

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНО-ТКАНЕВЫХ ИМПЛАНТАТОВ, НАХОДИВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ НЕВЕСОМОСТИ

П. Е. Тимченко¹, Е. В. Тимченко¹, Л. А. Жердева¹, Н. В. Белоусов¹,
Л. Т. Волова², В. В. Россинская², В. В. Болтовская², Е. И. Пугачев²

В работе представлены результаты исследований процесса интеграции клеток в составе клеточно-тканевых имплантатов, находившихся в условиях невесомости, с помощью комплекса методов конфокальной флуоресцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Изучено влияние факторов космического полета на процессы жизнедеятельности клеток опорно-двигательной системы человека.

Ключевые слова: интеграция клеток, имплантат, флуоресценция, космический полёт, конфокальная микроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния.

Введение. Изучение процессов жизнедеятельности и развития соединительных и опорных тканей живых организмов *in vitro* в условиях космического полета ведётся с начала освоения космоса [1, 2]. Десятилетия исследований показали, что отсутствие гравитации меняет морфологическое состояние клеток, их пролиферативную активность, экспрессию генов и другие внутриклеточные процессы. Особенно выражены эти эффекты у дифференцированных клеток, таких как остециты, фибробласты, миоциты, эндотелиальные клетки. Эти изменения проявляются нарушениями опорно-двигательной системы у космонавтов [3].

Соответственно, дальнейшее изучение влияния физических факторов в условиях невесомости на активность культур клеток хондробластического дифференцирования является особенно актуальным. Одним из информативных методов исследования состояния

¹ Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С. П. Королева (национальный исследовательский университет), 443086 Россия, Самара, ул. Московское шоссе, 34; e-mail: timpavel@mail.ru.

² Институт экспериментальной медицины и биотехнологий (ИЭМБ) СамГМУ, 443079 Россия, Самара, ул. Гагарина, 20.

клеток, заселенных в бионоситель, является метод конфокальной, в том числе конфокальной флуоресцентной микроскопии [3], который обеспечивает увеличение контраста изображения за счет применения сфокусированного излучения и диафрагмирования рассеянного излучения в плоскости наблюдения. К достоинствам лазерной флуоресцентной конфокальной микроскопии относятся возможности селективной визуализации отдельных органелл при использовании соответствующих флуорофоров и наблюдения клеток в естественных условиях. Благодаря этому флуоресцентная конфокальная микроскопия оказалась оптимальным методом для изучения состояния клеток и самого имплантата [4, 5].

Целью работы являлось применение оптических методов для оценки жизнеспособных клеток в составе клеточно-тканевых имплантатов, находившихся в условиях невесомости.

Материалы и методы. Для исследований была использована биологическая модель (патент №143101 от 30.12.2013) [6], которая представляет собой трехмерный пористый бионоситель (деминерализованная губчатая кость, основными этапами обработки которой являются воздействие ультразвуком, раствором соляной кислоты и лиофилизация), заселенный культурами клеток и помещенный в целиком заполненную ростовой средой герметично закрытую емкость. Клетки выращивали в лаборатории культуры клеток ИЭМБ СамГМУ: образцы фибробластов культивировались из дермы человека по методике Гринберга и соавторов [7], а образцы хондробластов – из гиалинового хряща человека по методике Бриттберга [8] в собственной модификации.

Клетки высевали на 3D-носитель в дозе 2000 клеток на 1 мм³. Полученный клеточный продукт помещали в пробирки (Spektr, Сербия) объемом 4 мл, заполненные ростовой средой, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО “Биолот”, Россия). Экспериментальный материал в количестве 12 пробирок был доставлен на борт непилотируемого космического аппарата (КА) “БИОН-М” № 1 и культивировался в течение всего полёта (30 суток) при постоянной температуре 37 °С с использованием научной аппаратуры “Биоконт-Б”. Для сопоставления результатов аналогичная группа образцов культивировалась и на Земле с периодичностью контроля 1 неделя. Дополнительным контролем чистоты опыта служил пустой 3D-носитель, помещённый в аналогичную ростовую среду. pH ростовой среды контролировали непосредственно перед полётом и сразу же после доставки материала в ИЭМБ.

Изучение процесса интеграции клеток в костный имплантат проводилось с помощью стенда флуоресцентной конфокальной микроскопии, описанного в работах [4, 5]. В ка-

честве флуорофора использовался пропидиум йодид (propidium iodide, PI Sigma Aldrich США), который концентрируется в цитоплазме клеток, полоса его возбуждения имеет максимум на 535 нм, а полоса испускания на 617 нм.

В качестве вспомогательного метода исследования структурного состава бионосителя был использован стенд для спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) [9] (обработка данных в программной среде Mathematica'8).

