

УДК 57.01

## СКАНИРУЮЩАЯ ОПТИЧЕСКО-ЗОНДОВАЯ НАНОТОМОГРАФИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БИОМАТЕРИАЛОВ И КЛЕТОК

© 2021 г. О. И. Агапова<sup>1</sup>, А. Е. Ефимов<sup>1</sup>, Л. А. Сафонова<sup>1</sup>,  
М. М. Боброва<sup>1</sup>, И. И. Агапов<sup>1, \*</sup>, академик РАН С. В. Готье<sup>1, 2</sup>

Поступило 20.04.2021 г.

После доработки 04.06.2021 г.

Принято к публикации 04.06.2021 г.

Создание новых эффективных биоискусственных конструкций для задач тканевой инженерии и регенеративной медицины требует разработки и внедрения новых технологических подходов для анализа микро- и наноструктурных особенностей конструкций на основе биоматериалов и их взаимодействия с клетками. В работе представлен новый метод трехмерного мультипараметрического анализа наноструктуры – сканирующая оптическое-зондовая нанотомография в применении к анализу клеток и биоматериалов. Коррелятивная реконструкция распределений флуоресцентных маркеров и особенностей наноструктуры позволяет выполнить количественную оценку ряда параметров трехмерной наноморфологии фибробластов и клеток гепатокарциномы человека Нер-G2, адгезированных на биодеградируемые скаффолды на основе фиброина шелка. Разработанная технология с использованием принципов сканирующей оптического-зондовой нанотомографии применима для исследования особенностей трехмерной микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток различных типов.

*Ключевые слова:* сканирующая зондовая нанотомография, флуоресцентная микроскопия, фибробласты, клетки гепатокарциномы человека Нер-G2, фиброин шелка, биосовместимые скаффолды

**DOI:** 10.31857/S2686738921050036

Разработка новых эффективных конструкций для применения в тканевой инженерии и регенеративной медицине требует поиска новых материалов и создания конструкций для обеспечения адгезии и пролиферации клеток различных типов. Для всестороннего изучения взаимодействия клеток с конструкциями необходимы разработка и внедрение новых технологических подходов для анализа микро- и наноструктурных особенностей конструкций и клеток в их составе, а также количественной оценки параметров взаимодействия клеток с поверхностью конструкций на микро- и наномасштабе.

Для проведения подобных исследований в настоящий момент используются различные варианты микроскопии, такие как электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, оптическая микроспектроскопия высокого разрешения, каждый из которых обладает значительным потенциалом. Для комплексного анализа микро- и наноструктуры конструкций и клеток в их составе перспективным направлением является разработка технологии, комбинирующей различные техники микроскопии для коррелятивных исследований [1]. Такой подход позволяет проводить коррелятивные исследования с высоким разрешением, что дает возможность получить новую уникальную информацию о микро- и наноструктуре и свойствах биологических объектов.

Нами разработана уникальная технология сканирующей оптического-зондовой нанотомографии (СОЗНТ), комбинирующая ультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) в одном устройстве в корреляции с методами флуоресцентной оптической микроскопии [2]. Использование методики СОЗНТ позволяет изучать трехмерную микро- и наноструктуру конструкций на основе биосовместимых материалов, клеток, тканей и тканеинженерных конструкций, в корреляции с исследованием локализации флуо-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

\*e-mail: igor\_agapov@mail.ru

ресцентных маркеров в объеме изучаемых образцов. В том числе разработанный метод может быть успешно использован для определения параметров трехмерной наноморфологии биodeградируемых скаффолдов с культивированными клетками.

Ниже представлены исследования образцов клеток линий мышинных фибробластов 3Т3 и гепатокарциномы человека Нер-G2 на скаффолдах из фиброина шелка. Конструкции для культивирования клеток получали из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Данный материал обладает уникальным сочетанием свойств, которые позволяют получать конструкции с различной структурой на его основе для применения во множестве областей регенеративной медицины и тканевой инженерии [3–5]. Биосовместимость конструкций на основе фиброина шелка обеспечивает эффективное культивирование клеток, в том числе, адгезию клеток, а физико-химические свойства конструкций позволяют проводить различные манипуляции для пробоподготовки образцов для СЗОНТ, что позволяет рассматривать их как перспективные подложки для проведения исследований методом СЗОНТ. Скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка для культивирования клеток были получены по протоколу, описанному в [6].

