

ПРИЖИЗНЕННОЕ ИЗМЕРЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa**© Ю. П. Петров,¹ Е. С. Божокина, Н. В. Цупкина***Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*¹ *электронный адрес: yure3ov@mail.ru*

На живых интактных клетках постоянной линии HeLa изучали возможность использования светопоглощения, формирующего изображение клеток при обычной световой микроскопии, в качестве количественной характеристики, аналогичной параметру «оптическая плотность», используемому в спектрофотометрии. Предлагаемый способ регистрации оптической плотности может быть использован в качестве количественной характеристики как клетки в целом, так и ее отдельных структур, что продемонстрировано примерами. Показано, что клетки данной популяции, входящие в разные клоны, по оптической плотности отличаются друг от друга. Кроме того, продемонстрирована корреляция между площадью периферических участков клеток с высокой оптической плотностью и локализацией в них фибриллярного актина.

Ключевые слова: интактные клетки, световая микроскопия, оптическая плотность.

Успехи современной клеточной биологии в значительной степени обусловлены использованием высокотехнологичных методов исследования, например таких, как конфокальная микроскопия (Nwaneshiudu et al., 2012) и лазерно-сканирующая цитометрия (Pozarowski et al., 2013). Информативность получаемых при этом результатов безусловно высока, и это, по-видимому, можно считать главной причиной того, что работы с использованием обычной световой микроскопии становятся менее популярными. Однако, как нам кажется, отказываться от световой микроскопии как исследовательского метода еще рано. Ее основное преимущество — легкость в использовании и доступность для большинства клеточных биологов, а с исследовательской точки зрения — возможность анализа интактных клеток, особенно при наблюдении за ними во времени (Петров, Цупкина, 2012). Соединение микроскопа с компьютером и цифровой камерой позволяет проводить не только качественный, но и количественный анализ клеток. Поэтому можно надеяться, что данная методика еще долго будет иметь свою исследовательскую нишу.

Визуализация клеток в процессе их культивирования с помощью инвертированного светового микроскопа возможна потому, что клетки, поглощая часть света, становятся доступными для наблюдения. При этом можно видеть не только сами клетки, но и дифференцировать некоторые внутриклеточные структуры. Если возможна визуальная оценка индивидуальной морфологии клеток при прохождении через них видимого света, то, как следствие, должна проявляться их индивидуальность в количестве поглощенного света. Это количество можно оценить, анализируя цифровые изображения клеток с помощью различных компьютерных программ.

В спектрофотометрии для оценки поглощения света существует понятие «оптическая плотность» (Гороховский, Левенберг, 1963). Оптическая плотность — величина

безразмерная, характеризующая отношение количества падающего света к поглощенному и рассеянному. Иными словами, с помощью этого параметра можно оценить степень ослабления светового потока при его прохождении через какую-либо среду. Поэтому мы не видим принципиального различия между классическим понятием «оптическая плотность» и поглощением света клетками при световой микроскопии.

Цель данной работы — экспериментальное обоснование использования световой микроскопии как метода спектрофотометрии живых интактных клеток в культуре и введение параметра «оптическая плотность» для характеристики клеточной индивидуальности.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использованы клетки постоянной линии HeLa-M (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри (35 мм; Nunc, Дания) на среде DMEM (Gibco, США), в атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. В питательную среду добавляли 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл гентамицина. Клетки рассеивали с плотностью (3—4) · 10³ кл./см².

Клетки, используемые для конфокальной микроскопии, выращивали на стеклах, помещенных в чашки Петри, на среде Игла-МЕМ (Биолот, Россия) с добавлением 1 % NEAA (Sigma, США) и 10 % эмбриональной сыворотки коров (HyClone, США) в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C в течение 48 ч. Клетки промывали PBS (Sigma, США) и фиксировали 3.7%-ным формальдегидом в PBS (10 мин при 18—20° C), затем инкубировали 5 мин в

0.1%-ном растворе Triton X-100 в PBS и трижды промывали PBS.

Для визуализации F-актина клетки окрашивали родамин-фаллоидином (Sigma, США) в течение 15 мин, затем трижды промывали PBS. Клетки исследовали с помощью лазерно-сканирующего микроскопа Leica SP5 TCS с использованием гелий-неонового лазера (534 нм, красная флуоресценция) и микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal с объективом Plan-Apochromat 63X/1.40 DIC oil (Carl Zeiss).

Цифровые изображения живых интактных клеток получали, используя инвертированный световой микроскоп Nikon ECLIPSE TS100, объектив 20×, цифровую камеру Canon EOS 1000D, разрешение 2816×1880 пикселей, запись файлов в формате JPEG. Время регистрации 24—48 ч после посева.

Цифровые изображения клеток анализировали с помощью программы ImageJ 1.47j (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Регистрировали два параметра. Первый параметр — площадь проекции клетки на подложку (далее площадь клетки), измеренную в пикселях (контуры клеток обводили вручную). Поскольку все расчеты проводили с использованием относительных величин, перевод площади клеток в обычные метрические величины не имел смысла. Второй параметр — средняя яркость клеток (либо всей клетки, либо ее фрагментов), рассматриваемая нами как аналог оптической плотности, используемой при обычной спектрофотометрии. Цифровые изображения клеток получали при автоматическом выборе экспозиции.