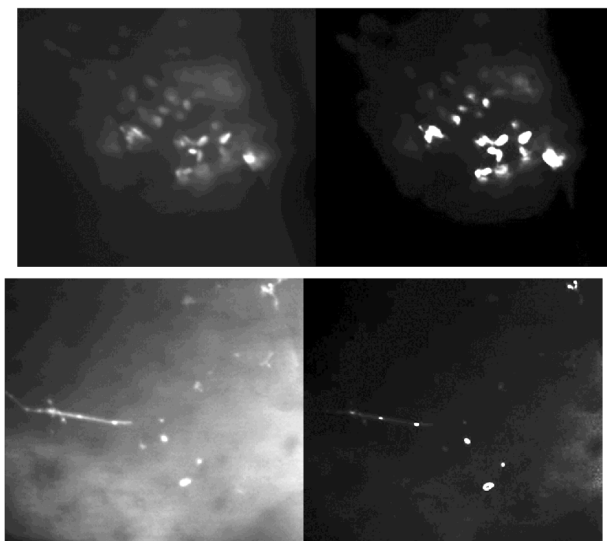


Рис. 1: Микроснимки костного имплантата, находившегося в наземных условиях (верхние) и в условиях невесомости (нижние): до обработки (слева), после обработки (справа) в программе “ANDOR IQ” (размер снимков 400 × 400 мкм).

Результаты исследований. Далее представлены микроснимки костных бионосителей (рис. 1), находившихся в наземных условиях и в условиях невесомости на космическом аппарате (КА), с зарегистрированными хондробластами. Для контроля заселённости экспериментальных имплантатов была использована следующая формула:

$$\eta = \frac{S_a}{S_b}, S_a = n \times \sigma,$$

где η – относительная площадь клеток, n – среднее количество клеток на 400 × 400 нм микроснимка, σ – средняя площадь i -той клетки, S_b – площадь кадра. В результате в объектах, побывавших в условиях невесомости, интегрированные в имплантат клетки были зарегистрированы на 3% поверхности имплантата, а в объектах, побывавших в наземных условиях, – на 20%. Экспериментально выявлено, что средняя площадь

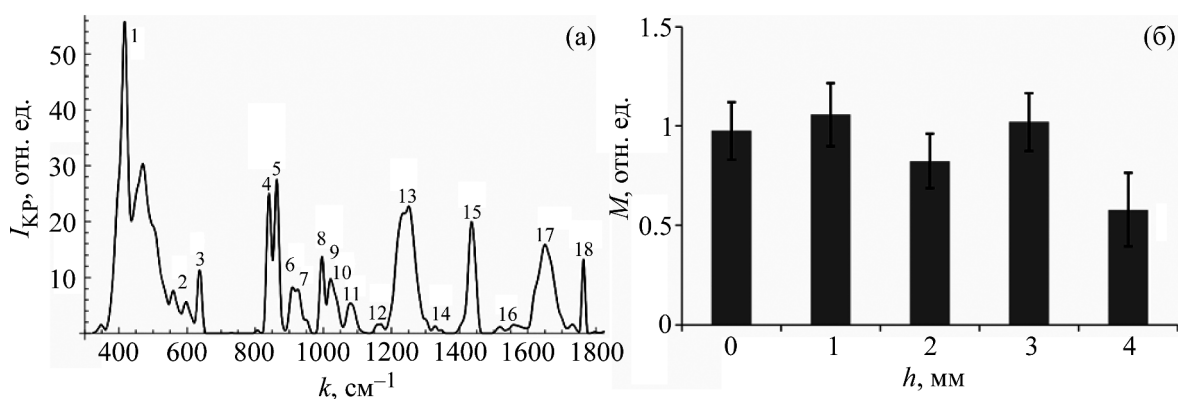


Рис. 2: (а) спектр КР бионосителя; (б) зависимость коэффициента M от глубины слоя.

клетки σ в космосе на 23% меньше, чем в наземных экспериментах. А также количество зарегистрированных клеток в наземных образцах выше.

Для проверки однородности имплантатов были проведены эксперименты по исследованию их поверхности. Характерный спектр КР (усреднённый по 7 спектрам, погрешность в пределах 10%) костного имплантата (снято с приповерхностного слоя), находившегося в наземных условиях, представлен на рис. 2 с соответствующими линиями (табл. 1). Как можно видеть из рисунка, в спектре линии 960 и 1070 cm^{-1} слабо выражены, что говорит о низком содержании минеральных компонент образца.

Также было проведено послойное исследование спектров КР бионосителя размером $4 \times 5 \times 4$ мм (контролировалась центральная область слоя) с шагом $1.0 \text{ мм} \pm 0.1 \text{ мм}$. В качестве контролируемых критериев было выбрано отношение интенсивности линии 960 и 1660 cm^{-1} (соотношение минеральной и органической составляющих):

$$M = \frac{I_{(PO_4)^{3-}}}{I_{amidI}}$$

На рис. 2(б) представлена зависимость параметра M в зависимости от глубины слоёв образца бионосителя (0, 1; 2; 3 и 4 мм, 0 и 4 мм – противоположные поверхности трансплантата), находившегося в наземных условиях.

