DOI: 10.15825/1995-1191-2017-4-78-87

ТРЕХМЕРНЫЙ АНАЛИЗ МИКРО- И НАНОСТРУКТУРЫ БИОМАТЕРИАЛОВ И КЛЕТОК МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ КРИОНАНОТОМОГРАФИИ

А.Е. Ефимов[1], О.И. Агапова[1], Л.А. Сафонова[1, 2], М.М. Боброва[1, 2], И.И. Агапов[1]

[1] Лаборатория бионанотехнологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация
[2] Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Цель. Провести трехмерный анализ микро- и наноструктуры и количественных морфологических параметров альгинатных сферических клеточных микроносителей и макроносителей на основе регенерированного шелка, модифицированных микрочастицами межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы, а также клеток гепатокарциномы человека HepG2, адгезированных на микро- и макроносители. **Материалы и методы.** Трехмерные пористые матриксы из регенерированного шелка, полученные методом выщелачивания, и сферические альгинатные микроносители, полученные методом инкапсуляции, были витализированы клетками гепатокарциномы человека HepG2. Изучение трехмерной структуры клеток и микро- и макроносителей производилось при температуре –120 °С методом сканирующей зондовой крионанотомографии при помощи экспериментальной установки, объединяющей криоультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп. **Результаты.** Получены трехмерные нанотомографические реконструкции клеток HepG2, адгезированных на стенку макропоры матрикса из регенерированного шелка и на сферический альгинатный микроноситель. Определены морфологические параметры поверхностей макро- и микроносителей и адгезированных клеток: средняя шероховатость, удельная эффективная площадь и длина автокорреляции. Установлено, что средняя шероховатость поверхности альгинатных микроносителей составляет 76,4 ± 7,5 нм, а средняя шероховатость поверхности стенки макроносителя на основе регенерированного шелка – 133,8 ± 16,2 нм, в то время как средняя шероховатость внешних поверхностей клеток, адгезированных на микро- и макроносители, составляет 118,5 ± 9,0 и 158,8 ± 21,6 нм соответственно. Получены трехмерные реконструкции внутриклеточных компартментов размером от 140 до 500 нм. **Выводы.** Полученные в результате исследования количественные характеристики морфологии поверхностей клеточных носителей и адгезированных на них клеток позволяют исследовать корреляцию морфологических параметров поверхностей клеточных носителей и их биологические свойства. Использование метода сканирующей зондовой крионанотомографии для трехмерного анализа структуры и характеристик биоматериалов, клеток и биоискусственных клеточных конструкций позволит повысить эффективность разработок по созданию новых клеточно-инженерных конструкций с заданными физико-химическими и биологическими характеристиками для задач тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Ключевые слова: альгинат, фиброин, биоматериалы, клетки HepG2, биосовместимые матриксы, сканирущая зондовая нанотомография.

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

For correspondence: Agapov Igor Ivanovich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

THREE-DIMENSIONAL ANALYSIS OF MICRO- AND NANOSTRUCTURE OF BIOMATERIALS AND CELLS BY METHOD OF SCANNING PROBE NANOTOMOGRAPHY

A.E. Efimov[1], O.I. Agapova[1], L.A. Safonova[1, 2], M.M. Bobrova[1, 2], I.I. Agapov[1]

[1] Laboratory of Bionanotechnology, V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

[2] Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Aim: to perform a three-dimensional analysis of micro- and nanosctucture and quantitative morphological parameters of alginate spherical microcarriers and porous regenerated silk macrocarriers modified by microparticles of decellularized rat liver matrix and human hepatoma HepG2 cells adhered to micro- and macro carriers. **Materials and methods.** Three-dimensional porous matrices made from regenerated silk by salt leaching technique and alginate spherical microcarriers fabricated by encapsulation were vitalized by human hepatome HepG2 cells. Study of three-dimensional structure of cells and micro- and macro carriers was carried out at –120 °C by scanning probe cryonanotomography technique with use of experimental setup combining cryoultramicrotome and scanning probe microscope. **Results.** Three-dimensional nanotomographical reconstructions of HepG2 cells adhered to macropore wall of regenerated silk macrocarrier and to spherical alginate microcarrier are obtained. Morphological parameters (mean roughness, effective surface area and autocorrelation length) are determined for surfaces of macro and microcarriers and adhered cells. The determined mean roughness of alginate microcarrier surface is 76.4 ± 7.5 nm, while that of surface of macropore wall of regenerated silk macrocarrier is 133.8 ± 16.2 nm. At the same time mean roughness of cells adhered to micro- and macrocarriers are 118.5 ± 9.0 и 158.8 ± 21.6 nm correspondingly. Three-dimensional reconstructions of intracellular compartments with dimensions from 140 to 500 nm are also obtained. **Conclusion.** Obtained as a result of study quantitative morphology characteristics of surfaces of cell carriers and adhered cells show significant degree of correlation of morphological parameters of cells and their carriers. Use of scanning probe cryonanotomography technique for three-dimensional analysis of structure and characteristics of biomaterials, cells and bio-artificial cellular systems enables to improve efficiency of development of novel cell-engineered constructions with predicted morphological, physical, chemical and biological characteristics for tasks of tissue engineering and regenerative medicine.