При обычной световой микроскопии применяли зеленый светофильтр. Поскольку съемку вели в автоматическом режиме при небольших количествах клеток в поле зрения, полагали, что отклонения яркости фона от среднего значения были настолько малы, что не оказывали существенного влияния на величины оптической плотности отдельных клеток и могли рассматриваться как «шум». Использование одного и того же зеленого светофильтра во всех случаях также не могло сказываться на достоверности полученных результатов.

Все цветные (и зеленые, и красные) изображения перед анализом на компьютере переводили в 8-битные черно-белые. Число разрядов яркостей каждого пикселя в цифровом эквиваленте имело равномерную шкалу от 0 до 255. Иными словами, в данном случае оптическая плотность измерялась в условных единицах яркости от черного (0) до белого (255). Строго говоря, автоматически вычисляемый программой ImageJ параметр «mean» не является средним значением яркости данной клетки. Это среднее значение яркости одного пикселя, поскольку является частным от деления суммарной яркости всех пикселей, составляющих площадь данной клетки, на их общее количество. Эта величина, так же как оптическая плотность в ее классическом варианте, является относительной и безразмерной и может быть использована для оценки степени поглощения света как всей клетки, так и ее фрагментов. Рассчитывая общее число пикселей данной клетки (т. е. ее площадь) и измеряя яркость каждого из них, программа ImageJ позволяет в автоматическом режиме строить гистограммы распределения яркостей всех выделенных пикселей.

Для статистической обработки данных, построения графиков и диаграмм кроме программы ImageJ использовали Excel 2010 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США).

Результаты и обсуждение

Прежде чем говорить о каких-либо специфических различиях клеток в популяции, необходимо определить, с какой точностью можно регистрировать сходство клеток по тем или иным параметрам. Ранее для определения степени схождения мигрирующих по подложке дочерних клеток мы использовали введенные нами параметры — показатель идентичности и показатель синхронности (Петров и др., 2012). Их можно рассчитать на основании данных, полученных при измерении площади клеток в процессе их расплывания по субстрату. При этом было показано, что после митоза пары дочерних клеток при прохождении клеточного цикла (т. е. до следующего митоза) в каждый данный момент времени имеют наименьшие различия по площади в отличие от любых других пар клеток этой же популяции. Данные были получены на клетках линии L-929. Однако можно ожидать, что тот же результат может быть получен и на клетках других линий, в том числе и на клетках HeLa. В настоящей работе мы решали обратную задачу, исходя из следующего предположения. Если две клетки расположены рядом, но на значительно большем расстоянии от других пар клеток, то с высокой вероятностью эти пары можно считать «близнецами», т. е. дочерними клетками. Пример таких клеток и их взаиморасположение демонстрирует рис. 1.

Для анализа площади клеток в случайном порядке были отобраны изображения 100 подобных пар клеток с использованием как различных полей зрения, так и различных чашек. Также в случайном порядке из них были сформированы две выборки соответственно по 100 клеток в каждой, при этом из каждой предполагаемой пары дочерних клеток в первую группу входила одна из двух клеток, а во вторую — оставшаяся. Для удобства изложения обозначим клетки первой группы как «нечетные», а второй — как «четные». Очевидно, что размер клеток имеет определенную дисперсию, но поскольку их отбор в каждую выборку был случайным, различий между вы-

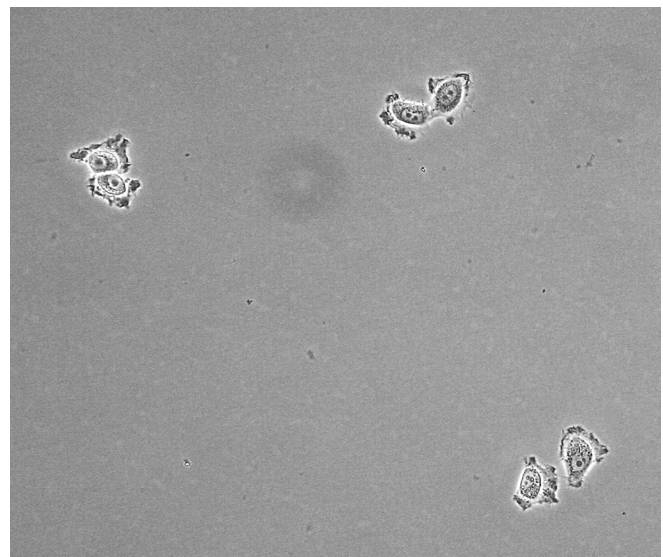


Рис. 1. Пример взаимного расположения пар клеток HeLa-M, предположительно указывающий на то, что это пары дочерних клеток.

Объяснение в тексте.

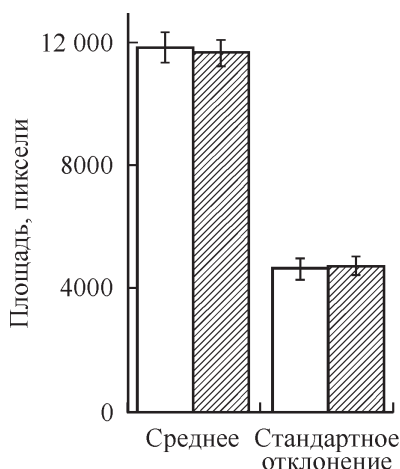


Рис. 2. Средние значения и стандартные отклонения с соответствующими ошибками (вертикальные отрезки) площади 100 пар «нечетных» (светлые столбцы) и «четных» (затрихованные столбцы) клеток.