Результаты ЛДГ-теста. Проводились биохимические исследования экспериментального материала: активность ЛДГ (лактатдегидрогеназа – фермент, вырабатывающийся при жизнедеятельности клеток) в среде была выше в 7 раз в образцах, побывавших в условиях невесомости, что говорит об активности клеток в космосе. В космическом эксперименте активность хондробластов была выше почти в 2 раза, чем активность фибробластов.

Т а б л и ц а 1

Расшифровка спектров КР

N	$k, \text{см}^{-1}$	Колебание, составляющая
1	429	$\nu_2 (\text{PO}_4)^{3-}$, гидроксиапатит
2	527, 581, 609	$\nu_4 (\text{PO}_4)^{3-}$, гидроксиапатит
3	648	$\nu_4 (\text{PO}_4)^{3-}$, гидроксиапатит
4	852	$\nu (\text{C-C})$, пролин
5	875	$\nu (\text{C-C})$, гидроксипролин
6	921, 936	$\nu (\text{C-C})$, пролин
7	960	$\nu_1 (\text{PO}_4)^{3-}$, гидроксиапатит
8	1006	$\nu (\text{C-C})$, фенилаланин
9	1031, 1045	$\nu_3 (\text{PO}_4)^{3-}$, гидроксиапатит
10	1070	$\nu_1 (\text{CO}_3)^{2-}$ тип В, $(\text{PO}_4)^{3-}$ замещен $(\text{CO}_3)^{2-}$
11	1100	$\nu_1 (\text{CO}_3)^{2-}$ тип А, ОН-замещен $(\text{CO}_3)^{2-}$
12	1204	$\omega (\text{CH}_2)$, тирозин и гидроксипролин
13	1242, 1268	$\nu (\text{C-N})$ и $\delta (\text{N-H})$, Амид III
14	1340	$\nu (\text{C-N})$ и $\delta (\text{N-H})$, Амид III
15	1445	$\delta (\text{CH}_2, \text{CH}_3)$, коллаген
16	1530, 1570	$\delta (\text{N-H})$ и $\nu (\text{C-N})$, Amide II
17	1660	$\nu (\text{C=O})$, Амид I (коллаген I типа)
18	1740, 1774	$\nu (\text{C=O})$, липиды

Т а б л и ц а 2

Активность ЛДГ мкм/мл в модельных объектах с клетками

Тип клеток	Космический эксперимент			Наземный эксперимент		
	В среде	В лизате	Суммарная	В среде	В лизате	Суммарная
Хондробласты	416.0	35.5	451.5	57.0	0	57.0
Фибробласты	246.4	15.6	262.0	156.7	0.2	156.8

Выводы. Конфокальный флуоресцентный микроскопический анализ показал, что клетки проникают в имплантат, расселяясь по его внутренней поверхности в сообщающиеся открытые поры с частым закреплением клеток в микропорах. Клетки в космическом эксперименте выявлены на 3-х % поверхности имплантата, а в наземном эксперименте – на 20-ти%. В результате анализа выявлено, что в условиях невесомости клетки,

несмотря на большую активность (согласно анализу активности ЛДГ), значительно хуже прикрепляются к имплантату, при этом продолжают находиться в питательной среде вне имплантата. Проведено исследование неоднородности состава и структуры имплантатов с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. Полученные выводы подтверждены результатами морфологического анализа и биохимических методов контроля.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] Н. А. Константинова, *Кандидатская диссертация в области биологических наук* (ГНЦ РФ-ИМБП РАН, Москва, 2008).
- [2] М. Г. Таирбеков, *Молекулярные и клеточные основы гравитационной чувствительности* (М., изд-во Института медико-биологических проблем, 2002).
- [3] Robert H. Webb, *Rep. Prog. Phys.* **59**, 427 (1996).
- [4] Л. Т. Волова, В. В. Болтовская, В. В. Россинская и др., *Технологии живых систем* **10**(8), 21 (2013).
- [5] P. E. Timchenko, E. V. Timchenko, V. P. Zakharov, et al., *Pacific Science Review* **3**, 182 (2011).
- [6] Л. Т. Волова, В. В. Россинская, В. В. Болтовская и др., “Устройство для культивирования клеток во время беспилотного космического полета”. Патент РФ на полезную модель № 143101 от 30.12.2013.
- [7] К. Н. Гринберг, В. И. Кухаренко, В. Н. Ляшко и др., *Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней* (Л., Наука, 1988).
- [8] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, et al., *Nord Med.* **110**(12), 330 (1995).
- [9] E. V. Timchenko, P. E. Timchenko, L. T. Volova, et al., *Proc. SPIE* **9198**, 17 (2014).

По материалам IV Международной молодежной научной школы-конференции “Современные проблемы физики и технологий”.

Поступила в редакцию 12 мая 2015 г.