

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-143-148

ТРЕХМЕРНЫЙ АНАЛИЗ МИКРО- И НАНОСТРУКТУРЫ ТКАНИ ЛЕГКОГО МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

А.Е. Ефимов, О.И. Агапова, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, И.И. Агапов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель. Провести анализ трехмерной микро- и наноструктуры и количественных морфологических параметров ткани легкого крысы. **Материалы и методы.** Для исследования, были получены образцы ткани легкого крысы породы Wistar. Изучение трехмерной структуры ткани легкого было выполнено методом сканирующей зондовой нанотомографии при помощи экспериментальной установки, объединяющей ультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп. **Результаты.** Получены наномасштабные изображения и трехмерные нанотомографические реконструкции участков межальвеолярных перегородок легкого крысы. Определены морфологические параметры поверхности межальвеолярной перегородки: средняя шероховатость, удельная эффективная площадь. Установлено, что средняя шероховатость реконструированной поверхности перегородки составляет $345,4 \pm 24,5$ нм, а удельная эффективная площадь $2,7 \pm 0,2$ ед. **Выводы.** Полученные в результате исследования данные демонстрируют, что технология сканирующей зондовой нанотомографии позволяет определять количественные характеристики морфологии ткани легкого. Использование метода сканирующей зондовой нанотомографии для трехмерного анализа структуры и характеристик ткани легкого позволит повысить эффективность разработок по созданию новых критериев диагностики патологических состояний.

Ключевые слова: легкие, альвеолы, межальвеолярная перегородка, сканирующая зондовая микроскопия, нанотомография.

3D ANALYSIS OF THE MICRO- AND NANOSTRUCTURE OF LUNG TISSUE BY SCANNING PROBE NANOTOMOGRAPHY

A.E. Efimov, O.I. Agapova, L.A. Safonova, M.M. Bobrova, I.I. Agapov

Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Objective: to analyze the 3D micro- and nanostructure and quantitative morphological parameters of rat lung tissue. **Materials and methods.** Wistar rat lung tissue samples were obtained for the study. The 3D structure of the lung tissue was studied via scanning probe nanotomography using an experimental setup combining an ultramicrotome and a scanning probe microscope. **Results.** Nanoscale images and 3D nanotomographic reconstructions of the interalveolar septal sections of the rat lung were obtained. Morphological parameters (average roughness and specific effective area) of the interalveolar septal surface were determined. It was found that the average roughness of the reconstructed septal surface was 345.4 ± 24.5 nm, and the specific effective area was 2.7 ± 0.2 units. **Conclusions.** Results obtained demonstrate that scanning probe nanotomography allows to quantify lung morphology. The use of scanning probe nanotomography for 3D analysis of the structure and characteristics of lung tissue will increase the efficiency of future developments on creation of new criteria for diagnosing pathological conditions.

Keywords: lung, alveolus, interalveolar septum, scanning probe microscopy, nanotomography.

Для корреспонденции: Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

Corresponding author: Igor Agapov. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Развитие методов микроскопических исследований трехмерной наноструктуры клеток и тканей чрезвычайно важно для понимания структурных и молекулярных механизмов, отвечающих за их функциональность и своевременного детектирования патологических изменений. Таким образом, большое значение приобретают современные методы исследования трехмерной микро- и наноструктуры биологических объектов, в частности, такие методы микроскопии высокого разрешения, как сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) и сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком (СЭМ/ФИП) [1, 2].

Исследования с использованием СЭМ/ФИП позволили реконструировать трехмерную организацию альвеол в ткани легких мыши [3] и миофибрилл, Т-трубочек, саркоплазматического ретикулума и митохондрий в миоцитах [4, 5]. Недавнее открытие взаимосвязанных сетей митохондрий в мышечных клетках [6] убедительно доказывает, что методы нанотомографии позволяют эффективно исследовать трехмерные взаимосвязи между клеточными органеллами, компартментами и системами. Эти структуры практически невозможно охарактеризовать полностью, используя обычные методы микроскопии, позволяющие получать только двухмерные изображения и проекции клеточных структур. Однако СЭМ/ФИП нельзя назвать оптимальным методом для анализа биологических объектов, так как используемые электронные и ионные пучки могут вызывать нежелательные повреждения структуры поверхности, а контраст и разрешение на СЭМ-изображениях образцов после воздействия ионного пучка могут быть снижены [1, 2, 7, 8].

