

Grundlagen der lasergestützten Charakterisierung von Metabolismus und Morphologie von Zellverbänden

Ergebnisse

Autofluoreszenz und SHG

Die 2-Photonen-Anregung induziert Autofluoreszenz- sowie SHG-Signale. SHG (Second Harmonic Generation) stellt einen physikalischen Effekt an Grenzflächen bzw. an/zwischen Phasen dar, die Moleküle mit optisch nicht-zentrosymmetrischem Aufbau aufweisen (z.B. Kollagene, Elastin, Myosin). Die SHG-Signale selbst stellen Oberschwingungen nach Frequenzverdopplung dar und basieren auf der Photonenerzeugung. Dieser Effekt kann für die selektive Visualisierung der Kollagen-Scaffolds in Vliesmembranen mit Chondrozyten nach 2-Photonen-Anregung genutzt werden, da die Chondrozyten mit biologisch relevanten Anregungsenergien keine SHG-Signale aufweisen (Abb. 1 und Abb. 2).

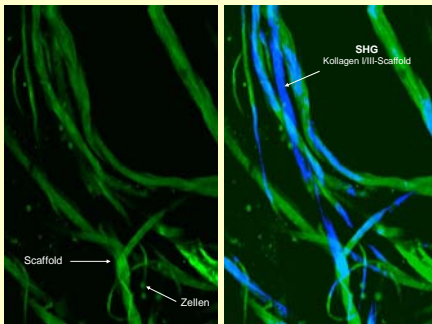


Abb. 1: Autofluoreszenz und SHG von Chondrozyten auf Kollagen VIII-Vlies
2-Photonen-Anregung bei 820 nm, Einzelstrahl-Modus 15 mW, PMT-Detektion
links: Autofluoreszenz (ohne Filter)
rechts: Projektion der sukzessiv detektierten SHG-Signale der Kollagen-Fasern (HQ 410/20, blau) der gleichen Probe

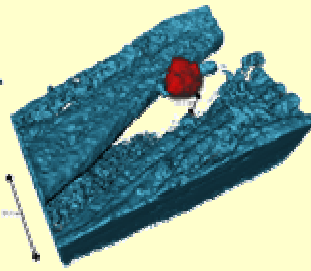


Abb. 2: 3D-Rekonstruktion eines Chondrozyten an einer Kollagenfaser:
Selektive Visualisierung von Autofluoreszenz- und SHG-Signalen zur Strukturtrennung
2-Photonen-Anregung bei 820 nm, single beam 15 mW, PMT-Detektion
blau: SHG der Kollagen-Fasern (HQ 410/20)
rot: Autofluoreszenz eines Chondrozyten (HQ 525/50 und HQ 575/50)

Spektrale Analyse der Autofluoreszenz

Die spektrale Analyse der Autofluoreszenz an jedem Pixel einer Bildebene mittels Spektrometer liefert charakteristische Merkmale der einzelnen Strukturen in der Probe. Die spektralen Unterschiede von Chondrozyten und Kollagen-Scaffolds können dabei durch spektrales Entmischen und Falschfarbzuweisung (spectral unmixing) für die selektive Visualisierung und Analyse der Komponenten genutzt werden.

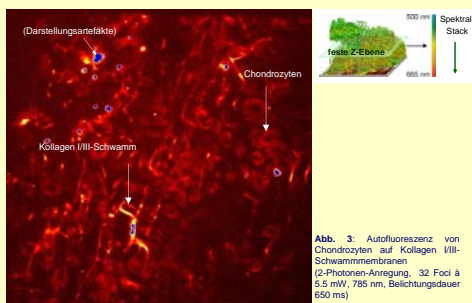


Abb. 3: Autofluoreszenz von Chondrozyten auf Kollagen VIII-Schwammmembranen (2-Photonen-Anregung, 32 Foci à 5,5 mW, 785 nm, Belichtungsdauer 650 ms, Spektrometer ±7 nm Genauigkeit)

Abb. 4: Emissionsspektren von Chondrozyten auf Kollagen VIII-Schwammmembranen (2-Photonen-Anregung, 32 Foci à 5,5 mW, 785 nm, Belichtungsdauer 650 ms, Spektrometer ±7 nm Genauigkeit)
Die Spektren wurden von Bildarealen mit eindeutiger Zuordnung von Bildstrukturelementen zu Chondrozyten und Kollagen VIII-Scaffoldelementen gewonnen (siehe auch Abb. 3 oben).

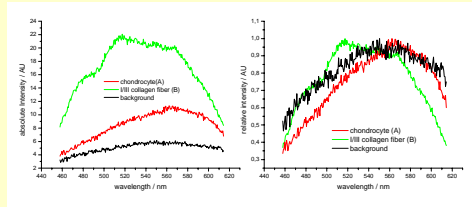


Abb. 5: Chondrozyten auf Kollagen, Schwammmembranen: Spektral entmischte Bilddaten an fünf Ebenen eines 3D-Datensatzes. Die Entmischung der Zell-Scaffold-Elemente eines Autofluoreszenz-Stacks (siehe Abb. 3) basiert auf den spektralen Unterschieden der Einzelkomponenten (siehe Abb. 4).