Отсутствие достоверных различий по этим параметрам указывает на то, что обе выборки по площади клеток принадлежат к одной и той же совокупности. По вертикали — число пикселей.

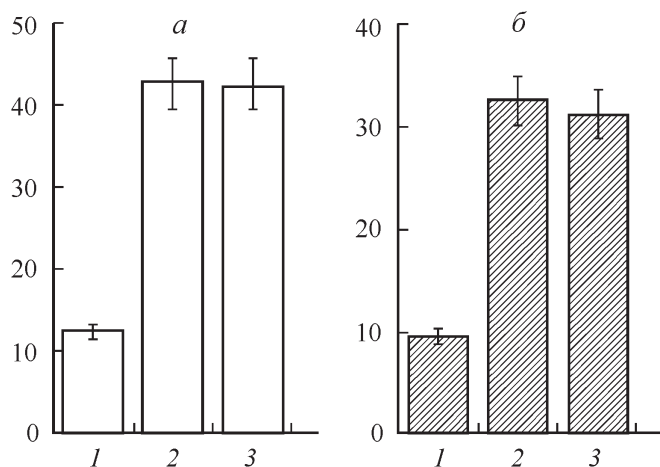


Рис. 3. Показатель идентичности (а) и показатель синхронности (б), рассчитанные по данным площади 100 пар клеток.

1 — величина для исходных пар «четных» и «нечетных» клеток; 2 — результат, полученный при сдвиге значений площади «четных» клеток на одну позицию по отношению к значениям площади «нечетных» клеток; 3 — то же, но при противоположном сдвиге. Представлены средние значения с соответствующими ошибками (вертикальные отрезки). Объяснение в тексте.

борками быть не должно. Причем чем выше сходство между клетками в парах, тем меньше должны различаться такие характеристики выборок, как среднее значение и стандартное отклонение (даже при такой относительно небольшой выборке в 100 клеток). Полученный результат демонстрирует рис. 2.

Как видно, совпадение выборок по параметру «площадь клетки» практически идеальное. И это несмотря на то, что их гетерогенность достаточно велика, о чем свидетельствует высокое значение стандартного отклонения (одна треть от величины среднего значения). Таким образом, полученный результат с высокой долей вероятности свидетельствует о том, что отобранные пары клеток — это пары дочерних клеток.

Для подтверждения полученного результата рассчитывали показатели идентичности (ПИ) и синхронности (ПС) для этих же выборок. Детальная техника расчета этих показателей описана ранее (Петров и др., 2012). Данные представлены на рис. 3.

Несмотря на то что оба показателя ранее были предложены как характеристики, отражающие динамику изменения площади отдельных клеток в процессе их распластывания по подложке, они могут быть использованы и как показатели, характеризующие родство клеток (дочерние, внучатые). Чем они ниже, тем выше родство клеток. Для расчета этих показателей используют выборки парных значений. Как следует из диаграмм на рис. 3, если сдвинуть значения площадей пар клеток относительно друг друга в ту или иную сторону, то оба показателя резко (в разы) возрастают и становятся приблизительно одинаковыми. Это указывает на то, что при такой манипуля-

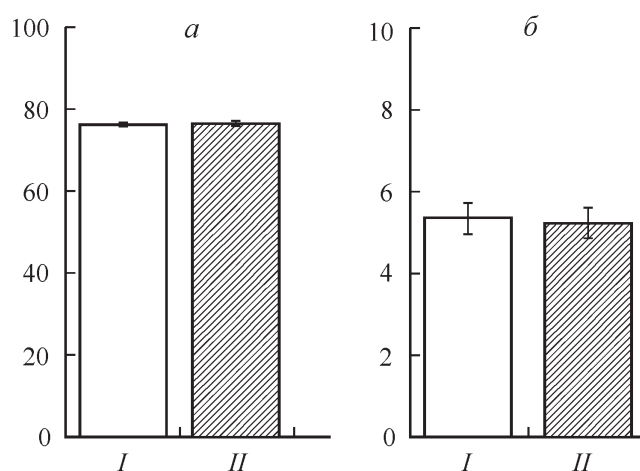


Рис. 4. Средние значения (а) и стандартные отклонения (б) оптической плотности 100 пар «нечетных» (I) и «четных» (II) клеток HeLa-M.

Вертикальные отрезки — ошибка среднего. Объяснение в тексте.

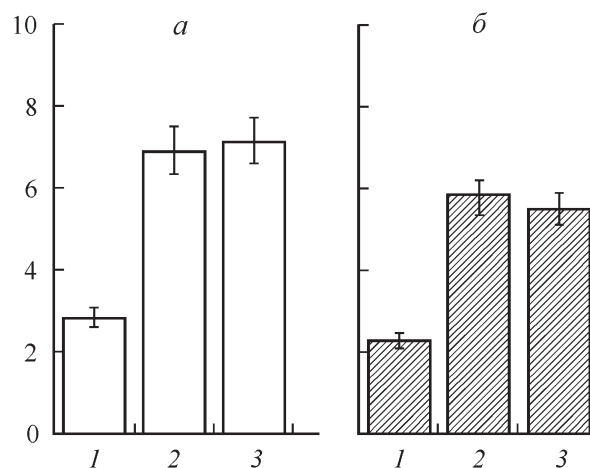


Рис. 5. Показатели идентичности (а) и синхронности (б), рассчитанные по данным оптической плотности 100 пар клеток.