Key words: alginate, fibroin, biomaterials, tissue scaffolds, HepG2 cells, scanning probe microscopy, nanotomography.

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования в областях структурной биологии, биомедицинских исследований и тканевой инженерии требуют развития методов трехмерной наномасштабной характеризации структуры и морфологии образцов. В настоящее время для этих целей используется ряд методов микроскопии высокого разрешения, таких как сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком (СЭМ/ФИП), рентгеновская томография и сканирующая зондовая нанотомография [1, 2].

Рентгеновская томография используется для исследований на микроуровне широкого спектра материалов, таких как полимеры, биоматериалы и биологические объекты [3]. Для подобных объектов экспериментально достигнуто разрешение порядка 50 нм. Однако для высокоразрешающей рентгеновской нанотомографии необходимо использовать образцы размерами не более 50 мкм, что ограничивает возможности применения этого метода для исследований биосовместимых матриксов и клеточно-инженерных конструкций [4, 5]. Метод СЭМ/ФИП позволяет выполнять наномасштабную реконструкцию структуры различных материалов. Этот метод основан на удалении слоев материала при помощи ионного распыления и последующего исследования поверхности образца при помощи СЭМ. Однако при исследованиях биологических и полимерных образцов этим методом могут возникать повреждения поверхности электронным и ионным пучками и нежелательные структурные нарушения, к тому же электронно-микроскопический контраст на изображениях поверхности после распыления может быть ограничен по ряду причин [1, 6, 7].

Эти недостатки методов электронной и рентгеновской томографии ограничивают их применение для анализа биологических и полимерных материалов, состоящих преимущественно из легких химических элементов, и для исследования их трех-

мерных микро- и наноструктурных характеристик необходимо использование комплементарных методов микроскопии [8].

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) позволяет анализировать нанорельеф поверхности [9]. Получение СЗМ-изображений основано на физическом взаимодействии сверхострого зонда с поверхностью образца, что позволяет получать данные, фундаментально отличающиеся от результатов электронной или рентгеновской микроскопии [10, 11]. К тому же поверхность образца может быть проанализирована при помощи ряда СЗМ-методик, таких как метод изображения фазы, отражающий вязкоупругие свойства поверхности, измерение распределения электрической проводимости и других электрических свойств поверхности при помощи проводящего зонда [12, 13], магнитно-силовая микроскопия [14], химическая силовая микроскопия [15, 16] и многие другие.

Метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) объединяет методы получения сверхтонких срезов образца (ультрамикротомия [17] или криоультрамикротомия [18]) с СЗМ, адаптированным для непосредственного измерения поверхности блока образца после среза. Интегрирование ряда последовательных изображений поверхности после сверхтонких срезов при помощи специализированного программного обеспечения позволяет реконструировать и визуализировать трехмерную структуру изучаемых объектов в объеме. При исследовании биологических объектов и биополимерных материалов метод СЗНТ имеет ряд преимуществ по сравнению с другими вышеописанными методами нанотомографии [2].

Одним из важных приложений метода СЗНТ является исследование структуры систем микро- и нанопор в различных пористых материалах, например, в пористых биосовместимых биополимерных матриксах, разрабатываемых для применения в регенеративной медицине. Взаимосвязанность нанопор и проницаемость подобных матриксов для жидкостей являются важными характеристиками, определяющими их функциональные свойства, и только трехмерный анализ позволяет корректно оценить данные характеристики, так как, согласно теории перколяции, поведение критических параметров пористых систем (например, порога перколяции) значительно различается в двумерных и трехмерных системах [19, 20].

Аналогичным образом использование СЗНТ позволяет выполнять анализ трехмерных характеристик микроволокнистых пористых систем, например биосовместимых матриксов на основе полиуретана, полученных при помощи метода электроспиннинга [21].

Непосредственный трехмерный анализ нанопористых и нановолокнистых структур при помощи СЗНТ может иметь важное значение не только для исследований биоматериалов, но и для разработки материалов и устройств для современной энергетики, например, пористых каталитических мембран для полимерных электролитических топливных элементов [22].