Физические принципы получения изображений при помощи СЗМ принципиально отличаются от принципов как оптической, так и электронной микроскопии [9–11]. В случае СЗМ растровые изображения топографии и распределений физических свойств поверхности образца строятся за счет анализа особенностей физического взаимодействия сверхострого зонда (кантилевера) со сканируемой поверхностью. Интеграция техники получения сверхтонких срезов образца (ультрамикротомии) с методами СЗМ в рамках единого приборного комплекса позволяет реализовать технологию сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) [2]. Компьютерная обработка серий последовательных СЗМ-изображений поверхности образца, полученных непосредственно после сверхтонких срезов, дает возможность при помощи специализированного программного обеспечения выполнять трехмерную реконструкцию микро- и наноструктуры исследуемых образцов, что позволяет применять любые методики СЗМ для задач

трехмерного анализа. Таким образом, анализ трехмерных структур тканей различных органов методом СЗНТ дает возможность получать уникальную информацию об их наномасштабной организации, недоступную для других методов. Немаловажно также, что анализ трехмерных СЗНТ-реконструкций биологических объектов и материалов позволяет количественно оценивать такие важные параметры их наноморфологии, как микро- и нанопористость [12], эффективная площадь и шероховатость поверхности, отношение площади поверхности к объему [13].

Развитие технологии СЗНТ в применении к исследованиям органов и тканей может позволить разработать новые методы и критерии диагностики состояния органов доноров и пациентов для задач современной трансплантологии. В данной работе представлены исследования трехмерных структур ткани легкого крысы с использованием методов СЗНТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов ткани легкого крысы для исследований методами сканирующей зондовой нанотомографии

В экспериментах использовали самцов крыс породы Wistar (вес особи 250–350 г). Операцию с животными осуществляли под ингаляционным эфирным наркозом. Крысу помещали брюхом вверх на операционный стол и расправляли лапы. Пинцетом оттягивали кожу на брюхе, и ножницами выполняли продольный разрез кожи на средней линии брюшной стороны тела от полового отверстия до грудины. Кожу отворачивали и закрепляли. Далее вскрывали грудную полость, производили забор легких, отсекая трахею и артерии. После забора легкие помещали в раствор натрий-фосфатного буфера (рН = 7,4) и отмывали от крови.

Для изготовления препарата для СЗНТ при помощи скальпеля вырезали фрагменты ткани легкого размером 3×3 мм. Далее для фиксации полученных образцов фрагменты помещали в 2,5% раствор глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере (рН = 7,4) и инкубировали в течение 2 часов в темноте при +4 °С. Затем производили три отмывки образцов в натрий-фосфатном буфере по 10 минут. После этого производили дегидратацию образцов проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией по схеме:

- а) р-р этанола 30% – 10 мин;
- б) р-р этанола 50% – 10 мин;
- в) р-р этанола 70% – 10 мин;
- г) р-р этанола 80% – 10 мин;
- д) р-р этанола 96% – 10 мин.

Далее производили три отмывки образцов в пропиленоксиде по 10 минут, а затем инкубировали в

смеси пропиленоксида и эпоксидной смолы в соотношении 1:1 в течение 30 минут, после чего образцы переносили в смесь пропиленоксида и эпоксидной смолы в соотношении 1:2 и инкубировали в течение 30 минут. Затем образцы заключали в эпоксидную смолу, инкубировали в термостате при 45 °С в течение 24 часов, после чего продолжали инкубацию в течение 48 часов при температуре 60 °С.

Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, кат. № 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилэтантарный ангидрид, Sigma-Aldrich, США, кат. № 45346) и 4% по массе DMP-30 (Sigma-Aldrich, США, кат. № 45348).

Сканирующая зондовая нанотомография образцов ткани легкого крысы

Для исследований образцов ткани легкого крысы методами СЗНТ использовалась экспериментальная установка Ntegra Томо. Данный комплекс позволяет производить последовательные СЗМ-измерения поверхности образцов непосредственно после выполнения среза ультрамикротомом. Последовательные срезы образца толщиной 60 нм выполнялись с использованием алмазного ножа Diatome Ultra AFM 35 (Diatome AG, Швейцария) с шириной режущей кромки 2,0 мм.