1 — величина для исходных пар «четных» и «нечетных» клеток; 2 — сдвиг на одну позицию значений «четных» по отношению к «нечетным»; 3 — то же, но с противоположным сдвигом. Вертикальные отрезки — ошибка среднего. Объяснение в тексте.

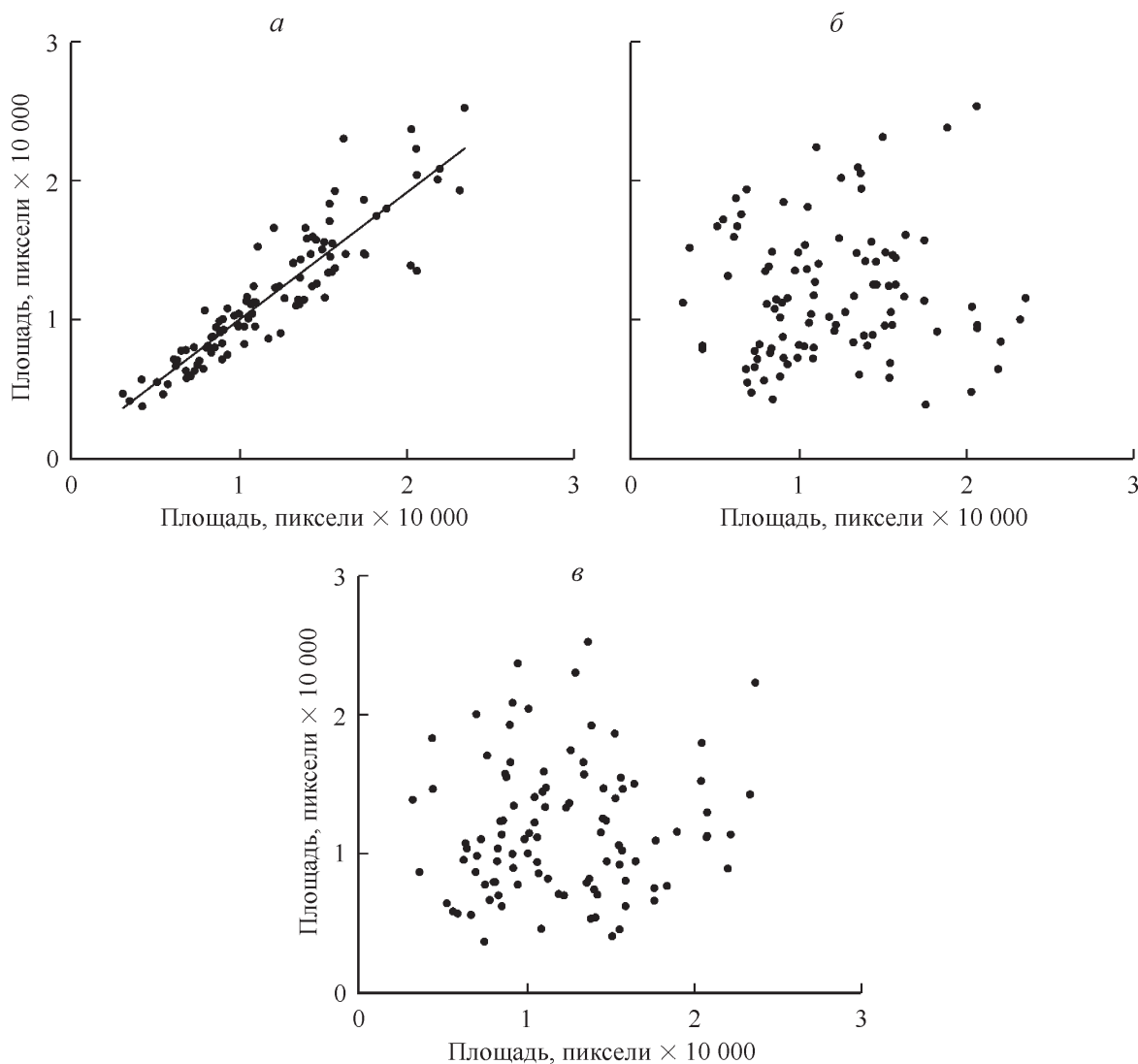


Рис. 6. Сравнение площади 100 пар «нечетных» и «четных» клеток.

Каждая точка соответствует двум значениям — площади «четных» (значения отложены по вертикали) и «нечетных» (значения отложены по горизонтали) клеток. *а* — площади пар клеток представлены без смещения значений (пары дочерних клеток); *б* — значения площади «четных» клеток смещены относительно значений площади «нечетных» клеток на одну позицию; *в* — то же, но с противоположным смещением. Прямая линия демонстрирует линейную регрессию пар значений дочерних клеток с коэффициентом линейной корреляции $R = 0.91 \pm 0.02$. В других случаях корреляция отсутствует, о чем свидетельствуют крайне низкие значения коэффициентов корреляции, соответственно равные 0.04 ± 0.10 и 0.09 ± 0.10 .

ции пары клеток (образуемые при смещении значений площади) уже не близкородственные.