Использование электрических режимов СЗМ при СЗНТ-исследованиях позволило восстановить структуру трехмерных сетей проводимости, формирующихся в нанокомпозитах полистирен/нанотрубки [23] и полистирен/графен [24]. Стоит отметить, что подобные сети проводимости невозможно напрямую изучать и визуализировать другими методами микроскопии, и так же, как в случае с нанопористыми матриксами, корректный анализ взаимосвязанности подобных сетей и ее корреляции с их макроскопическими свойствами возможен только с использованием трехмерного анализа. Подобный анализ трехмерного распределения проводимости и других электрических свойств в материалах может иметь большое значение для изучения электропроводящих композитных биосовместимых матриксов, которые могут быть использованы для регенерации нервной или мышечной ткани.

Еще одним важным приложением метода СЗНТ является анализ трехмерного пространственного распределения наномасштабных компонентов в объеме различных наногибридных материалов, например, изучение распределения полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек) и их кластеров в жидкокристаллических системах [25].

Также СЗНТ позволил выполнить исследования микро- и наноструктуры полимерных микросфер с флуоресцентными метками (квантовыми точками), которые используются для медицинской диагностики, и определить влияние их наноструктурных характеристик на эффективность использования для мультиплексной диагностики [26, 27]. С использованием коррелятивного оптического анализа образцов применение подобного метода позволит исследовать трехмерное распределение флуоресцентных маркеров в объеме биологических объектов в корреляции с их наномасштабной морфологией.

Таким образом, технология СЗНТ может быть успешно использована для решения ряда задач, возникающих в биологических и биомедицинских исследованиях, в частности при разработке клеточных микро- и макроносителей для регенеративной медицины.

Особое значение для подобных исследований имеет метод крио-СЗНТ, при котором исследования образцов выполняются в замороженном состоянии, что позволяет использовать методы криофиксации мягких и гидратированных образцов (гидрогели, клетки, ткани) с сохранением их нативной структуры. Данный подход корректно позволяет оценивать

морфологические параметры подобных объектов. Для выполнения подобных исследований был разработан специализированный комбинированный приборный комплекс, объединяющий криоультрамикротом и крио-СЗМ, размещенный в его криокамере [28]. На рис. 1 показан модуль крио-СЗМ в криокамере ультрамикротома.

Так, использование крио-СЗНТ дало возможность выполнить трехмерный анализ и оценить параметры трехмерной морфологии микрочастиц межклеточного матрикса печени крысы, адгезированных на поверхности сферических альгинатных микроносителей, а также параметры морфологии поверхности немодифицированных микрочастицами сферических альгинатных микроносителей [29].

На рис. 2 представлена оптическая микрофотография альгинатного микроносителя, модифицированного микрочастицами межклеточного матрикса печени крысы, и трехмерная СЗНТ-реконструкция единичной микрочастицы на поверхности микроносителя.

Было показано, что такие усредненные морфологические параметры поверхности, как шероховатость, удельная эффективная площадь и длина автокорреляции для поверхности микрочастицы межклеточного матрикса децеллюляризованной печени заметно превосходят данные параметры для поверхности немодифицированного микроносителя.

Необходимо отметить, что трехмерная СЗНТ-реконструкция микроносителей и микрочастиц размерами от единиц до нескольких сотен микрон позволяет количественно определять морфологические параметры их поверхности, в то время как непосредственное измерение этих параметров стандартными методами СЗМ или электронной микроскопии чрезвычайно затруднено ввиду развитого рельефа и высокой степени кривизны их поверхности. При этом параметры наноразмерной шероховатости поверхности макро- и микроносителей могут в значительной степени влиять на адгезию и пролиферацию клеток, поэтому развитие методов их анализа имеет ключевое значение для разработки новых биосовместимых материалов и клеточно-инженерных конструкций на их основе [30–33].

В данной работе представлены исследования методом СЗНТ структуры клеток гепатокарциномы человека Hep-G2, адгезированных на модифици-

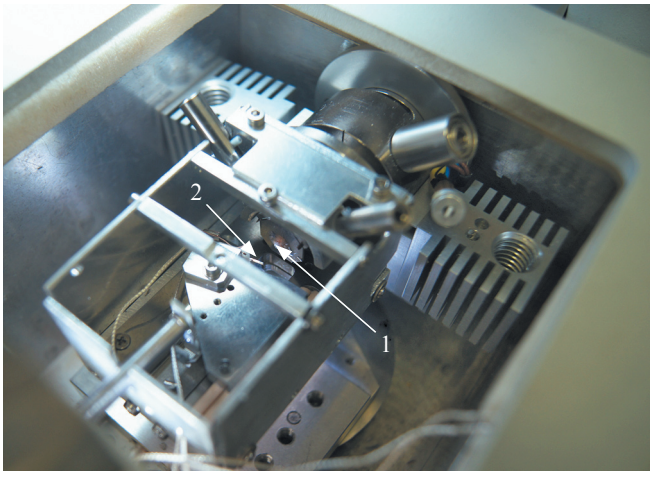

Рис. 1. Модуль СЗМ в криокамере ультрамикротома: 1 – образец; 2 – зонд СЗМ [29]