СЗМ-измерения проводились в полуконтактном режиме при скорости сканирования 1,0 Гц с использованием кремниевых зондов-кантилеверов NSG10 (NT-MDT, Москва) с резонансной частотой 240 кГц и радиусом кривизны острия <10 нм. Первичная обработка изображений проводилась в программе Nova ImageAnalysis 1.0.26.1443 (NT-MDT, Москва), трехмерные томографические реконструкции структуры легкого были получены в программе ImagePro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc, США).

Вычисление морфологических параметров трехмерных поверхностей

Анализ реконструированных методом СЗНТ поверхностей при помощи программного обеспечения ImagePro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc, США) позволяет определить и проанализировать наномасштабные параметры этих поверхностей, такие как средняя шероховатость R_a и эффективная площадь поверхности σ .

Для вычисления данных параметров реконструированная поверхность рассматривается как двумерный массив данных (значений высот Z) размера $N \times M$, где N и M – число столбцов и строк. Перед вычислениями из поверхности вычитают поверхность первого порядка (плоскость), что соответствует устранению наклона.

Средняя шероховатость поверхности R_a рассчитывается как среднее значение модуля отклонения значения высоты точек массива от среднего значения высоты:

$$R_a = \frac{1}{N} \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M |Z_{ij} - \langle Z \rangle|, \quad (1)$$

где $Z_{i,j}$ – значение высоты в точке массива (i, j) , $\langle Z \rangle$ – среднее значение высоты Z , усредненное по всему массиву:

$$\langle Z \rangle = \frac{1}{N} \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M Z_{ij}. \quad (2)$$

Эффективная площадь поверхности σ вычисляется как отношение площади поверхности к площади ее двумерной проекции на плоскость. Этот параметр определяет степень развитости поверхности [14]. Реконструированная площадь поверхности S вычисляется с использованием метода триангуляции как сумма по массиву элементарных площадей $s_{i,j}$ поверхности элементарных ячеек между 4 соседними точками массива (i, j) , $(i + 1, j)$, $(i, j + 1)$, $(i + 1, j + 1)$. При использовании метода триангуляции для вычисления элементарной площади вводится также средняя точка с высотой $\langle Z_{i,j} \rangle = (Z_{i,j} + Z_{i+1,j} + Z_{i,j+1} + Z_{i+1,j+1})/4$ и эффективными координатами $(i + 1/2, j + 1/2)$, и элементарная площадь вычисляется как площадь четырех треугольников, каждый из которых образован соседними вершинами элементарной ячейки и средней точкой. Так, например, площадь треугольника, образованного точками (i, j) , $(i + 1, j)$ и средней точкой задается выражением:

$$\frac{d_x d_y}{4} \sqrt{1 + \left(\frac{Z_{i,j} - Z_{i,j+1}}{d_x} \right)^2 + \left(\frac{2\langle Z_{i,j} \rangle - Z_{i,j} - Z_{i,j+1}}{d_y} \right)^2}, \quad (3)$$

где d_x и d_y – физические размеры пикселей по соответствующим осям. Так как мы используем поверхность, реконструированную методом СЗНТ, то в нашем случае d_x будет определяться пиксельным разрешением СЗМ-измерения, а d_y – толщиной среза между последовательными СЗМ-измерениями. Соответственно, эффективная площадь поверхности будет задаваться как

$$\sigma = \frac{1}{N d_x} \frac{1}{M d_y} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M s_{i,j}. \quad (4)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, а, приведен пример полученного СЗМ-изображения (65×65 мкм) среза участка респираторного отдела легкого. На данном изображении можно выделить области пузырьков с размерами порядка 20–30 мкм и наноструктурированных межальвеолярных перегородок шириной 10–20 мкм. На рис. 2