Итак, представленные выше данные позволяют считать, что отобранные в случайном порядке пары клеток можно рассматривать как пары дочерних клеток. Если исходить из того, что дочерние клетки (как близнецы) могут иметь сходство не только по параметру площади клетки, но и по любым другим параметрам, можно предположить следующее. Количество поглощенного клетками света может быть индивидуальным для каждой из них. Если это так, то значения оптической плотности, как и значения площади клеток, должны быть близки для пар дочерних клеток и различны для иных пар.

Используя ту же выборку клеток, что и для оценки их площади, анализировали средние значения оптической плотности этих клеток исходя из того, что их пары — это дочерние клетки. На рис. 4 представлены диаграммы средних значений оптической плотности (в значениях яркости пикселей) «нечетных» (*I*) и «четных» (*II*) клеток

и соответствующие стандартные отклонения. Как видно, данные диаграммы имеют те же особенности, что и диаграммы на рис. 2, поэтому и следствия из этих данных должны быть аналогичны. Иными словами, можно утверждать, что по параметру «оптическая плотность» дочерние клетки не имеют достоверных различий, причем с вероятностью не меньшей, чем по параметру «площадь клетки». Однако есть одно отличие. Низкие значения стандартного отклонения по сравнению со средними значениями указывают на небольшую дисперсию обеих выборок, что говорит о незначительной гетерогенности данной популяции по этому признаку. Тем не менее достоверные различия с очень высокой вероятностью (не менее $P < 0.0001$) между выборками отсутствуют. Это означает, что оптическая плотность клеток может быть хорошим показателем, отражающим клеточную специфичность.

Исходя из принципов расчета и интерпретации ПС и ПИ для площади клеток вычисляли их значения, исполь-

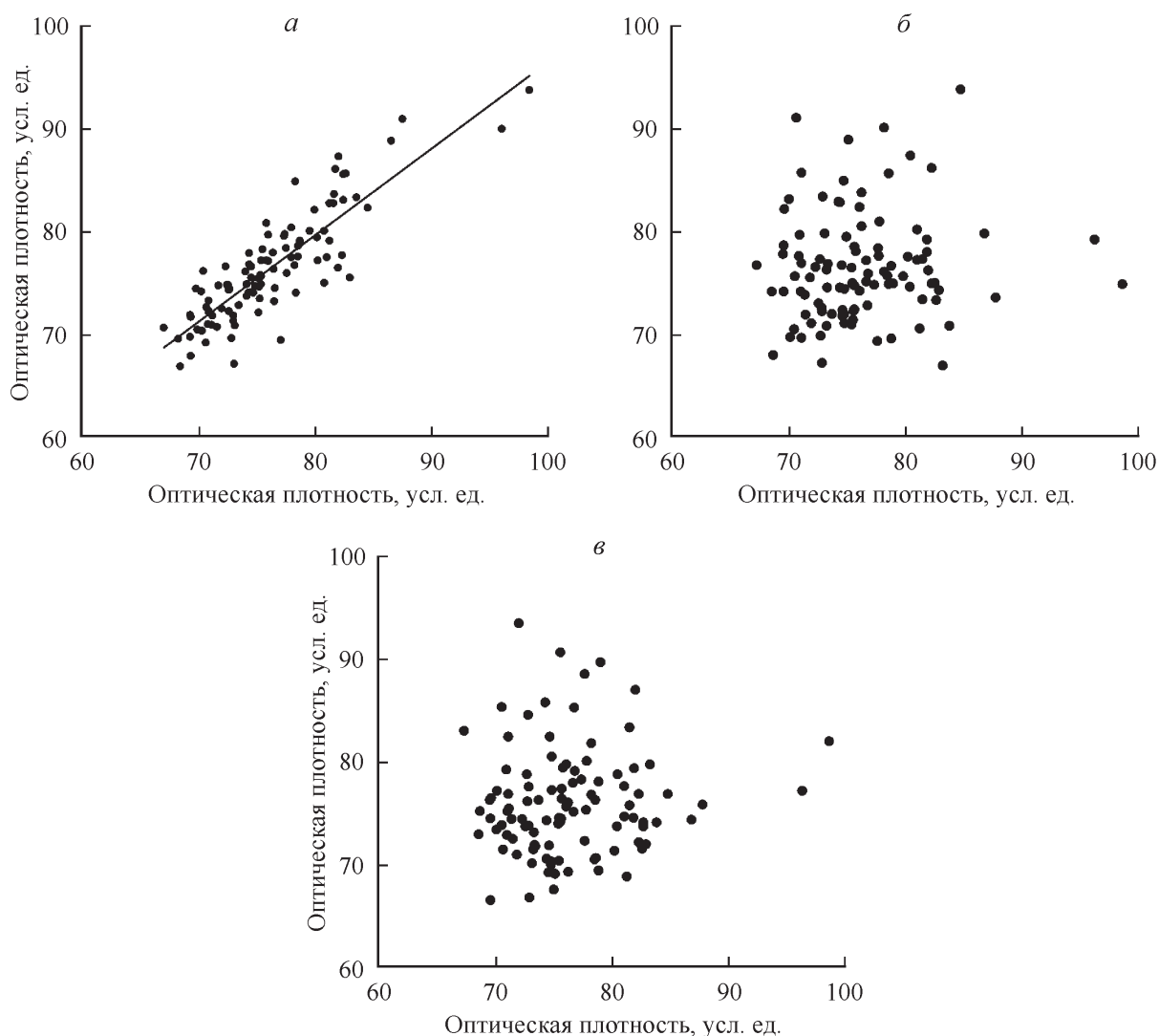


Рис. 7. Сравнение оптической плотности 100 пар «нечетных» (значения по горизонтали) и «четных» (значения по вертикали) клеток.

a — наличие корреляции между обеими выборками в случае пар дочерних клеток, коэффициент линейной корреляции $R = 0.86 \pm 0.03$; *б* — отсутствие корреляции при смещении значений «четных» клеток на одну позицию; $R = 0.08 \pm 0.10$; *в* — отсутствие корреляции при противоположном смещении значений «четных» клеток, $R = 0.08 \pm 0.10$.