Fig. 1. CryoAFM module installed into the ultramicrotome cryochamber: 1 – sample; 2 – SPM probe [29]

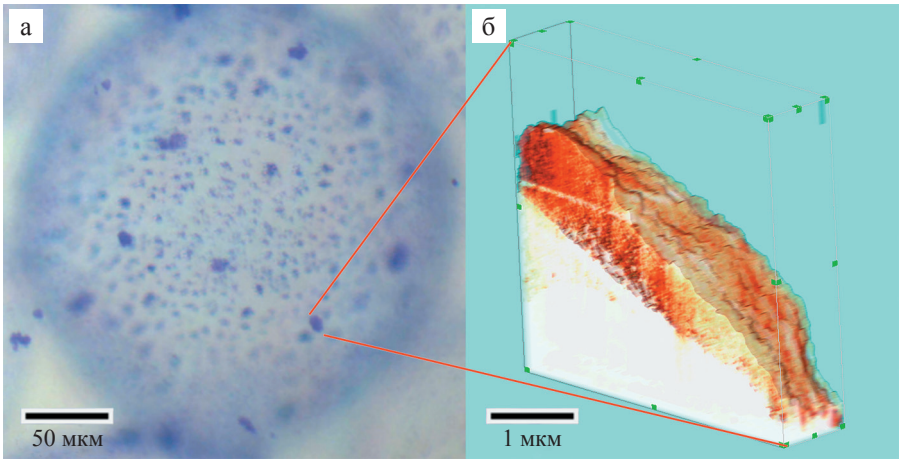

Рис. 2. Сферический альгинатный микроноситель, модифицированный микрочастицами внеклеточного матрикса печени крысы: а) оптическая микроскопия, окраска Coomassie Brilliant Blue R-250, ×100; б) трехмерная крио-СЗНТ-реконструкция единичной микрочастицы внеклеточного матрикса печени крысы на поверхности альгинатного микроносителя, реконструированный объем 5,0 × 5,0 × 1,1 мкм [29]

Fig. 2. Alginate microcarrier modified with decellularized rat liver microparticles: a) light microscopy, staining Coomassie Brilliant Blue R-250, ×100; б) CryoSPNT 3D reconstruction of decellularized rat liver microparticle on the surface of alginate microcarrier. Reconstructed volume 5.0 × 5.0 × 1.1 μm [29]

рованных микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы альгинатных микроносителях и макроносителях на основе фиброина шелка.

Целью данной работы является сравнительный анализ наноразмерных морфологических параметров поверхностей данных микро- и макроносителей и адгезированных на них клеток в корреляции с биологическими свойствами микро- и макроносителей.

Использование метода инкапсуляции позволяет получать альгинатные микросферы размером от 50 до 1000 мкм. В данной работе для исследований были использованы альгинатные микросферы диаметром от 200 до 300 мкм. Для модификации поверхности сферических альгинатных микроносителей используются микрочастицы межклеточного матрикса размером от 1 до 5 мкм, получаемые при помощи механического измельчения в жидком азоте.

Подробно методы получения микрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, получения альгинатных сферических микроносителей при помощи инкапсуляции и модификации микроносителей микрочастицами децеллюляризованной ткани описаны в [29].

Методы получения пористых клеточных макроносителей на основе регенерированного шелка при помощи выщелачивания с использованием в качестве порообразователя частиц хлорида натрия описаны в [20, 34]. Форма и размеры использованных макроносителей: цилиндры с диаметром от 10 до 12 мм, высотой от 2 до 3 мм, размер макропор: от 50 до 600 мкм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модификация поверхности пористого клеточного макроносителя на основе регенерированного шелка микрочастицами матрикса печени

