

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

«Визуализация микрообъектов методом светового ножа»

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 254 группы
03.04.02 «Физика» (Физика оптических и лазерных явлений)
Физического факультета
Самсонова Максима Александровича

Научный руководитель
к.ф.-м.н., доцент



И.Ю. Янина

Заведующий кафедрой
профессор, д.ф.-м.н.



В.В. Тучин

Саратов 2017 год

Введение. Микроскопия использует большое количество методов исследования, многие из которых направлены на изучение биологических объектов. Одним из таких методов является метод светового ножа, о чём свидетельствует большое количество публикуемых работ в известных, цитируемых, научных изданиях.

Тема работы была выбрана, исходя из преимуществ в проведении эксперимента, по сравнению с другими методами микроскопических исследований, которыми можно считать несложную и легко воспроизводимую конструкция прибора с реализацией метода светового ножа, быстрая обработка полученных данных, полученных из ряда экспериментов с биологическими образцами и тканями. Всё вышеупомянутое справедливо по отношению к методу, основываясь не только на обзоре публикаций, но также на опыте, полученном во время разработки установки реализующей метод светового ножа и написания выпускной квалификационной работы.

Актуальность работы: Актуальность темы данной выпускной квалификационной работы обуславливается, во-первых, широким распространением метода светового ножа как исследовательского инструмента в области визуализации биологических объектов, а во-вторых, большим количеством исследований, где требуется подобная методика исследований.

Цель работы: изучение и применение метода светового ножа для исследования биологических объектов, разработка экспериментальной установки для реализации данного метода, составление методического материала проведение эксперимента с биологическими тканями, с целью выявления влияния повышения температуры (гипертермии) на количество выделяемых экзосом клеткой во внеклеточную среду.

Задачи работы:

- 1) Изучение литературы по применению светового ножа, написание литературного обзора.
- 2) Изучение литературы, касающихся строения и функций экзосом.
- 3) Разработка экспериментальной установки с реализацией метода светового ножа.
- 4) Составление методического материала для проведения экспериментального исследования зависимости выделения экзосом во внеклеточное пространство при гипертермии.

Научная новизна работы: в работе содержится литературный обзор по реализации метода светового ножа, который применяется для экспериментального исследования зависимости выделения экзосом во внеклеточное пространство при гипертермии. В современной литературе отсутствуют сведения о проведении подобных исследований.

Научная значимость работы обусловлена методическим описанием применения метода светового ножа для экспериментального исследования зависимости выделения экзосом во внеклеточное пространство при гипертермии.

Структура и объём ВКР. Выпускная квалификационная магистерская работа состоит из введения, двух глав: 1. Микроскопические методы исследования; 2. Методика проведения эксперимента. Материалы работы изложены на 51 странице.

Основная часть. В первой главе представлен литературный обзор, разделённый на 3 пункта. В пункте 1.1 рассматриваются микроскопические оптические методы исследования биологических образцов:

- 1) Метод прижизненного (витального) окрашивания
- 2) Метод тёмного поля

- 3) Метод ультрамикроскопии
- 4) Метод исследования в свете люминесценции
- 5) Фазово-контрастная микроскопия
- 6) Метод интерференционного контраста
- 7) Метод цитоспектрофотометрии
- 8) Метод гистоавторадиографии
- 9) Метод светового ножа

Выявляются преимущества метода светового ножа по отношению к остальным:

- 1) исследование цельных образцов [1-9];
- 2) удобен в реализации без использования сложного лабораторного оборудования [1-9];
- 3) требуется не дорогостоящие и легкодоступные компоненты для построения экспериментальной рабочей установки;
- 4) работа проходит без использования радиоактивных изотопов;
- 5) не требуется окраска исследуемого объекта;
- 6) большая глубина проникновения в исследуемый объект [1-9];
- 7) чёткие снимки, позволяющие более точно установить внутренне строение исследуемой ткани [1-9];
- 8) лёгкая обработка данных.

В пункте 1.2 описывается историю развития метода светового ножа, от первого эксперимента проведённом в 1902 году Садентофу и Зигмонди [1] до современных публикаций [2-9].

В пункте 1.3 представлен обзор по строению[10], составу[10], процессу формирования[10], способам транспорта РНК экзосомами по организму[10], содержанию экзосом в тех или иных тканях или биологических жидкостях

живого организма[11], влиянию экзосом на прогрессию раковых опухолей[12].

В главе 2 представлена методика проведения эксперимента, который реализует метод светового ножа.

Цель эксперимента: ознакомление с принципами микроскопических исследований биологических тканей с применением метода светового ножа; установление влияния изменения температуры на количество экзосом, выделяемых клеткой во внеклеточную среду.