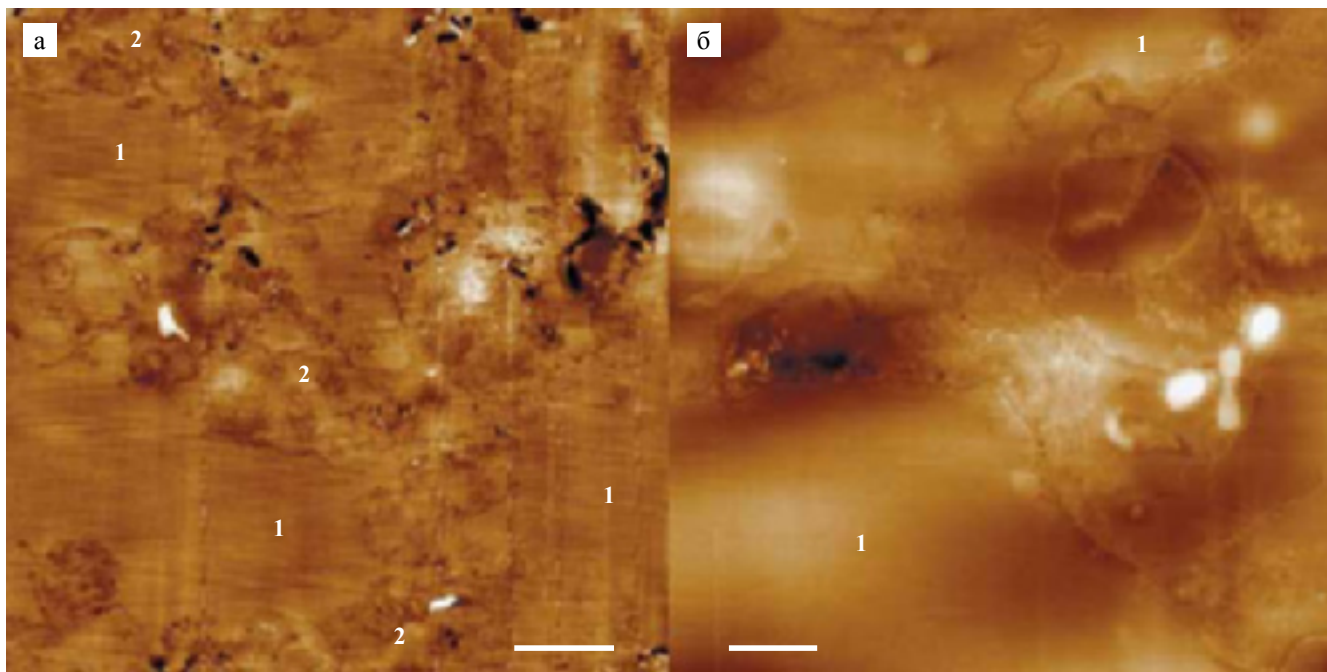


Рис. 1. СЗМ-изображение топографии поверхности участков ткани легкого крысы после среза ультрамикротомом: а – СЗМ-изображение участка респираторного отдела легкого, размер скана 65×65 мкм, диапазон вариации высоты 18 нм, размерный отрезок 10 мкм; б – СЗМ-изображение межальвеолярной перегородки, размер скана 15×15 мкм, диапазон вариации высоты 48 нм, размерный отрезок 2 мкм; 1 – области пузырьков; 2 – альвеолярные перегородки

Fig. 1. SPM topography image of surface areas of rat lung tissue after ultramicrotome section: a – SPM image of region of respiratory lung area, scan size 65×65 µm, height variation 18 nm, scale bar 10 µm; б – SPM image of region of alveolar septum, scan size 15×15 µm, height variation 48 nm, scale bar 2 µm; 1 – areas of alveolus; 2 – areas of alveolar septum

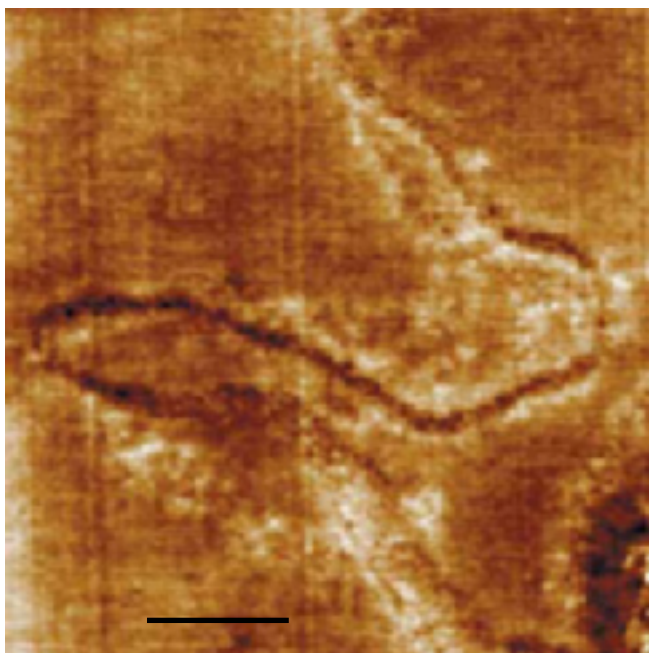


Рис. 2. СЗМ-изображение топографии поверхности среза складки межальвеолярной перегородки; размер скана 2,5×2,5 мкм, диапазон вариации высоты 13 нм, размерный отрезок 500 нм

