

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И ПРОБОПОДГОТОВКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

© 2019 г. Р. А. Камышинский<sup>1,2,3</sup>, А. С. Орехов<sup>1,2</sup>, Т. Е. Григорьев<sup>1</sup>, Е. В. Куевда<sup>4</sup>, Е. А. Губарева<sup>4</sup>, К. В. Токаев<sup>5</sup>, С. Н. Чвалун<sup>1</sup>, А. Л. Васильев<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт, Москва, Россия

<sup>4</sup> Кубанский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Краснодар, Россия

<sup>5</sup> Национальный исследовательский медицинский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава РФ, Москва, Россия

\* E-mail: a.vasiliev56@gmail.com

Поступила в редакцию 07.12.2018 г.

После доработки 07.12.2018 г.

Принята к публикации 24.12.2018 г.

На примере исследований децеллюляризованных матрицсв диафрагмы крысы проведено сравнение различных методов растровой электронной микроскопии в сочетании с различными техниками подготовки образцов. Показано, что сочетание метода растровой электронной микроскопии в условиях естественной среды, обеспечивающего возможность исследования образцов тканей в состоянии, близком к нативному, с традиционной высоковакуумной микроскопией образцов, полученных с помощью сушки в критической точке, позволяет провести наиболее полный анализ микроструктуры образцов нативных и децеллюляризованных тканей.

DOI: 10.1134/S0023476119030135

### ВВЕДЕНИЕ

Тканевая инженерия является динамично развивающимся методом, появление которого ознаменовало совершенно новый этап развития медицины [1]. Это направление персональной медицины, описанное в широком ряде обзоров и статей (например, [2, 3]), раскрыло возможности воссоздания тканей и органов на основе биосовместимых полимерных или децеллюляризованных аллогенных или ксеногенных естественных внеклеточных матрицсв в комбинации с живыми клетками. Оно способно решить множество задач, стоящих перед современной регенеративной медициной.

Для успешного создания имплантов на основе методов тканевой инженерии необходимы подробные исследования микроструктурных особенностей систем матрикс–клетка начиная с матрицсв. Изучение биосовместимых полимерных матрицсв в настоящее время не вызывает больших проблем. В основном используют несколько методов: растровую электронную микроскопию (РЭМ), конфокальную лазерную сканирующую микроскопию, рентгеновскую микро-

мографию, атомно-силовую микроскопию, а также другие методики, представленные в [4]. Все методы имеют свои сильные и слабые стороны. Например, применение рентгеновской микромографии для визуализации трехмерной структуры матрицсв предполагает предварительную обработку объекта различными контрастирующими веществами, что, в свою очередь, исключает возможность исследования в нативном состоянии [5]. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволяет исследовать нативные объекты даже в культуральных средах. Тем не менее метод имеет существенные ограничения по разрешению [6]. Результаты, получаемые с помощью атомно-силовой микроскопии, в значительной степени ограничены поверхностью матрикса.

Известные проблемы возникают и при исследованиях с использованием РЭМ. Это связано с особенностями метода, предъявляющего достаточно жесткие требования к образцу. Образцы для традиционной РЭМ должны обладать электропроводностью, радиационной стойкостью и устойчивостью в вакууме. Эти условия накладывают значительные ограничения на точность исследований. Во-первых, при радиационных по-

вреждениях и напылении проводящей пленки падает пространственное разрешение, во-вторых, при фиксации материала или декомпозиции в вакууме и при облучении повреждается нативная структура. Таким образом, исследования нативных децеллюляризованных матриц на разных этапах их формирования с использованием РЭМ требуют сложных и аккуратных подходов. [7]. Популярными методами подготовки биологических образцов, в частности нативных матриц, — сушка в критической точке [8] или лиофильная сушка [9]. Отметим, что значительное улучшение электронной оптики и когерентности источников в последние годы позволило использовать пониженное до единиц киловольт ускоряющее напряжение при незначительном ухудшении пространственного разрешения. Это расширило возможности традиционного “высоковакуумного” метода, однако сохранение нативной структуры остается по-прежнему “узким местом” любого исследования биообъектов с его помощью.