Parallelierter Descanned-Modus

Durch Kombination des 2-Photoneneffektes und der Lochblendentechnik der klassischen konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie kann eine Verbesserung der Streulichtunterdrückung stark streuender Proben erreicht werden. Die Abblockung von Streulicht vor dem dahinter liegenden PMT wird hierbei durch die Abbildung der anregenden Foci der parallelisierten 2-Photonen-Mikroskopie (32-fach Linear-PMT) auf ein einstellbares Lochblendenmuster erreicht.

- effektive Streulichtunterdrückung
- hohe Bilddynamik
- Bilder mit konfokaler Auflösung
- spektral aufgelöste Bilder
- extrem schnelle Bildfolgen mit Streulichtunterdrückung (z.B. 95x80 Pix bei 100 Hz)

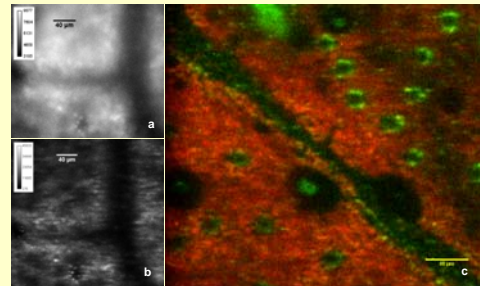


Abb. 6: Blatt einer Birkenfeige (*Ficus benjamina*, Tiefe 45 µm)
a) 2-Photonen-Mikroskopie im non-descanned-Modus
b) 2-Photonen-Mikroskopie im parallelisierten descanned-Modus
c) Spektrale Analyse (Tiefe 25 µm, Filter grün: 500-600nm, rot: 600-650nm, Leistung 5 mW/pro Fokus, 2-Photonen-Anregung bei 800nm, Belichtungsdauer 2,3 s)

Spektraler Einzelstrahl Descanned-Modus

- Kombination eines parallelen Detektors mit einem Spektrometer
- Einzelstrahlmodus zur spektralen Analyse ausgewählter Bildebenen (Reduzierung der Datenmenge)
- „Spektral-Stack“ (je ein Bild pro 8 nm über einen spektralen Bereich von insgesamt 309 nm)

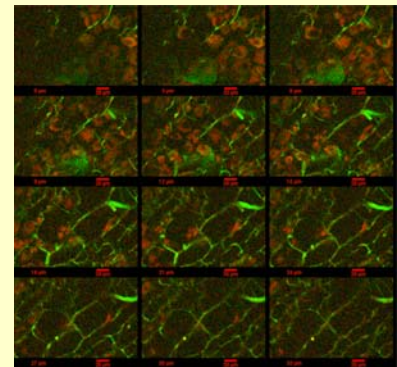


Abb. 7: Trennung der Strukturen von Chondrozyten (rot) und Kollagen-Scaffolds (grün) anhand spektraler Unterschiede der Emissionsspektren (spectral unmixing)

oben: Chondrozyten auf Kollagen-Schwammmembran, 5 mW, 820 nm, 8 s pro z-Bild, Autofluoreszenz
unten: Chondrozyten auf Kollagen-Vliesmembran, Tiefe 30 µm, 10 mW, 820 nm, 21 s pro z-Bild, Autofluoreszenz

Zusammenfassung

Für die Analyse und Bewertung von Zellen und Zellverbänden im Kontakt mit (Bio-)Materialoberflächen bzw. unter dem Einfluss externer Agenten/Stimulanten (z.B. Pharmazeutika, physiko-chemische Faktoren) werden zunehmend online-Verfahren eingesetzt, die eine kontinuierliche Datenerfassung und damit die Analyse kinetischer Prozesse der Zellreaktionen ermöglichen. Die wesentliche Voraussetzung ist die nichtinvasive Detektion geeigneter Zellparameter wie Zellzahl, Zellmorphologie, Zellverteilung und Metabolismus. Durch die Weiterentwicklung und Optimierung laserscanner optischer Verfahren stehen dafür inzwischen leistungsfähige Werkzeuge zur Verfügung. Im Rahmen des MEMO-Projektes werden Verfahren der Zellanalyse nach 2-Photonen-Anregung entwickelt, die eine selektive Visualisierung der Hauptkomponenten von Tissue Engineering-Konstrukten für die Therapie von Knorpelschäden ermöglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Kopplung geeigneter Detektionsverfahren mit der 2-Photonen-Anregung insbesondere a) die spektrale Analyse von Chondrozyten-Scaffold-Konstrukten sowie b) die simultane Analyse der Autofluoreszenz und SHG geeignete Methoden einer zellschonenden, nichtinvasiven Analyse darstellen. Die Bildung der naturgemäß stark streuenden Proben dreidimensionaler Zellverbände auf Trägermaterialien wurde durch den descanned-Modus der Datenaufnahme deutlich verbessert. Laufende Arbeiten im Rahmen des Projektes verfolgen das Ziel, durch die FLIM-Analyse (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) weitere Möglichkeiten für eine selektive Analyse zu schaffen. Auf der Basis der Ergebnisse sind die Voraussetzungen für eine optische online-Bewertung von Tissue Engineering-Konstrukten unter den Bedingungen einer zellstimulierenden Kultivierung in Bioreaktoren geschaffen worden.