Fig. 2. SPM topography image of surface of alveolar septum surface folding; scan size 2.5×2.5 µm, height variation 13 nm, scale bar 500 nm

представлено СЗМ-изображение (15×15 мкм) участка межальвеолярной перегородки между двумя областями пузырьков. На данном изображении видно, что межальвеолярная перегородка имеет сложную наномасштабную морфологию и выраженную наноструктуру. Топология и морфологические параметры перегородок имеют важнейшее значение для функциональности альвеол и эффективности процессов газообмена [15, 16].

Используемая технология СЗНТ позволяет изучать наноразмерные особенности поверхности межальвеолярной перегородки с высоким разрешением. На рис. 2 представлено увеличенное изображение (2,5×2,5 мкм) среза складки поверхности межальвеолярной перегородки, характеризующейся сложной формой и наноструктурой и окруженной пленкой сурфактанта.

Также важнейшим преимуществом метода СЗНТ является возможность трехмерной реконструкции тканевых структур, в частности, поверхности перегородки. На рис. 3 показано СЗМ-изображение фрагмента области границы межальвеолярной перегородки с пузырьком (16×16 мкм), имеющей сложную морфологию. Для оценки трехмерной морфологии межальвеолярной перегородки была выполнена трехмерная реконструкция данного участка при помощи

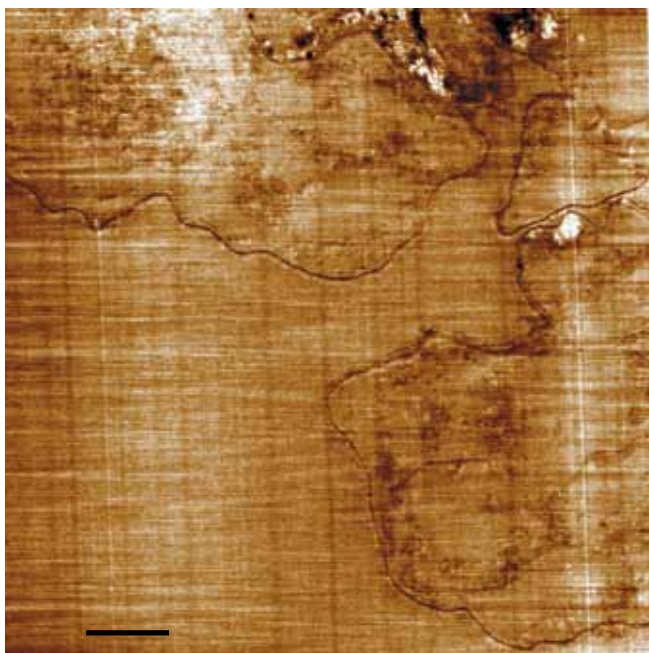


Рис. 3. АСМ-изображение топографии поверхности области границы межальвеолярной перегородки с пузырьком после среза ультрамикротомом; размер скана 16×16 мкм, диапазон вариации высоты 24 нм, размерный отрезок 2 мкм

Fig. 3. SPM topography image of the surface of a region of alveolar septum border with a alveolus; scan size 16×16 μm , height variation 24 nm, scale bar 2 μm

метода СЗНТ. Для этого выполнено 10 последовательных срезов образца толщиной 120 нм и получено 10 последовательных СЗМ-изображений участка поверхности размером 16×16 мкм. Полученная визуализация трехмерной поверхности показана на рис. 4.

Необходимо отметить, что сложная морфология поверхности межальвеолярной перегородки характеризуется значительным увеличением эффективной площади. Специализированное программное обеспечение, используемое для визуализации трехмерных реконструкций, позволяет определить как шероховатость поверхности перегородки R_a , так и удельную эффективную площадь ее поверхности σ , вычисляемую как отношение площади трехмерной поверхности к площади ее проекции на плоскость. Для полученной нами трехмерной реконструкции величина параметра удельной эффективной площади σ составляет $2,7 \pm 0,2$, что свидетельствует о высокой степени развитости поверхности. Нанощероховатость реконструированной трехмерной поверхности R_a составляет $345,4 \pm 24,5$ нм.