Современная РЭМ позволяет исследовать непроводящие объекты без предварительной подготовки в условиях естественной среды (ЕРЭМ) [10], подразумевающей частичное заполнение камеры водяными парами или заморозку образца (КриоРЭМ) [11, 12]. Низкий вакуум, пары воды позволяют в высокой степени сохранить нативную структуру. Использование этого метода стало возможным только при появлении детекторов с улучшенным соотношением сигнал—шум, приспособленных для исследований в низком вакууме [13, 14]. При кажущейся простоте для работы этих методов необходимы специальное оборудование и возможность их применения к изучаемым материалам.

В процессе исследования нативных матриц электронно-микроскопическими методами представляется необходимым сравнение результатов, полученных для одних и тех же объектов известными “высоковакуумными” методами, которые в большинстве случаев дают более высокое разрешение по сравнению с ЕРЭМ и КриоРЭМ, и соответствующих методов подготовки образцов. Это позволит сделать заключение о том, насколько адекватен выбор того или иного метода применительно к определенному объекту или группе объектов, а также определить, какие детали и особенности микроструктуры можно выявить, используя различные методики подготовки и исследования образцов.

В настоящей работе проведено сравнение различных методов растровой электронной микроскопии и пробоподготовки при исследовании биологических объектов на примере децеллюляризованных матриц диафрагмы крысы, содержащих основной “строительный материал” тканей — волокна коллагена.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Сушка в критической точке* является наиболее универсальным методом пробоподготовки биологических объектов. В настоящей работе децеллюляризованные образцы диафрагмы крыс предварительно были подвергнуты процедуре дегидратации в градиенте спиртов (50% 20 мин, 70% 20 мин, 100% 12 ч) и в ацетоне (20 мин) согласно протоколу [15]. Сушку в критической точке проводили с помощью установки Polaron E3000 CPD с использованием жидкого диоксида углерода в качестве переходной жидкости.

*Растровая электронная микроскопия.* Исследования осуществляли с помощью электронного микроскопа Versa 3D DualBeam (FEI, США) в режимах высокого вакуума, естественной среды и криорежиме при детектировании вторичных электронов. Изображения в режиме высокого вакуума получены с использованием детекторов ETD и ICE при низких ускоряющих напряжениях, что позволило минимизировать накопление электрического заряда на образцах и усилить топографический контраст.

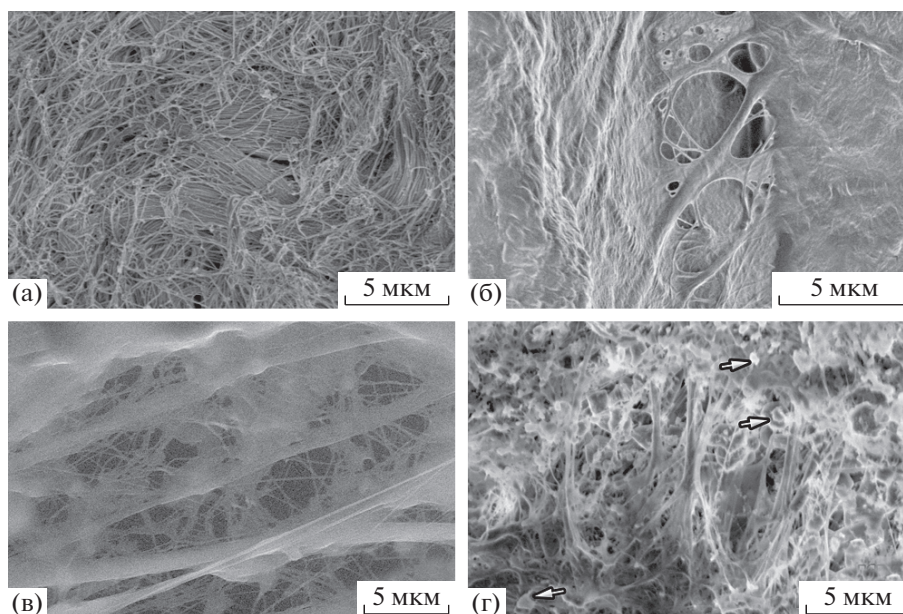
Изображения в режиме естественной среды получены с помощью низковакуумного детектора вторичных электронов GSED при температуре 3°C. Гидратированные образцы наносили на столик с элементом Пельтье для охлаждения, установленный в камере микроскопа. Воздух в камере откачивали до давления 683 Па. Последовательное понижение влажности в камере микроскопа от 100 до 60% позволило выявить морфологические особенности матриц.

