

РАСТРОВАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ В ЕСТЕСТВЕННОЙ СРЕДЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИКСАХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

© 2020 г. Р. А. Камышинский^{1,2}, Т. Д. Пацаев¹, Т. Х. Тенчурин¹, Ю. Д. Загоскин¹, Т. Е. Григорьев¹, К. А. Дариенко¹, А. А. Пантелеев¹, С. Н. Чвалун¹, А. Л. Васильев^{1,2,*}

¹ *Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия*

² *Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.

После доработки 28.04.2020 г.

Принята к публикации 28.04.2020 г.

С развитием тканевой инженерии стала очевидной необходимость глубокого понимания механизмов взаимодействия отдельных клеток и клеточных систем с биосовместимыми полимерными матриксами. Для этого необходимы данные о процессах адгезии и пролиферации клеток на матриксах. Растровая электронная микроскопия в режиме естественной среды позволяет увеличивать давление и влажность в камере микроскопа, приближая условия исследований к естественным. Представлены результаты использования растровой электронной микроскопии в исследованиях фибробластов кожи на примере ряда матриксов различной морфологии: губок, пленок и нетканых материалов на основе поли(L-)лактида, поликапролактона и сополимера поли(L-)лактида и поликапролактона. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности метода в исследованиях клеточных структур на полимерных матриксах.

DOI: 10.31857/S0023476120050100

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большое развитие получили методы тканевой инженерии, неразрывно связанные с созданием природоподобных биокомпонентных материалов, в том числе на основе различных полимерных матриксов [1–3]. Для успешного развития этого направления медицины необходима информация не только о морфологии матриксов, но и о состоянии клеточных культур, высеваемых на эти матриксы, в зависимости от их типа и состава. Кроме того, с изменением приборных методов существенно улучшились возможности визуализации клеточных систем на полимерных матриксах. В настоящее время для этих целей широко используются различные методы растровой электронной микроскопии (РЭМ) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) [4].

Однако применение указанных методов имеет ряд ограничений. Несмотря на высокое пространственное разрешение при проведении классических РЭМ-исследований, в случае работы с биоматериалами необходимо использование дополнительных методов подготовки образцов для работы в условиях высокого вакуума, таких как сушка в критической точке [5], заморозка при вы-

соком давления [6] и др. Применение КЛСМ обеспечивает возможность исследования образца в гидратированном состоянии, но накладывает существенные ограничения на пространственное разрешение.

Альтернативой указанным выше методам выступает РЭМ в режиме окружающей среды [7, 8]. Основной идеей этого метода является возможность исследования полимерных и биологических образцов без дополнительной пробоподготовки (как следствие, без неизбежных артефактов), в гидратированном состоянии, близком к нативному, за счет контролируемых значений температуры, влажности и давления в камере РЭМ [9]. С помощью РЭМ в режиме окружающей среды успешно изучены смачиваемость губчатых полимерных материалов на основе коллагена [10] и микроструктура различных биомедицинских материалов [11–15]. Растровая электронная микроскопия в режиме окружающей среды обеспечивает возможность изучения процессов гидратации/дегидратации образца [16, 17] и динамических изменений его структуры [18]. В результате использования пониженного ускоряющего напряжения в приборах с новыми электронно-оптическими системами, в том числе в высокочувствительных де-

текторах, стало возможным обойти проблему зарядки не электропроводящих образцов без напыления металлических или углеродных пленок, необходимых для снятия заряда.

В настоящей работе проведена оценка эффективности метода РЭМ в режиме окружающей среды для наблюдения клеточных структур на поверхностях матриксов без их предварительной подготовки. В качестве матриксов использованы материалы из разнообразных полимеров с различной морфологией — нетканые материалы, губки и пленки на основе поли(L-)-лактида, поликапролактона и сополимера поли(L-)-лактида с поликапролактоном, после засеяния культурой первичных фибробластов кожи человека *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Губчатые материалы получены методом сублимационной сушки замороженных 2 и 3 мас. % растворов полимера в 1,4-диоксане. Нетканые материалы получали электроформованием полимерных растворов в хлороформе. Пленки получены методом прессования расплавов полимеров. Все типы материалов изготовлены из полимеров на основе поли(L-)-лактида (4032D, “NatureWorks”), поликапролактона (440744, Sigma Aldrich) и сополимера поли(L-)-лактида с поликапролактоном (RESOMER LC 703 S, “Evonik”).