Интересно, что поверхность межальвеолярной перегородки часто образует изгибы и складки, приводящие к образованию внутренних пузырьков или мешочков размером в несколько микрон с узкой входной щелью. Пример изображения подобной

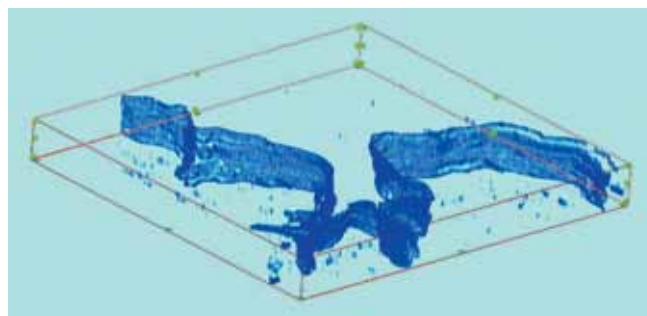


Рис. 4. Трехмерная реконструкция фрагмента поверхности межальвеолярной перегородки методом СЗНТ: $16 \times 16 \times 1,2$ мкм, толщина среза 120 нм

Fig. 4. SPNT three-dimensional reconstruction of a fragment of surface of the alveolar septum: reconstructed volume $16 \times 16 \times 1.2$ μm , section thickness 120 nm

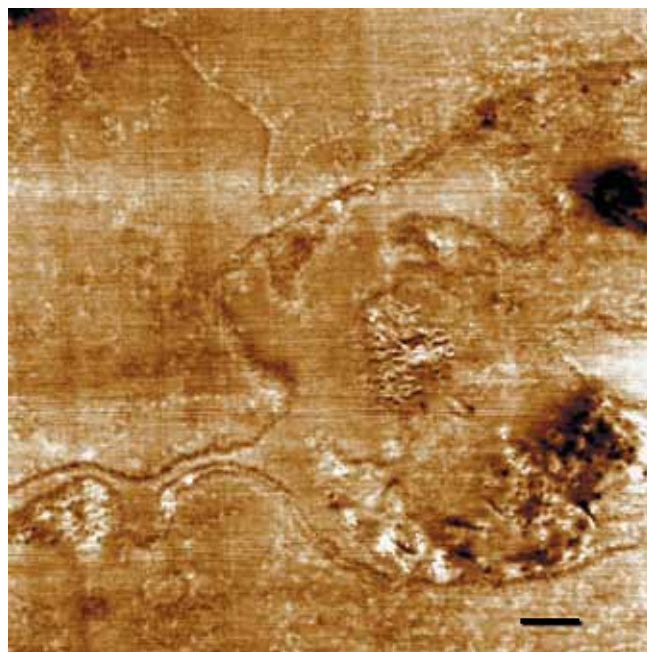


Рис. 5. СЗМ-изображение топографии поверхности фрагмента внутреннего пузырька альвеолы после среза ультрамикротомом; размер скана $5,5 \times 5,5$ мкм, диапазон вариации высоты 17 нм, размерный отрезок 500 нм

Fig. 5. SPM topography image of the surface area of an inner alveolus; scan size 5.5×5.5 μm , height variation 17 nm, scale bar 500 nm

структуры приведен на рис. 5. Заметим, что ширина воздушного «горлышка» данного внутреннего пузырька составляет около 120 нм, а поверхность перегородки во внутренней области утолщается и имеет гетерогенную структуру. Данные структуры связаны с протекающими в альвеолах процессами газообмена.

Отработанная нами методика исследования наномасштабных структур альвеол при помощи сканирующей зондовой нанотомографии применима для

решения ряда задач структурной биологии, например, актуальной проблемы исследования трехмерной организации межальвеолярных перегородок и определения их количественных морфологических параметров на наноуровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе выполнены исследования наноструктурных особенностей ткани легкого крысы с использованием метода СЗНТ. Получена трехмерная реконструкция поверхности межальвеолярной перегородки в ткани легкого крысы. Показано, что сложная трехмерная морфология ее поверхности характеризуется значительным увеличением эффективной площади поверхности перегородки. Удельная эффективная площадь поверхности σ реконструированного участка межальвеолярной перегородки составляет $2,7 \pm 0,2$, что свидетельствует о высокой степени развитости поверхности.