В экспериментах использовали клеточные линии мышинных фибробластов 3Т3 и гепатокарциномы человека Нер-G2. Для получения образцов с клетками для исследований методом СЗОНТ суспензию клеток в среде инкубации переносили в подготовленные лунки 48-луночных планшетов из расчета 2000 клеток на лунку в 500 мкл среды инкубации. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для исследований клеток на скаффолдах методом флуоресцентной СЗОНТ клетки предварительно окрашивали флуоресцентными красителями FITC и DAPI. В ходе получения образца для СЗОНТ производили дегидратацию образцов скаффолдов с адгезированными клетками проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией и заливку образцов в эпоксидную среду [3].

Трехмерный СЗОНТ-анализ образцов выполнялся с использованием специализированного СЗМ, комбинированного с ультрамикротом Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) для сканирующей зондовой нанотомографии [2]. Данная уникальная научная установка – система зондово-оптической 3D-корреляционной микроскопии (<http://skp-gf.ru/usu/486825/>), созданная с участием авторов настоящей работы, – позволяет выполнять серийные СЗМ-измерения наноструктуры поверхности объектов непосредственно после последовательных сверхтонких срезов образца ультрамикротомом в корреляции с флуоресцент-

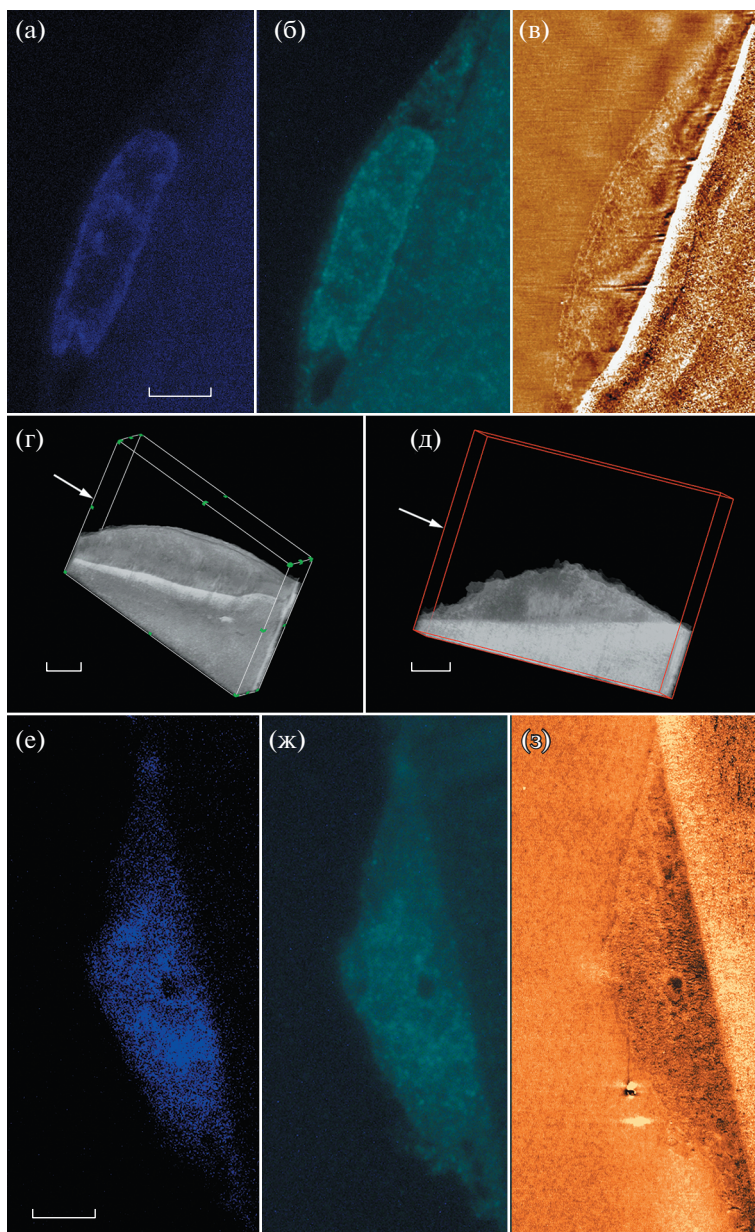
ной оптической микроскопией той же области среза образца.

На рис. 1а–1в представлены результаты коррелятивных измерений клетки Нер-G2 – флуоресцентные изображения высокого разрешения, отображающие окрашивания DAPI и FITC и СЗМ-изображение того же участка клетки, адгезированной на скаффолд. Полученные изображения позволяют выделить оформленное ядро, занимающее значительный внутренний объем клетки, внутри которого выделяются области хроматина, а также белковые структуры. Анализ поверхности среза при помощи СЗМ позволяет значительно повысить разрешение по сравнению с оптическими методами. Полученные коррелятивные флуоресцентные и СЗМ-изображения фибробласта представлены на рис. 1е–1з. По результатам коррелятивного анализа помимо ядра в клетке были обнаружены множественные включения белковой природы.