Образцы матриксов, засеянных культурой первичных дермальных фибробластов (sFb), переносили на электронно-микроскопический столик с пелтэе-охлаждением, установленный в камере РЭМ Versa 3D DualBeam (ThermoFisher Scientific, США). Далее проводили откачку камеры РЭМ до низких значений вакуума (1224 Па) при температуре 10°C и 100%-ной влажности. На первом этапе все образцы изучали при 100%-ной влажности, однако при данных условиях наблюдалось частичное или полное покрытие поверхности изучаемого матрикса слоем жидкости, содержащейся в образце, что существенно затрудняло оценку его морфологии. Последовательное уменьшение влажности в камере РЭМ позволило визуализировать микроструктуру изучаемых материалов и существенно улучшить соотношение сигнал—шум в процессе получения экспериментальных данных. Изображения получены с помощью детектора вторичных электронов GSED (Gaseous Secondary Electron Detector) при ускоряющем напряжении 10 кВ и токе 93 пА.

Перед началом настоящего исследования методом РЭМ в режиме окружающей среды микроструктура матриксов была подробно изучена классическим методом РЭМ в режиме высокого вакуума. Предварительные исследования адгезионных и пролиферативных свойств матриксов продемонстрировали наилучшие результаты при

использовании нетканого матрикса на основе поликапролактона, пленки на основе поли(L-)-лактида и губки на основе их сополимера. Эти образцы и были выбраны для проведения исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как оказалось, в условиях низкого вакуума (1224 Па) и влажности 80% при температуре объекта 10°C возможно получение качественных изображений матриксов различных типов и клеток, расположенных на матриксах. Зарядки образца в процессе исследования не происходит, изображения стабильны. При облучении образца электронами энергией 10 кэВ декомпозиции клеток также не отмечается. Примеры полученных изображений полимерных матриксов после засеяния культурой первичных фибробластов кожи человека *in vitro* представлены на рис. 1. Получить подобные РЭМ-изображения в стандартном режиме высокого вакуума даже при пониженном ускоряющем напряжении было практически невозможно из-за мгновенной декомпозиции и зарядки органического материала при облучении электронами.

В случае нетканого матрикса на основе поликапролактона (рис. 1а, 1б) различимы два типа волокон — тонкие волокна диаметром около 1 мкм и более крупные волокна с развитой поверхностью и средним диаметром около 4 мкм. Микроструктура непосредственно матриксов совпадает с наблюдаемой на незасеянных фибробластами образцах. В объеме нетканого материала отчетливо видны образования размером от 15 до 50 мкм, морфология которых характерна для клеток (показаны стрелками). Плотность распределения таких объектов достигает $\sim 1.5 \times 10^4 \text{ см}^{-2}$.

Изображение губки на основе сополимера поли(L-)-лактида и поликапролактона после засеяния клеточной культуры представлено на рис. 1в, 1г. При внимательном рассмотрении (увеличенное изображение приведено на рис. 1г) выявлена пористая микроструктура образца. Из-за сложной морфологии образца однозначный вывод о присутствии клеток на поверхности матрикса не очевиден. Особенности изображения, указанные стрелками на рис. 1г, могут быть интерпретированы как фибробласты на поверхности губки. Дополнительная поддержка такой интерпретации получена из положительной оценки уровня экспрессии биологических маркеров адгезии и пролиферативной активности этого типа матрикса (данные не представлены в этой работе). Можно предположить также проникновение клеток в более глубокие слои пор, где визуализация клеток на поверхности губчатого материала затруднительна.

