan microscopy or image scan microscopy). В данном случае возможно получение изображений при глубоком проникновении света с разрешением 100 – 200 нм. При этом весьма многообещающим является использование 3D печатной оптики для клеточных сфероидов или небольших образцов, полученных при биопсии.

Авторы благодарят К.Хинтце за квалифицированную техническую помощь.

Благодарим за финансирование Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, грант № HE-3533/7-2, «Genaue, flexible und modulare 6-dimensionale additive Fertigungsplattform mit individueller in-situ Analyse»).

1. Kunz-Schughart L.A., Freyer J.P., Hofstaedter F., Ebner R. *J. Biomol. Screening*, **9**, 273 (2004); https://doi.org/10.1177/1087057104 265040.
2. Wittig R., Richter V., Wittig-Blaich S., Weber P., Strauss W.S.L., Bruns T., Dick T.-P., Schneckenburger H. *J. Biomol. Screening*, **18**, 736 (2013); https://doi.org/10.1177/1087057113480525.
3. Van Ineveld R.L., Ariese H.C.R., Wehrens E.J., Dekkers J.F., Rios A.C. *J. Vis. Exp.*, **5** (160), e60709 (2020); https://doi.org/10.3791/60709.
4. Torres S., Abdullah Z., Brol M.J., Hellerbrand C., Fernandez M., Fiorotto R., Klein S., Königshofer P., Liedtke C., Lotersztajn S., Nevzorova Y.A., Schierwagen R., Reiberger T., Uschner F.E., Tacke F., Weiskirchen R., Trebicka J. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (6), 2027 (2020); https://doi.org/10.3390/ijms21062027.
5. Mansour A.A., Gonçalves J.T., Bloyd C.W., Li H., Fernandes S., Quang D., Johnston S., Parylak S.L., Jin X., Gage F.H. *Nat. Biotechnol.*, **36**, 432 (2018); https://doi.org/10.1038/nbt.4127.
6. Pawley J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (Boston, MA, USA: Springer, 1990); https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2.
7. Webb R.H. *Rep. Prog. Phys.*, **59**, 427 (1996); https://doi.org/10.1088/0034-4885/59/3/003.
8. Neil M.A., Juskaitis R., Wilson T. *Opt. Lett.*, **22** (24), 1905 (1997); https://doi.org/10.1364/OL.22.001905.
9. Pampaloni F., Chang B.-J., Stelzer E.H.K. *Cell Tissue Res.*, **362** (1), 265 (2015); https://doi.org/10.1007/s00441-015-2144-5.
10. Santi P.A. *J. Histochem. Cytochem.*, **59** (2), 129 (2011); https://doi.org/10.1369/0022155410394857.
11. Bruns T., Schickinger S., Schneckenburger H. *J. Vis. Exp.*, **90**, e51993 (2014); https://doi.org/10.3791/51993.
12. Schneckenburger H., Richter V. *Photonics*, **8**, 275 (2021); https://doi.org/10.3390/photonics8070275.
13. Bruns T., Bauer M., Bruns S., Meyer H., Kubin D., Schneckenburger H. *J. Microsc.*, **264** (3), 261 (2016); https://doi.org/10.1111/jmi.12439.
14. Greger K., Swoger J., Stelzer E.H.K. *Rev. Sci. Instrum.*, **78**, 023705 (2007); https://doi.org/10.1063/1.2428277.
15. Hirvonen L.M., Nedbal J., Almutairi N., Phillips T.A., Becker W., Conneely T., Milnes J., Cox S., Stürzenbaum S., Suhling K. *J. Biophotonics*, **13** (2), e201960099 (2020). DOI: 10.1002/jbio.201960099.
16. Weber P., Schickinger S., Wagner M., Angres B., Bruns T., Schneckenburger H. *Int. J. Mol. Sci.*, **16** (3), 5375 (2015). DOI: 10.3390/ijms16035375.
17. Mitchell C.A., Poland S.P., Seyforth J., Nedbal J., Gelot T., Huq T., Holst G., Knight R.D., Ameer-Beg S.M. *Opt. Lett.*, **42** (7), 1269 (2017). DOI: 10.1364/OL.42.001269.
18. König K. *J. Microsc.*, **200** (Pt 2), 83 (2000); https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00738.x.
19. Miller D.R., Jarrett J.W., Hassan A.M., Dunn A.K. *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, **4**, 32 (2017); https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.09.004.
20. Costa E.C., Silva D.N., Moreira A.F., Correia I. *Biotechnol. Bioeng.*, **116** (19), 2742 (2019); https://doi.org/10.1002/bit.27105.
21. Schneckenburger H., Weber P., Wagner M., Schickinger S., Richter V., Bruns T., Strauss W.S.L., Wittig R. *J. Microsc.*, **245**, 311 (2012); https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03576.x.
22. Desmaison A., Lorenzo C., Rouquette J., Ducommun B., Lobjois V. *J. Microsc.*, **251** (2), 128 (2013). DOI: 10.1111/jmi.12051.
23. Jeandupeux E., Lobjois V., Ducommun B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463** (4), 1141 (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.072.
24. Wildanger D., Medda R., Kastrup L., Hell S.W. *J. Microsc.*, **236** (1), 35 (2009). DOI: 10.1111/j.1365-2818.2009.03188.x.
25. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F. *Science*, **313** (5793), 1642 (2006). DOI: 10.1126/science.1127344.
26. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. *Nat. Methods*, **3** (10), 793 (2006). DOI: 10.1038/nmeth929.
27. Шнекенбургер Х., Рихтер В., Геллери М., Ритц С., Ваз Пандельфо Р., Шок Ф., фон Хазе Дж., Бирк У., Кремер С. *Квантовая электроника*, **50** (1), 2 (2020) [*Quantum Electron.*, **50** (1), 2 (2020). DOI: 10.1070/QEL0000].
28. Chen B.C. et al. *Science*, **346** (6208), 1257998 (2014). DOI: 10.1126/science.1257998.