Для модификации поверхности образец пористого макроносителя на основе регенерированного шелка [20, 34] был предварительно дегазирован в эксикаторе до полного удаления из него воздуха и затем перенесен в пластиковую чашку Петри. На поверхность образца макроносителя была нанесена суспензия микрочастиц межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы породы Wistar с концентрацией 20 мг/мл. Объем наносимой суспензии составлял 150 мкл. После нанесения суспензии микрочастиц межклеточного матрикса образец инкубировался в течение 12 ч в закрытой крышкой чашке Петри, а затем высушивался в течение трех часов на воздухе при комнатной температуре. С целью химической пришивки микрочастиц межклеточного матрикса на поверхность образца макроносителя наносился раствор модифицирующих агентов – гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимида, с концентрацией 9 и 30 мМ соответственно. Объем наносимого раствора составлял 150 мкл. Затем образец макроносителя инкубировался в закрытой чашке Петри в течение четырех часов при комнатной температуре и проводились две отмывки образца макроносителя от модифицирующих агентов. Для этого на образец наносилось 200 мкл бидистиллированной воды, образец инкубировался в течение 15 минут в закрытой чашке Петри, после чего избыток воды удалялся, и процедура отмывки повторялась еще раз. Затем образец макроносителя инкубировался в 100 мМ растворе трис-глицина в закрытой чашке Петри в течение 1 часа, после чего дважды отмывался бидистиллированной водой по 10 минут по вышеописанной схеме. Полученный образец модифицированного макроносителя переносился сначала в 30% этанол, а затем в 70% этанол.

Витализация микроносителей клетками гепатокарциномы человека Hep G2

Все операции по витализации образцов микроносителей проводились в стерильном ламинарном шкафу. Суспензию альгинатных микроносителей вносили в лунки стерильного 48-луночного планшета из расчета 300 мкл на лунку. В каждую лунку вносили по 200 мкл фосфатно-солевого буфера с pH 7,4 и инкубировали в течение 30 минут до осаждения микроносителей, затем супернатант удаляли и повторяли описанную процедуру.

Была подготовлена среда инкубации следующего состава: DMEM – high glucose и Ham's F12 в соотношении 1:1, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 4 мМ глутамина и 100 мкг/мл гентамицина.

Суспензию клеток культуры Hep-G2 с концентрацией $4{,}2 \times 10^6$ клеток/мл в вышеописанной среде инкубации вносили в лунки планшета по 200 мкл на лунку, после чего проводилась инкубация в термостате при 37 °C и 5% CO_2 в течение суток.

Витализация макроносителей клетками гепатокарциномы человека Hep G2

Все операции по витализации образцов макроносителей также проводились в стерильном ламинарном шкафу. Макроносители, предварительно стерилизованные в 70% этаноле не менее 1 часа, переносили в лунки 24-луночного планшета. Для предотвращения всплывания макроносителей образцы приклеивались к поверхности планшета с помощью 10% раствора желатина. Планшеты стерилизовались в ультрафиолете в течение 1 часа. Затем проводилось 3 отмывки лунок планшета фосфатно-солевым буфером по 30 минут каждая и 1 отмывка лунок планшета готовой средой инкубации в течение 30 минут. После отмывки в лунки планшета

вносилась суспензия клеток культуры Hep G2 в среде инкубации из расчета 13 500 клеток/см^2 поверхности макроносителей. Закрытый планшет инкубировали в термостате при 37 °C и 5% CO_2 в течение суток.

Подготовка образцов витализированных микро- и макроносителей для крио-СЗНТ

Образцы витализированных микро- и макроносителей были зафиксированы с помощью раствора 2,5% глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4) с инкубацией в течение 2 часов в темноте при 4 °C. Затем проводили 2 отмывки микроносителей фосфатно-солевым буфером по 15 минут каждая и ресуспендировали в 2,3 М растворе сахарозы. 50 мкл суспензии микроносителей переносили в микропробирку и инкубировали при 4 °C в течение 12 часов.

Сканирующая зондовая нанотомография

Для исследований трехмерной структуры матриксов использовался разработанный экспериментальный комплекс для СЗНТ, представляющий собой сканирующий зондовый микроскоп, интегрированный в криокамеру криоультрамикротома Leica EM UC6/FC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) [28]. Данный комплекс позволяет производить последовательные СЗМ-измерения поверхности замороженных образцов непосредственно после криосрезов в криокамере ультрамикротома. Максимальная площадь сканирования поверхности при комнатной температуре составляет 50,0 × 50,0 мкм. Последовательные срезы образца толщиной 80 нм выполнялись с использованием алмазного ножа CryoAFM 35 (Diatome AG, Швейцария) с шириной режущей кромки 2,0 мм. СЗМ-измерения проводились в полуконтактном режиме при скорости сканирования 0,75 Гц с использованием зондов-кантилеверов на базе кварцевых резонаторов A-probe (Nanosensors, Германия) с резонансной частотой в диапазоне от 44 до 48 кГц и радиусом кривизны острия < 15 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 представлена полученная при помощи СЗНТ трехмерная реконструкция участка клетки культуры Hep G2, адгезированной на стенку макропоры модифицированного микрочастицами децеллюляризованной ткани печени пористого макроносителя на основе регенерированного шелка.