Для трехмерных реконструкций фрагментов фибробласта и клетки гепатокарциномы человека Нер-G2 было получено соответственно 16 и 24 последовательных СЗМ-изображений участков скаффолдов с адгезированными клетками после последовательных срезов образца толщиной 150 нм. Полученные при помощи программного пакета Image Pro Plus 6.0 3DConstructor (MediaCybernetics Inc.) визуализации трехмерной структуры фибробласта и клетки гепатокарциномы человека Нер-G2 показаны на рис. 1г, 1д.

Совокупность данных, полученных в результате трехмерной реконструкции методом СЗОНТ, дает возможность вычислить ряд морфологических параметров изучаемых клеток, таких как средняя шероховатость поверхности клетки  $R_a$ , эффективная площадь поверхности  $\sigma$  и длина автокорреляции поверхности клетки  $L_1$ . Разработанные нами алгоритмы вычисления этих параметров на основе данных СЗМ подробно описаны в [7]. Стоит отметить, что данные трехмерные параметры невозможно вычислить из двумерных данных, получаемых при помощи стандартных методов СЗМ, флуоресцентной или электронной микроскопии. Шероховатость поверхности клеточной мембраны является важным цитологическим параметром, задействованным в ряде клеточных механизмов, включая клеточную подвижность, адгезию и межклеточные контакты [8–10]. Она может служить чувствительным индикатором состояния клетки [11–13].

Параметры  $\sigma$  и  $L_1$  характеризуют степень развитости и характерные латеральные размеры особенностей рельефа поверхности клетки соответственно. Данные параметры также важны для оценки состояния и биологической активности клетки [14].



**Рис. 1.** Анализ образцов клеток гепатокарциномы человека Нер-G2 и фибробластов 3Т3, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка. а – флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда с адгезированной клеткой Нер-G2, окрашивание DAPI, увеличение  $\times 1000$ , размерный отрезок – 5 мкм; б – коррелятивное флуоресцентное изображение той же области, окрашивание FITC; в – коррелятивное СЗМ-изображение топографии поверхности среза в той же области, размер скана  $32 \times 20$  мкм, диапазон вариации высоты 9 нм. г – Трехмерная СЗМТ-реконструкция фрагмента клетки гепатокарциномы человека Нер-G2, адгезированной на скаффолд,  $32.0 \times 22.0 \times 3.6$  мкм, толщина среза 150 нм, размерный отрезок 5 мкм. Стрелка указывает плоскость сечения, соответствующую СЗМ-изображению, приведенному на панели В. д – Трехмерная СЗМТ-реконструкция фибробласта, адгезированного на скаффолд,  $31.0 \times 25.0 \times 2.4$  мкм, толщина среза 150 нм, размерный отрезок 5 мкм. Стрелка указывает плоскость сечения, соответствующую СЗМ-изображению, приведенному на панели З. е – флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда с адгезированным фибробластом, окрашивание DAPI, увеличение  $\times 1000$ , размерный отрезок – 5 мкм; ж – коррелятивное флуоресцентное изображение той же области, окрашивание FITC; з – коррелятивное СЗМ-изображение топографии поверхности среза в той же области, размер скана  $32 \times 15.4$  мкм, диапазон вариации высоты 15 нм.

Также использованный метод позволяет вычислить максимальную толщину адгезированной клетки как высоту поверхности клетки над по-

верхностью скаффолда н. Параметры, полученные в результате анализа трехмерных структур фибробласта и клетки гепатокарциномы челове-

**Таблица 1.** Морфологические параметры реконструированной трехмерной структуры фибробласта и клетки гепатокарциномы человека Нер-G2

Исследуемая клетка	Параметр	Значение
Фибробласт	$R_a$ , нм	$146.5 \pm 14.8$
	$\sigma$ , ед	$1.21 \pm 0.03$
	$L_1$ , нм	$248 \pm 25$
	$h$ , мкм	$6.10 \pm 0.1$
Нер-G2	$R_a$ , нм	$39.5 \pm 5.8$
	$\sigma$ , ед	$1.08 \pm 0.02$
	$L_1$ , нм	$324 \pm 32$
	$h$ , нм	$6.17 \pm 0.1$

ка Нер-G2, адгезированных на поверхность скаффолда на основе фиброина шелка, представлены в табл. 1.

Необходимо отметить, что для проанализированной клетки гепатокарциномы человека Нер-G2 количественные параметры, характеризующие степень шероховатости и развитости ее поверхности, значительно ниже, чем для фибробласта, адгезированного на аналогичный скаффолд на основе фиброина шелка. Это может быть связано с тем, что данная клетка плотнее адгезирует к субстрату. Полученные данные позволяют оценить также объем ядра клетки Нер-G2 на уровне  $940 \pm 100$  мкм<sup>3</sup>, что составляет  $7.3 \pm 1.5\%$  от общего объема клетки.