зую данные по оптической плотности клеток. Полученный результат представлен на рис. 5. Он также сходен с данными по площади клеток, показанными на рис. 3. Поскольку оба показателя имеют самые низкие значения для пар клеток, которые, как было показано выше, относятся к дочерним, можно утверждать, что оптическая плотность клеток — не менее надежный количественный параметр, чем их площадь. Этот вывод более наглядно демонстрируют данные, представленные на рис. 6 и 7. Из них следует, что только тогда, когда пары составлены из дочерних клеток, между выборками выявляется корреляция как по параметру площади клетки, так и по параметру оптической плотности клетки.

Предлагаемый параметр оптической плотности клеток, основанный на анализе их изображений, полученных при обычной световой микроскопии, в экспериментальной работе может быть использован как минимум в двух направлениях — либо сам по себе (при сравнении отдельных клеток или групп клеток), либо в качестве параметра, для которого установлена корреляционная зависимость с

другим параметром (по принципу калибровочных кривых, например при определении количества белка в растворе). Обе возможности иллюстрируют два примера, представленных ниже.

На рис. 8 показаны две группы клеток HeLa-M. Отметим, что эти клетки находятся не только при одних и тех же условиях культивирования (т. е. в одной и той же чашке), но и в поле одного и того же изображения. Это означает, что любые неучитываемые факторы, влияющие на измерение клеток, для обеих групп одинаковы и не могут повлиять на однозначность результата при сравнении этих групп. Анализ площади клеток показывает, что по этому параметру клетки обеих групп достоверно различаются: средняя площадь (в пикселях) клеток левой группы (8 клеток) равна $13\,236 \pm 1221$, а правой (6 клеток) — $24\,568 \pm 2583$ пикселя ($P < 0.01$). Количественная оценка оптической плотности этих клеток дает следующие величины: 71.8 ± 1.0 и 68.9 ± 0.6 . Несмотря на небольшое различие между этими значениями, расчеты показывают, что клетки этих групп достоверно различаются

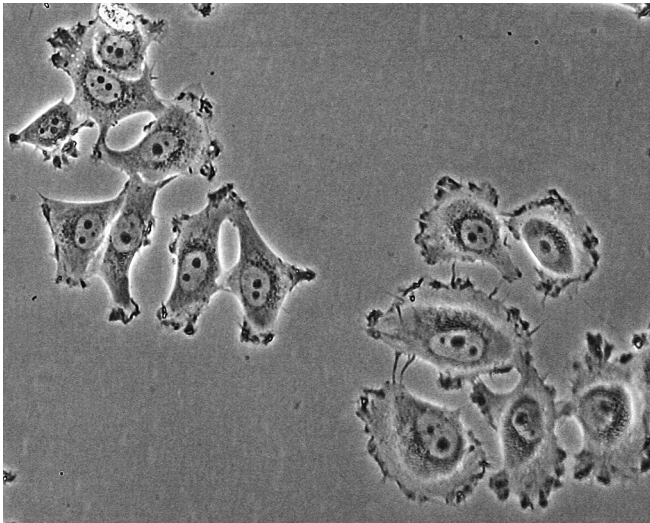


Рис. 8. Две группы клеток HeLa-M в пределах одного поля зрения, различающиеся между собой как по средней площади клеток, так и по их оптической плотности.

Объяснение в тексте.

по параметру оптическая плотность ($P < 0.05$). Таким образом, этот параметр может иметь самостоятельное значение и быть полезным для сравнительного исследования клеточных популяций, например при анализе роста клонов.

Однако использование оптической плотности для изучения индивидуальных особенностей клетки может быть более информативным, если будут найдены корреляционные зависимости между этим параметром и конкретными клеточными структурами, вносящими вклад в поглощение света всей клеткой. Это особенно важно, если изучение таких структур связано с дорогостоящими,

относительно трудоемкими и не всегда доступными методами исследования.

На рис. 9, а представлено цифровое изображение, полученное с помощью конфокальной микроскопии клеток HeLa-M, фиксированных и окрашенных родамин-фаллоидином. Это изображение имеет вид черно-белого, хотя в оригинале темные участки окрашены в красный цвет, указывая локализацию актиновых фибрилл. Однако конвертация красного цвета в черно-белый не влияет на относительные величины оптической плотности. Кроме этого, данное изображение — это результат усреднения восьми оптических срезов, полученных при конфокальной микроскопии. Таким образом, оно адекватно изображению клеток в обычном микроскопе, где по условиям съемки за поглощение света ответственны все клеточные слои.