Для получения данной трехмерной реконструкции были выполнены последовательные крио-СЗМ-измерения образца модифицированного пористого макроносителя, витализированного клетками гепатокарциномы человека Hep G2 после проведения сверхтонких срезов при температуре –120 °C. В результате измерений была получена серия из 11 СЗМ-изображений топографии поверхности носителя после последовательных срезов криоультрамикротомом толщиной в 100 нм. Размер каждого изображения составлял 8,0 × 8,0 мкм при разрешении 500 × 500 пикселов. Визуализация трехмерной структуры была получена с помощью программного пакета 3DConstructor Image Pro AMS 6.0 (Media-Cybernetics, Inc.).

На полученном трехмерном изображении мы можем выделить как микрочастицу децеллюляризованной ткани печени крысы (указана стрелкой на рис. 3, а), так и стенки макропоры пористого макроносителя на основе регенерированного шелка (указаны стрелками на рис. 3, б), с которыми взаимодействует клетка. Кроме того, отчетливо визуализируются внутриклеточные структуры. Более наглядно вид трехмерной реконструкции только внутриклеточной структуры представлен на рис. 4.

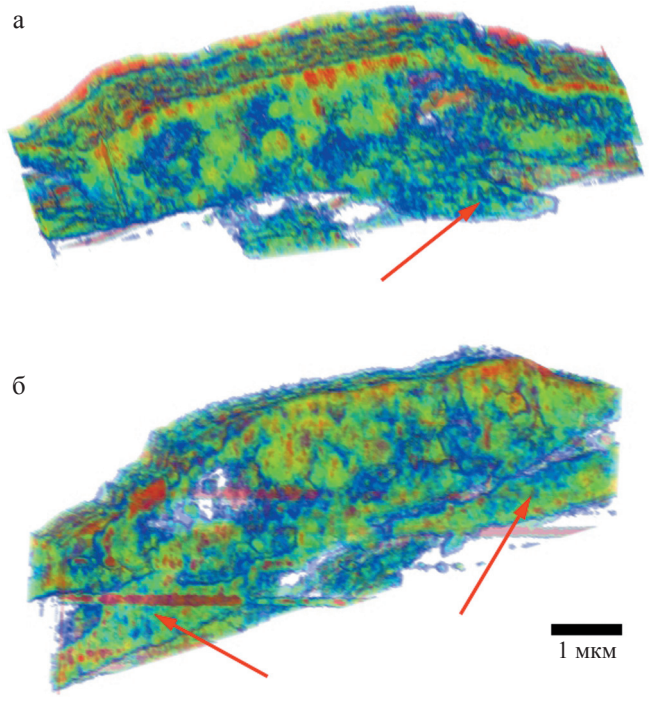

Рис. 3. Виды трехмерной реконструкции участка клетки культуры Hep G2, адгезированной на стенку макропоры пористого макроносителя на основе регенерированного шелка, поверхность которого модифицирована микрочастицами децеллюляризованного межклеточного матрикса печени. Реконструированный объем 8,0 × 4,0 × 1,4 мкм: а – стрелкой указана микрочастица децеллюляризованной ткани печени; б – стрелками указаны стенки макропоры макроносителя

Fig. 3. Views of 3D reconstruction of fragment of Hep G2 cell adhered to macropore wall of porous macrocarrier made of regenerated silk and modified with decellularized rat liver microparticles. Reconstructed volume 8.0 × 4.0 × 1.4 μm: a – arrow shows decellularized rat liver microparticle; б – arrows show macrocarrier macropore walls

Для получения данной визуализации для внешних клеточных мембран, стенок макропор и микрочастицы был задан максимальный коэффициент прозрачности (1.0). В данном случае на изображении можно выделить трехмерное распределение ряда внутриклеточных компартментов размерами от 140 до 500 нм. Таким образом, можно сделать вывод о том, что метод СЗНТ позволяет выполнять трехмерный анализ внутриклеточных структур с разрешением в десятки нанометров. Анализ полученных данных с использованием программного пакета 3D Constructor Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics, Inc.) позволяет определить морфологические параметры как реконструированной поверхности стенки макропоры, так и реконструированных внешних поверхностей микрочастицы межклеточного матрикса и клетки (табл. 1).

Аналогичным образом было проведено СЗНТ-исследование клеток гепатокарциномы человека Hep G2, адгезированных на альгинатные микроносители. Последовательные крио-СЗМ-измерения образца альгинатного микроносителя, витализированного клетками гепатокарциномы человека Hep G2, после сверхтонких срезов позволили реконструировать и визуализировать трехмерную структуру участка клетки на микроносителе. Для выполнения трехмерной реконструкции была получена серия из 12 СЗМ-изображений топографии поверхности носителя после осуществления последовательных срезов криоультрамикротомом толщиной в 100 нм при температуре –120 °С. Размер каждого изображения составлял 8,0 × 8,0 мкм при разрешении 500 × 500 пикселов соответственно.