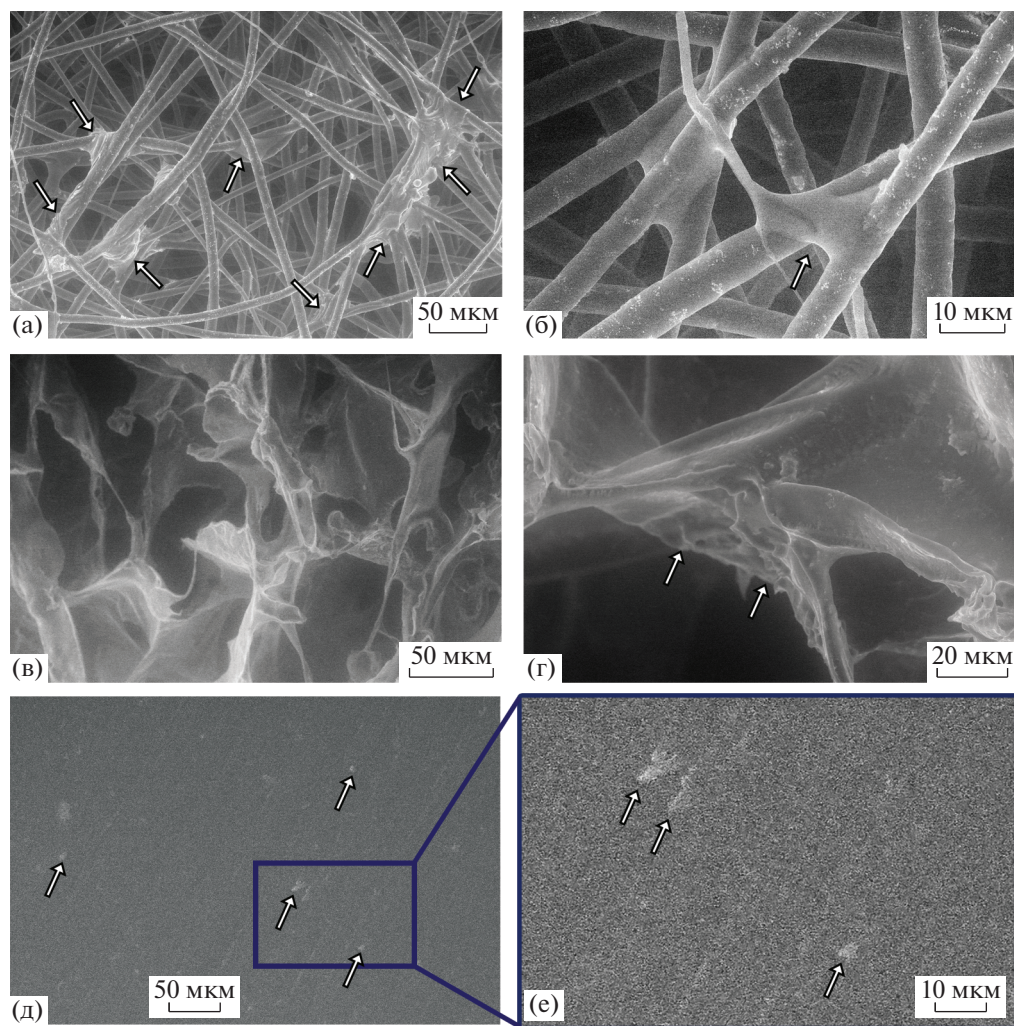


Рис. 1. РЭМ-изображения полимерных матриц после засева культуры первичных фибробластов кожи человека *in vitro*, полученные в режиме естественной среды регистрацией вторичных электронов: а – клетки (указано стрелками) в нетканом матриксе на основе поликапролактона, б – увеличенное изображение клетки (указано стрелкой) в нетканом матриксе; в – губка на основе сополимера поли(L)-лактида и поликапролактона с клетками; г – увеличенное изображение губки с клетками, предполагаемые изображения клеток показаны стрелками; д – пленка на основе поли(L)-лактида, е – увеличенное изображение пленки; стрелки указывают на особенности, которые могут быть интерпретированы как образования, связанные с фибробластами.

При исследовании пленок на основе поли(L)-лактида (рис. 1д, 1е) на их поверхностях обнаружены образования (показаны стрелками) с размерами, не превышающими 10–15 мкм, что несколько отличается от размеров наблюдаемых объектов на матриксах других типов. В этом случае можно предположить, что фибробласты на поверхности пленки плоские, рельеф практически отсутствует и поэтому они практически не видны. Таким образом, исследование методом РЭМ в режиме окружающей среды не позволило однозначно выявить фибробласты на поверхности образца.