Криоэксперименты проводили с помощью криогенной системы Quorum Tech. PP3010T (Quorum, Великобритания) при температуре — 140°C. Образец замораживали в переохлажденном жидком азоте и переносили в предварительно откачанную до высокого вакуума камеру микроскопа на столик, охлаждающийся в процессе непрерывной циркуляции азота. Для выявления дополнительных морфологических особенностей матриц образцы сублимировали в течение 10 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

РЭМ-изображения краевых участков диафрагмы крысы представлены на рис. 1. На всех изображениях наблюдаются микроволокна, однако морфология образцов значительно различается. Каждому методу подготовки образца и исследования соответствуют свои особенности, которые будут рассмотрены ниже.

РЭМ-изображение образца, подготовленного методом сушки в критической точке, полученное в режиме высокого вакуума (рис. 1а), позволяет полностью визуализировать все типы волокон



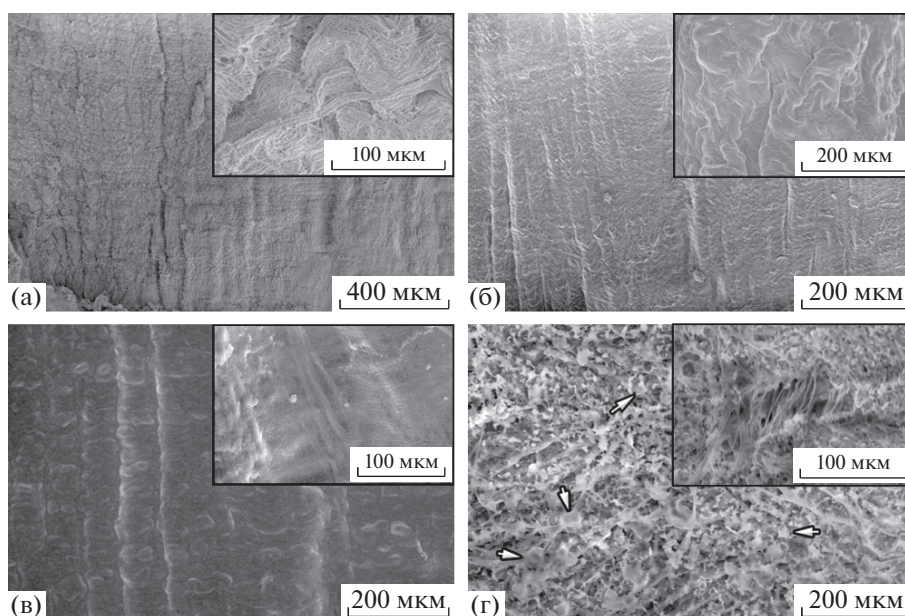
**Рис. 1.** РЭМ-изображения краевых участков децеллюризированной диафрагмы крысы: а – образец подготовлен методом сушки в критической точке (режим высокого вакуума); б – исходный образец (без предварительной подготовки) (режим высокого вакуума); в – исходный образец (ЕРЭМ); г – исходный образец (КриоРЭМ), стрелками помечены кристаллы льда.

образца – единичные или собранные в пучки – микрофибриллы. Можно легко различить волокна и в микрофибриллах. Изображение исходного образца (без предварительной подготовки), полученное в РЭМ в режиме высокого вакуума, представлено на рис. 1б. На поверхности образца отчетливо видна пленка, затрудняющая визуализацию и анализ микроструктуры волокон. Результат использования метода ЕРЭМ (исследования не обработанного предварительно образца) демонстрирует рис. 1в. Этот метод позволил получить изображения микроволокна на краю образца в состоянии, близком к нативному, при высокой влажности в камере микроскопа. На этом изображении можно увидеть различия между отдельными волокнами и микрофибриллами. Изображение, полученное с помощью КриоРЭМ после сублимации, представлено на рис. 1г. Микроструктура проявляется достаточно отчетливо: можно различить как отдельные волокна, так и микрофибриллы. В то же время появляются артефакты в виде кристаллов льда размерами от 0.1 до 2 мкм. Появление артефактов затрудняет количественный и качественный анализ волокон матрикса. Особенно негативным этот эффект может быть при исследовании матрикса, заселенного клетками.