Технология СЗНТ позволяет получать уникальную информацию о взаимосвязи наномасштабных особенностей структуры и функциональной активности клеток и тканей.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zankel A, Wagner J, Poelt P. Serial sectioning methods for 3D investigations in materials science. *Micron*. 2014; 62: 66–78. doi: 10.1016/j.micron.2014.03.002.
2. Alekseev A, Efimov A, Loos J, Matsko N, Syurik J. Three-dimensional imaging of polymer materials by Scanning Probe Tomography. *Eur Polym J*. 2014; 52: 154–165. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.01.003.
3. Kremer A, Lippens S, Bartunkova S, Asselbergh B, Blanpain C, Fendrych M et al. Developing 3D SEM in a broad biological context. *J Microsc*. 2015; 259 (2): 80–96. doi: 10.1111/jmi.12211.
4. Sulkin MS, Yang F, Holzem KM, Van Leer B, Bugge C, Laughner JJ et al. Nanoscale three-dimensional imaging of the human myocyte. *J Struct Biol*. 2014; 188 (1): 55–60. doi: 10.1016/j.jsb.2014.08.005.
5. Dahl R, Larsen S, Dohlmann TL, Qvortrup K, Helge JW, Dela F, Prats C. Three-dimensional reconstruction of the human skeletal muscle mitochondrial network as a tool to assess mitochondrial content and structural organization. *Acta Physiol*. 2015; 213: 145–155. doi: 10.1111/apha.12289.
6. Glancy B, Hartnell LM, Malide D, Yu Z-X, Combs CA, Connelly PS et al. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature*. 2015; 523: 617–620. doi: 10.1038/nature14614.
7. Bailey RJ, Geurts R, Stokes DJ, de Jong F, Barber AH. Evaluating focused ion beam induced damage in soft materials. *Micron*. 2013; 50: 51–56. doi: 10.1016/j.micron.2013.04.005.
8. Linkov P, Artemyev M, Efimov AE, Nabiev I. Comparative advantages and limitations of the basic metrology methods applied to the characterization of nanomaterials *Nanoscale*. 2013; 5: 8781–8798. doi: 10.1039/c3nr02372a.
9. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*. 1986; 56 (9): 930–933. doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
10. Magonov SN, Reneker DH. Characterization of polymer surfaces with atomic force microscopy. *Annu Rev Mater Sci*. 1997; 27 (1): 175–222. doi: 10.1146/annurev.matsci.27.1.175.
11. Gallyamov MO. Scanning Force Microscopy as Applied to Conformational Studies in Macromolecular Research. *Macromol Rapid Commun*. 2011; 32 (16): 1210–1246. doi: 10.1002/marc.201100150.
12. Efimov AE, Moisenovich MM, Bogush VG, Agapov II. 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spider silk scaffolds by scanning probe nanotomography. *RSC Adv*. 2014; 4: 60943–60947. doi: 10.1039/c4ra08341e.
13. Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA, Bobrova MM, Parfenov VA, Koudan EV et al. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold. *Express Polymer Letters*. 2019; 13 (7): 632–641. doi: 10.3144/expresspolymlett.2019.53.
14. Gómez-Pozos H, González-Vidal JL, Torres GA, de la Luz Olvera M, Castañeda L. Physical Characterization and Effect of Effective Surface Area on the Sensing Properties of Tin Dioxide Thin Solid Films in a Propane Atmosphere. *Sensors*. 2014; 14: 403–415. doi: 10.3390/s140100403.
15. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. How to Measure Lung Structure – What For? On the «Standards for the Quantitative Assessment of Lung Structure». *Respir Physiol Neurobiol*. 2010; 171 (2): 72–74. doi: 10.1016/j.resp.2010.02.016.
16. Yang L, Feuchtinger A, Möller W, Ding Y, Kutschke D, Möller G et al. Three-Dimensional Quantitative Co-Mapping of Pulmonary Morphology and Nanoparticle Distribution with Cellular Resolution in Nondissected Murine Lungs. *ACS Nano*. 2019; 13 (2): 1029–1041. doi: 10.1021/acsnano.8b07524.

*Статья поступила в редакцию 22.06.2020 г.
The article was submitted to the journal on 22.06.2020*