Рис. 9, б показывает процентное соотношение числа пикселей различной яркости в виде гистограммы с числом разрядов, равным 256. Гистограмма отражает суммарный вклад оптической плотности всех клеток в поле данного изображения. На предварительном этапе наиболее светлые пиксели, т. е. не отражающие окраску на актин (фон), были исключены из выборки. Поэтому общее число пикселей, вошедших в состав данной диаграммы, составило 48 % от общей площади клеток. Следует напомнить, что более светлые пиксели имеют большие значения яркости (значения по оси абсцисс). Наиболее темные участки (в основном по периферии клеток) составляют группы пикселей, входящих в два левых пика (пунктирные линии в левой части гистограммы). Общее число пикселей, образующих эти пики, равно приблизительно 10.5 % от всей площади клеток.

На рис. 10, а показан фрагмент монослоя интактных живых клеток HeLa-M, полученных с помощью обычной световой микроскопии. Изображения центральной части клеток с ядром и околядерной цитоплазмой, имеющей зернистый вид (см. рис. 8), удалены. Это сделано для

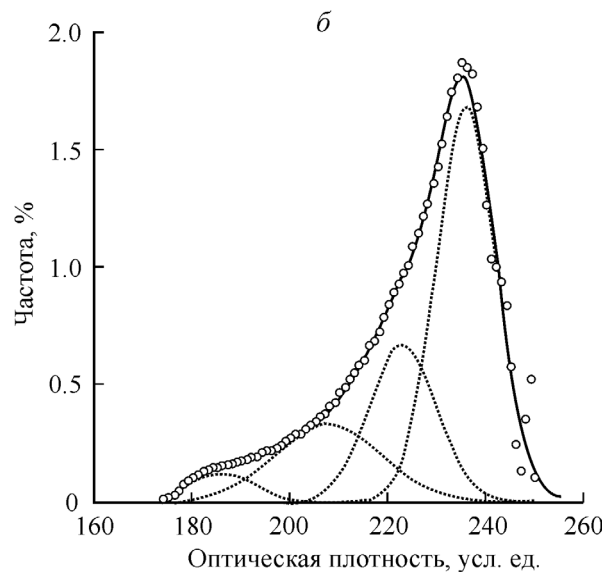
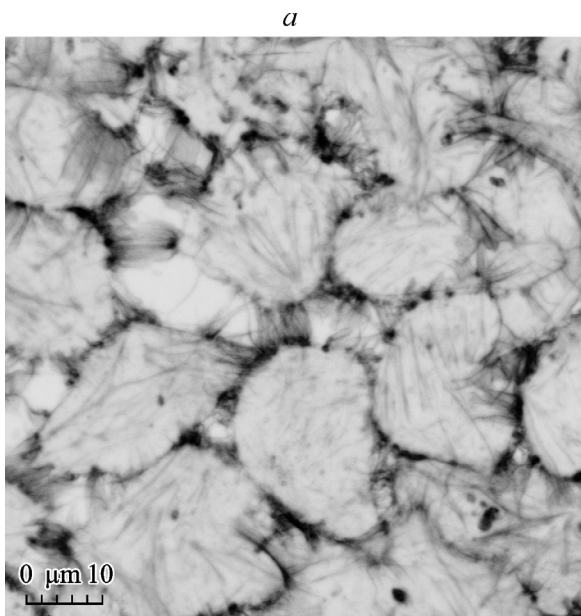


Рис. 9. Фрагмент поля зрения монослоя клеток HeLa-M; конфокальная микроскопия, окраска на актин (а). Оптическая плотность этих же клеток, представленная в виде гистограммы распределения пикселей различной яркости (б).

Светлые кружки — опытные значения. Сплошная линия — результат суммирования пунктирных линий, отражающих соотношение 4 групп пикселей с различной степенью яркости. Регрессия выполнена исходя из предположения о нормальном распределении градиентов яркости. Коэффициент линейной корреляции суммарной кривой равен 0.987. Объяснение в тексте.