На рис. 5 представлена визуализация трехмерной реконструкции участка клетки культуры Hep G2 на поверхности альгинатного микроносителя в объеме 8,0 × 8,0 × 1,2 мкм, полученная с использованием программного пакета 3D Constructor Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics, Inc.). Так же, как и в случае поверхности витализированного макроносителя, была выполнена оценка параметров поверхностей клетки и микроносителя, полученных при помощи

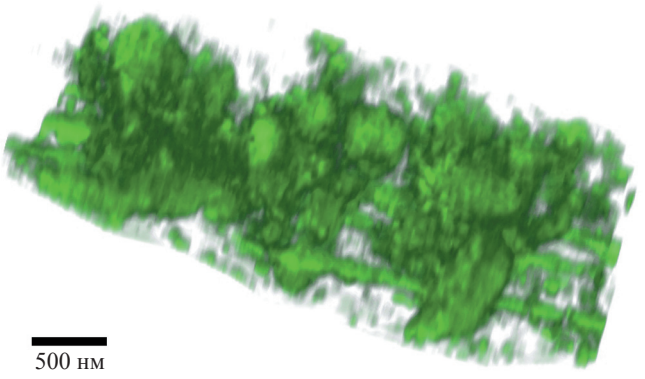

Рис. 4. Вид трехмерной реконструкции внутриклеточных структур клетки культуры Hep G2. Реконструированный объем 3,6 × 1,5 × 1,4 мкм

Fig. 4. View of 3D reconstruction of intracellular structures of Hep G2 cell. Reconstructed volume 3.6 × 1.5 × 1.4 μm

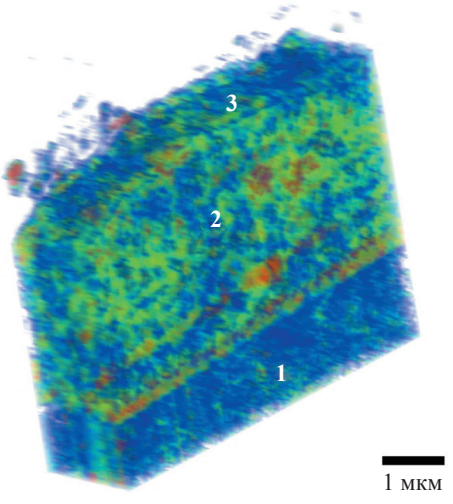

Рис. 5. Трехмерная реконструкция участка клетки культуры Hep G2 на поверхности альгинатного микроносителя, реконструированный объем 8,0 × 8,0 × 1,2 мкм: 1 – альгинатный микроноситель; 2 – участок клетки; 3 – поверхность клетки

Fig. 5. 3D reconstruction of fragment of Hep G2 cell on the surface of alginate microcarrier. Reconstructed volume 8.0 × 8.0 × 1.2 μm: 1 – alginate microcarrier; 2 – cell fragment; 3 – cell surface

Таблица 1

Шероховатость, удельная эффективная площадь σ и длина автокорреляции L_1 поверхности макроносителя на основе регенерированного шелка, поверхности микрочастицы межклеточного матрикса печени крысы и поверхности клетки культуры Hep G2, адгезированной на стенку макропоры макроносителя

Roughness, effective surface area σ and autocorrelation length L_1 of surfaces of macrocarrier made of regenerated silk, decellularized rat liver microparticle and Hep G2 cell adhered to macropore wall of the macrocarrier

Параметр	Поверхность макроносителя	Поверхность микрочастицы	Поверхность клетки культуры Hep G2
Шероховатость Ra, нм	133,8 ± 16,2	192,7 ± 23,1	158,8 ± 21,6
Удельная эффективная площадь σ	1,15 ± 0,01	1,180 ± 0,025	1,170 ± 0,02
Длина автокорреляции L_1, нм	165 ± 39	251,4 ± 31	313 ± 37

Таблица 2

Шероховатость, удельная эффективная площадь σ и длина автокорреляции L_1 поверхности альгинатного микроносителя и поверхности клетки культуры Hep G2, адгезированной на поверхность микроносителя

Roughness, effective surface area σ and autocorrelation length L_1 of surfaces of alginate microcarrier and Hep G2 cell adhered to the microcarrier surface

Параметр	Поверхность макроносителя	Поверхность клетки культуры Hep G2
Шероховатость Ra, нм	76,4 ± 7,5	118,5 ± 9,0
Удельная эффективная площадь σ	1,105 ± 0,01	1,168 ± 0,02
Длина автокорреляции L_1, нм	124 ± 22	284 ± 44

трехмерной реконструкции. Полученные значения параметров шероховатости, удельной эффективной площади σ и длины автокорреляции L1 представлены в табл. 2.