Разработанная технология исследования трехмерных характеристик наномасштабной морфологии фибробластов и клетки гепатокарциномы человека Нер-G2, адгезированных на биодеградируемые скаффолды на основе фиброина шелка, с использованием принципов сканирующей оптической зондовой нанотомографии применима для исследования особенностей трехмерной микро- и наноструктуры клеток и клеточно-инженерных конструкций различных типов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2598.2020.7.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Caplan J., Niethammer M., Taylor R.M.II, et al.* The Power of Correlative Microscopy: Multi-modal, Multi-scale, Multi-dimensional // *Curr Opin Struct Biol.* 2011. V. 21 № 5. P. 686–693.
2. *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., et al.* An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography // *Ultramicroscopy.* 2017. V. 182. P. 118–123.
3. *Efimov A.E., Moisenovich M.M., Bogush V.G., et al.* 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography // *RSC Advances.* 2014. V. 4. P. 60943–60947.
4. *Vepari C., Kaplan D.L.* Silk as a Biomaterial // *Progress in Polymer Science.* 2007. V. 32. P. 991–1007.
5. *Koh L.-D., Cheng Y., Teng C.-P., et al.* Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials // *Progress in Polymer Science.* 2015. V. 46. P. 86–110.
6. Патент РФ на изобретение № 2740872. МПК G01Q 60/00, B82Y 35/00. Подложка для исследования биологического образца методом сканирующей зондовой нанотомографии и способ ее получения / Агапов И.И., Агапова О.И., Боброва М.М., и др., Дата подачи заявки: 27.07.2020. Опубликовано: 21.01.2021. // Бюл. № 3.
7. *Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., et al.* Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers // *RSC Advances.* 2017. V. 7 № 15. P. 8808–8815.
8. *Keren K., Pincus Z., Allen G. M., et al.* Mechanism of shape determination in motile cells // *Nature.* 2008. V. 453. P. 475–481.
9. *Krobath H., Schütz G. J., Lipowsky R., et al.* Lateral diffusion of receptor-ligand bonds in membrane adhesion zones: Effect of thermal membrane roughness // *Europhysics Letters.* 2007. V. 78. P. 38003/1–38003/6.
10. *Reister E., Bihl T., Seifert U., et al.* Two intertwined facets of adherent membranes: Membrane roughness and correlations between ligand-receptors bonds // *New Journal of Physics.* 2011. V. 13. P. 025003/1–025003/15.
11. *Antonio P.D., Lasalvia M., Perna G., et al.* Scale independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2012. V. 1818 P. 3141–3148.
12. *Lee H., Veerapandian M., Kim B.T., et al.* Functional nanoparticles translocation into cell and adhesion force curve analysis // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2012. V. 12. P. 7752–7763.
13. *Wang Y., Xu C., Jiang N., et al.* Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy // *Scanning.* 2016. V. 38. P. 558–563.
14. *Staykova M., Holmes D.P., Read C. et al.* Mechanics of surface area regulation in cells examined with confined lipid membranes // *PNAS.* 2011. V. 108. P. 9084–9088.

## SCANNING OPTICAL PROBE NANOTOMOGRAPHY FOR INVESTIGATION OF THE STRUCTURE OF BIOMATERIALS AND CELLS

**O. I. Agapova<sup>a</sup>, A. E. Efimov<sup>a</sup>, L. A. Safonova<sup>a</sup>, M. M. Bobrova<sup>a</sup>,  
I. I. Agapov<sup>a, #</sup>, and Academician of the RAS S. V. Gautier<sup>a, b</sup>**

<sup>a</sup>*Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: igor\_agapov@mail.ru*

Creation of new effective bio-artificial structures for tissue engineering and regenerative medicine requires development and implementation of new technological approaches for analysis of micro- and nanostructural features of constructs based on biomaterial cells and their interaction with cells. A new method of three-dimensional multiparametric analysis of nanostructure, scanning optical probe nanotomography, is presented in this paper, applied to the analysis of cells and biomaterials. Correlative reconstruction of fluorescent marker distributions and nanostructure features allows quantitative evaluation of a number of parameters of three-dimensional nanomorphology of fibroblasts and human hepatocarcinoma cells Hep-G2, adhered to biodegradable scaffolds based on silk fibroin. The developed technology with use of scanning optical probe nanotomography is applicable to investigation of three-dimensional micro- and nanostructure features of biomaterials and cells of different types.

*Keywords:* scanning probe nanotomography, fluorescence microscopy, fibroblasts, human hepatocarcinoma Hep-G2 cells, silk fibroin, biocompatible scaffolds