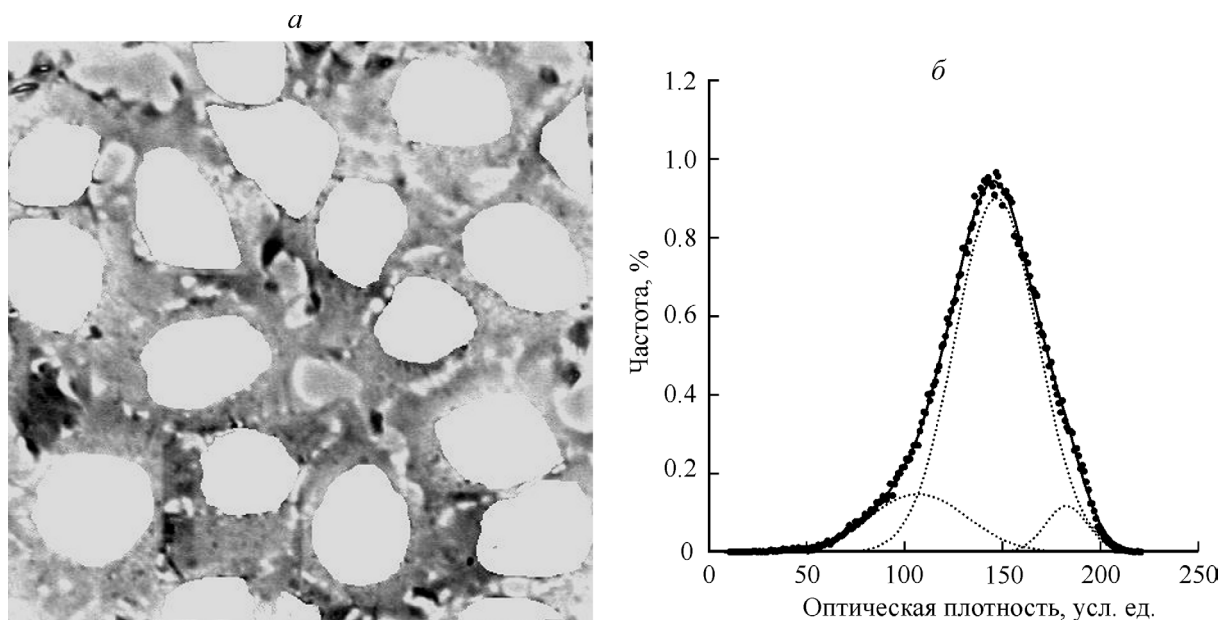


Рис. 10. Фрагмент поля зрения монослоя живых интактных клеток HeLa-M; световая микроскопия; представлены участки цитоплазмы без ядер и околоядерного пространства (а). Оптическая плотность этих же клеток, представленная в виде гистограммы распределения пикселей различной яркости (б).

Темные кружки — опытные значения. Сплошная линия — результат суммирования пунктирных линий, отражающих соотношение 3 групп пикселей с различной степенью яркости. Регрессия выполнена исходя из предположения о нормальном распределении градиентов яркости. Коэффициент линейной корреляции суммарной кривой равен 0.998. Объяснение в тексте.

того, чтобы данное изображение было адекватно изображению клеток на рис. 9, а, где по понятным причинам отсутствует актин в центральной области клеток. В результате оставшаяся часть цитоплазмы клеток на рис. 10, а составляет около 60 % всей площади клеток, что можно считать сопоставимым с величиной площади клеток, где локализуется актин. На рис. 10, б представлена соответствующая гистограмма. Как следует из рис. 10, а, у живых клеток при световой микроскопии на периферийных участках цитоплазмы тоже можно визуально отметить более темные участки. На гистограмме они также соответствуют ее левому участку с соответствующим пиком (пунктирная линия слева). В процентном отношении количество таких темных пикселей в данном случае составляет приблизительно 9.2 % от общей площади клеток, что соизмеримо с величиной 10.5 %, относящейся к гистограмме на рис. 9, б. То, что средние значения пиков с темными пикселями не совпадают (в первом случае около 200, а во втором — около 100 усл. ед. яркости), не противоречит сказанному. Во-первых, их надо сравнивать относительно других пиков одной и той же гистограммы, потому что общая яркость разных изображений всегда различна, но при этом сохраняется относительно постоянным соотношение яркостей одних и тех же участков клеток. Во-вторых, визуально локализация темных участков в том и другом случаях совпадает. Гистограммы показывают количественное соотношение таких участков. Очевидно, что светопоглощение периферийных участков клеток HeLa может быть детерминировано различными локализованными в них структурами. Тем не менее представленные данные указывают на то, что основной вклад в затенение этих участков вносит именно фибриллярный актин.

Как было показано выше, предложенный способ количественной оценки оптической плотности клетки основан на том, что количество поглощенного света строго зависит как от самой живой интактной клетки в целом, так и от ее различных участков. Надо полагать, что эта зависимость отражает как морфологические особенности клеток, так и их функциональное состояние в любой данный момент времени. Поиск корреляционных связей между значениями оптической плотности клетки и конкретными клеточными структурами, исследуемыми другими методами, может облегчить экспериментальную работу, особенно при скрининговых исследованиях клеточных популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта для молодых ученых компании ОПТЭК.

Список литературы

- Гороховский Ю. Н., Левенберг Т. М. 1963. Общая сенситометрия. Теория и практика. М.: Искусство. 302 с.
- Петров Ю. П., Негуляев Ю. А., Цупкина Н. В. 2012. Оценка сходства в распадавании дочерних клеток линии L-929 при их миграции по субстрату. Цитология. 54 (5) : 405—411.
- Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2012. Особенности роста культуры клеток линии СНО. Цитология. 54 (10) : 754—760.
- Nwaneshiudu A., Kuschal C., Sakamoto F. H., Anderson R. R., Schwarzenberger K., Young R. C. 2012. Introduction to confocal microscopy. J. Invest. Dermatol. 132 : 1—5.
- Pozarowski P., Holden E., Darzynkiewicz Z. 2013. Laser scanning cytometry: principles and applications—an update. Methods Mol. Biol. 931 : 187—212.

Поступила 6 V 2013

VITAL MEASUREMENT OF OPTICAL DENSITY OF HeLa CELL LINE

Yu. P. Petrov,¹ E. S. Bozhokina, N. V. Tsupkina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: yupe3ov@mail.ru

Light absorption by the live intact HeLa cells during light microscopy was studied. The light absorption may be considered as a parameter analogous to optical density used in spectrophotometry. This parameter can be used as a quantitative characteristic of life cell as well as intracellular structures. It is shown that cells from one population but belonging to two different clones were differed by their optical density. Optical density correlation between the shadow peripheral regions of the cells and a actin localization in these regions was established.

Key words: live cells, light microscopy, optical density