Глава 2 разделена на 4 пункта.

В пункте 2.1 рассматривается схема рабочей установки, которая описывает механизм протекания эксперимента, и устройство рабочей установки.

Пункты 2.2 и 2.3 содержат указания по подготовке рабочей установки для проведения удачного эксперимента: юстировка оборудования, совмещение осветительной системы с микроскопом и расчёт необходимой толщины светового ножа для успешного проведения эксперимента.

Пункт 2.4 описывает последовательные действия для проведения эксперимента по исследованию зависимости количества выделяемых экзосом во внеклеточное пространство от гипертермии.

Заключение. Разработана методика проведения эксперимента для визуализации биологических объектов методом светового ножа. Были установлены факторы, влияющие на значимость и актуальность данного метода в современной науке. Преимуществами данного метода является его простота, бесконтактность с исследуемым биологическим материалом и его несущественная повреждаемость.

При написании работы, была разработана и частично сконструирована принципиальная схема экспериментальной установки, которая позволяет реализовать метод светового ножа. Во время изучения литературы и работы над схемой, были выявлены различного рода проблемы, которые влияют на

успешное проведение эксперимента – подбор числовой апертуры объектива микроскопа, закрепление биологического объекта, построение и комбинирование составляющих компонентов, для достижения нужных размеров светового ножа и т.д. Устранение этих проблем способствует более глубокому изучению воспроизводимого метода, а так же сделать экспериментальную установку более точной и удобной в использовании при работе с ней. Это позволяет не только проводить эксперименты, но и устранять появляющиеся в ходе исследования биологических объектов проблемы.

Работа была нацелена на получение светового ножа, который позволяет делать оптические срезы микроскопических биологических объектов различных объемов и форм. Это позволяет использовать рабочую установку и для иных целей, например: исследовать структуру головного мозга, например белой лабораторной мыши, кровеносную систему куриного эмбриона и т.д.

Установка может быть использована в практикуме по биофизике и оптическим приборам, поскольку её устройство и принцип действия отражает современные тенденции прижизненной оптической микроскопии биологических объектов.

Список использованных источников.

1. Siedentopf H., Zsigmondy R. Uber sichtbarmachung und größenbestimmung ultramikroskopischer teilchen, mit besonderer anwendung auf goldrubingläser //Annalen der Physik. – 1902. – Т. 315. – №. 1. – С. 1-39.
2. Voie A. H., Burns D. H., Spelman F. A. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens //Journal of microscopy. – 1993. – Т. 170. – №. 3. – С. 229-236.

3. Voie A. H., Spelman F. A. Three-dimensional reconstruction of the cochlea from two-dimensional images of optical sections //Computerized medical imaging and graphics. – 1995. – T. 19. – №. 5. – C. 377-384.
4. Lindek S., Pick R., Stelzer E. H. K. Confocal theta microscope with three objective lenses //Review of scientific instruments. – 1994. – T. 65. – №. 11. – C. 3367-3372.
5. Lindek S., Stelzer E. H. Confocal theta microscopy and 4Pi-confocal theta microscopy //IS&T/SPIE 1994 International Symposium on Electronic Imaging: Science and Technology. – International Society for Optics and Photonics, 1994. – C. 188-194.
6. Stelzer E. H. K. et al. A new tool for the observation of embryos and other large specimens: confocal theta fluorescence microscopy //Journal of microscopy. – 1995. – T. 179. – №. 1. – C. 1-10.
7. Huisken J. et al. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy //Science. – 2004. – T. 305. – №. 5686. – C. 1007-1009.
8. Dodt H. U. et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain //Nature methods. – 2007. – T. 4. – №. 4. – C. 331-336
9. Reynaud E. G., Tomancak P. Meeting report: first light sheet based fluorescence microscopy workshop //Biotechnology journal. – 2010. – T. 5. – №. 8. – C. 798-804.
10. Lai R.C., Arslan F., Lee M.M., Sze N.S., Choo A., Chen T.S., Salto-Tellez M., Timmers L., Lee C.N., El Oakley R.M., Pasterkamp G., de Kleijn D.P., Lim S.K. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res. 4 (3), 214– 222.

11. Li M., Zerlinger E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A.V. 2014. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* M., 369, 1652, doi 10.1098/rstb.2013.0502
12. Di Vizio D., Kim J., Hager M.H., Morello M., Yang W., Lafargue C.J., True L.D., Rubin M.A., Adam R.M., Beroukhim R., Demichelis F., Freeman M.R. 2009. Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res.* 69 (13), 5601–5609.