На рис. 2 представлены РЭМ-изображения центральных участков децеллюризированной диафрагмы с низким увеличением. На рис. 2а–2в

отчетливо прослеживаются продольные тяжи, на рис. 2г таких тяжей не наблюдается, а видны волокна и микрофибриллы. Увеличенные изображения этих участков (рис. 2, вставки) показывают, что методы РЭМ в высоком вакууме, ЕРЭМ и КриоРЭМ исследования образца, полученного с помощью сушки в критической точке, в большей или меньшей степени дают возможность визуализировать волокна, из которых состоят продольные тяжи. Пленка, образующаяся на поверхности матрикса, не подверженного предварительной обработке (рис. 2б, вставка), не позволяет различить микроструктуру волокна. Отметим, что, несмотря на высокую популярность методики сушки в критической точке, обусловленной тем, что удаление сверхкритического диоксида углерода происходит без капиллярных эффектов, можно наблюдать существенное изменение структуры матрикса. Полученные таким образом данные не следует считать отражающими в полной мере структуру децеллюляризованного матрикса, они отражают лишь структуру основных его каркасных коллагеновых микрофибрилл.

Таким образом, исследование структурных элементов децеллюляризованных матриксов необходимо проводить с применением различных техник подготовки образцов и методов РЭМ.



**Рис. 2.** РЭМ-изображения децеллюризированной диафрагмы крысы: а – образец подготовлен методом сушки в критической точке (режим высокого вакуума); б – исходный образец (без предварительной подготовки) (режим высокого вакуума); в – исходный образец (ЕРЭМ); г – исходный образец (КриоРЭМ), стрелками помечены кристаллы льда.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрированы различные подходы к визуализации матриц биологического происхождения методами РЭМ. Полученные результаты могут быть использованы в качестве предварительных при исследовании образцов. Для получения наиболее полной информации о микроструктуре образцов нативных и децеллюризированных тканей необходимо сочетание метода ЕРЭМ, обеспечивающего возможность исследования образцов тканей в состоянии, близком к нативному, с традиционной высоковакуумной РЭМ образцов, полученных с помощью сушки в критической точке. Для исследования некоторых структурных особенностей в наименее поврежденном пробоподготовкой состоянии целесообразно использовать сублимационные методики.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-13-01376 “Визуализация процессов адгезии и пролиферации стромальных и эпителиальных клеток на матрицах различного типа на основе биосовместимых полимеров”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nerem R.M., Sambanis A.* // *Tissue Eng.* 1995. V. 276. № 1. P. 3.
2. *Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.K.* // *Tissue Eng.* 2001. V. 7. № 6. P. 679.
3. *Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S.* // *Tissue Eng.* 2005. V. 11. № 1–2. P. 101.
4. *Gashti M.P., Alimohammadi F., Hulliger J., Burgener M.* // *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology* / Ed. Méndez-Vilas A. Formatex, 2012. V. 1. P. 625.
5. *Sasov A., Pauwels B., Bruyndonckx P., Liu X.* // *AIP Conf. Proc.* 2011. V. 1365. P. 140.
6. *Mikhutkin A.A., Kamyshinsky R.A., Tenchurin T.K. et al.* // *BioNanoSci.* 2018 V. 8. P. 511.
7. *Petersen T.H., Calle E.A., Zhao L. et al* // *Science.* 2010. V. 329. № 5991. P. 538.
8. *Oster G., Pollister A.* // *Physical Techniques in Biological Research.* V. 3. New York: Academic Press, 1966. P. 319.
9. *Bozzola J.J., Russell L.D.* // *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists.* Boston: Jones and Bartlett, 1992. P. 40.
10. *Collins S.P., Pope R.K., Scheetz R.W. et al.* // *Microsc. Res. Tech.* 1993. V. 25. P. 398.
11. *Drobne D., Milani M., Zimec A. et al.* // *J. Microsc.* 2005. V. 219. P. 29.
12. *Tan G., Xu P., John V.T. et al.* // *Langmuir.* 2008. V. 24. P. 10621.
13. *Danilatos G.D.* // *Micron and Microscopica Acta.* 1983. V. 14. P. 307.
14. *Danilatos G.D.* // *Foundations of Environmental Microscopy. Advances in Electronics and Electron Physics* / Ed. Hawkes P.W. Boston: Academic Press, 1988. P. 109.
15. *Bray D.* // *Supercritical Fluid Methods and Protocols. Methods In Biotechnology.* V. 13 / Ed. Williams J.R., Clifford A.A. Human Press, 2000. P. 235.