ВЫВОДЫ

Использование метода РЭМ в режиме окружающей среды позволяет исследовать клеточные структуры кожи человека (фибробласты) на полимерных матриксах без предварительной подготовки образцов. Важный параметр эксперимента – влажность, возможно использование пониженного до 10 кВ ускоряющего напряжения. В подобранных условиях эксперимента минимизируется декомпозиция образцов, изображения стабильны, отсутствует и зарядка образцов. В случае нетканого материала на основе поликапролактона удалось визуализировать объекты, представляющие собой внеклеточный матрикс и клетки

культуры дермальных фибробластов. Менее очевидные результаты получены при изучении губчатого материала и пленок.

Проведенная работа поможет в исследованиях клеточных структур на полимерных матриксах, что необходимо для развития методов тканевой инженерии.

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

Пористые лактидные материалы разработаны при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 1362 от 25.06.2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lukanina K.I., Grigoriev T.E., Krashennnikov S.V. et al.* // Carbohydr. Polym. 2018. V. 191. P. 119. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.061>
2. *Romanova O.A., Tenchurin T.H., Demina T.S. et al.* // Cell Prolif. 2019. V. 52. № 3. P. 1. <https://doi.org/10.1111/cpr.12598>
3. *Tenchurin T.K., Istranov L.P., Istranova E.V. et al.* // Nanotechnologies Russ. 2018. V. 13. № 9–10. P. 476. <https://doi.org/10.1134/S1995078018050154>
4. *Mikhutkin A.A., Kamyshinsky R.A., Tenchurin T.K. et al.* // BioNanoScience. 2018. V. 8. № 2. P. 511. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0493-0>
5. *Horridge G.A., Tamm S.L.* // Science. 1969. V. 163. № 3869. P. 817. <https://doi.org/10.1126/science.163.3869.817>
6. *Moor H.* // Cryotechniques in Biological Electron Microscopy / Eds. Steinbrecht R.A., Zierold K. Berlin, Heidelberg: Springer, 1987. P. 175. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72815-0_8
7. *Danilatos G.D.* // J. Microsc. 1990. V. 160. № 1. P. 9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1990.tb03043.x>
8. *Danilatos G.D.* // Microsc. Res. Tech. 1993. V. 25. № 5–6. P. 354. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070250503>
9. *Muscariello L., Rosso F., Marino G. et al.* // J. Cell. Physiol. 2005. V. 205. № 3. P. 328. <https://doi.org/10.1002/jcp.20444>
10. *Ruozi B., Tosi G., Leo E. et al.* // Mater. Sci. Eng. C. 2007. V. 27. № 4. P. 802. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.08.018>
11. *Stokes D.J., Rea S.M., Porter A.E. et al.* // Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 2002. V. 711. P. 113. <https://doi.org/10.1557/proc-711-ff6.5.1>
12. *Chen J., Birch M.A., Bull S.J.* // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2010. V. 21. № 1. P. 277. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3843-9>
13. *Maia-Brigagão C., de Souza W.* // Micron. 2012. V. 43. № 2–3. P. 494. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.08.008>
14. *Bridier A., Meylheuc T., Briandet R.* // Micron. 2013. V. 48. P. 65. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.02.013>
15. *Gatti A.M., Kirkpatrick J., Gambarelli A. et al.* // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2008. V. 19. № 4. P. 1515. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3385-6>
16. *Stokes D.J.* // Adv. Eng. Mater. 2001. V. 3. № 3. P. 126. [https://doi.org/10.1002/1527-2648\(200103\)3:3<126::AID-ADEM126>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1527-2648(200103)3:3<126::AID-ADEM126>3.0.CO;2-B)
17. *Ivanova A., Mitiurev N., Cheremisin A. et al.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47139-y>
18. *McGregor J.E., Donald A.M.* // J. Phys. Conf. Ser. 2010. V. 241. P. 012021. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/241/1/012021>