Очевидно, что шероховатость, удельная эффективная площадь и длина автокорреляции поверхности альгинатного микроносителя значительно меньше, чем соответствующие параметры поверхности стенки макропоры макроносителя на основе регенерированного шелка. Кроме того, в данном случае и величина шероховатости поверхности клетки также заметно меньше значений, полученных на образце витализированного пористого макроносителя на основе регенерированного шелка, что может быть связано с особенностями адгезии клеток на макро- и микроносители.

Ранее оценка адгезии клеток культуры Hep G2 на модифицированные и немодифицированные альгинатные микроносители показала, что на модифицированные микроносители адгезируется в среднем примерно в 7 раз больше клеток, чем на немодифицированные [29]. Наблюдаемое существенное увеличение адгезии клеток может быть вызываться двумя причинами. Во-первых, оно может быть связано с изменением параметров морфологии поверхности за счет повышенной шероховатости микрочастиц межклеточного матрикса [30–33]. Во-вторых, наблюдаемое увеличение адгезии клеток может объясняться также и тканеспецифичными свойствами данных микрочастиц, что было показано в ряде работ [35, 36].

Необходимо отметить, что в данном случае каждое крио-СЗМ-изображение клетки содержит большое количество ультраструктурных деталей, соответствующих органеллам, компартментам и белковым глобулам внутри клетки, что усложняет интерпретацию трехмерной реконструкции внутриклеточных структур, выполняемой за счет совмещения двумерных СЗМ-изображений. Однако идентификация и выделение отдельных органелл, например митохондрий, на каждом двумерном изображении позволяет проанализировать их трехмерную структуру в отдельной реконструкции. Пример визуализации подобной трехмерной реконструкции нескольких митохондрий в объеме клетки представлен на рис. 6. Таким образом, можно сделать вывод, что метод крио-СЗНТ позволяет реконструировать связные клеточные органеллы различной формы и протяженности. Это дает возможность использования СЗНТ для решения ряда задач структурной биологии, например, актуальной проблемы исследования трехмерной организации и взаимосвязан-

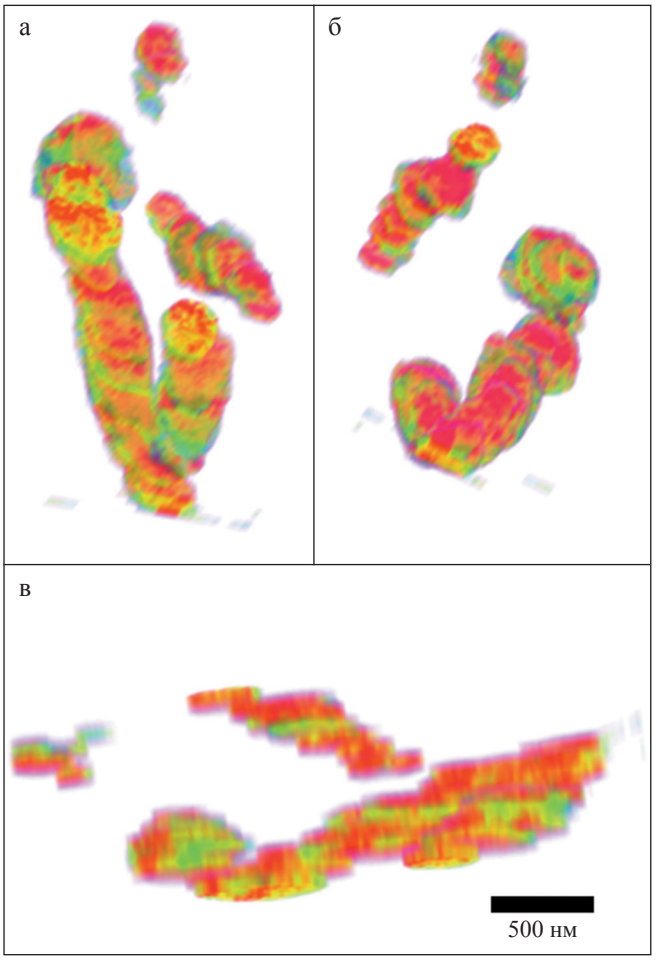

Рис. 6. Виды трехмерной реконструкции отдельных органелл внутри клетки культуры Hep G2, адгезированной на поверхности альгинатного микроносителя

Fig. 6. Views of 3D reconstructions of individual organelles inside Hep G2 cell adhered to the surface of alginate microcarrier

ности комплексов митохондрий и других органелл в различных эукариотических клетках [37, 38] с разрешением в десятки нанометров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлено исследование методом крио-СЗНТ трехмерных структур клеточно-инженерных конструкций – альгинатных микроносителей и пористых макроносителей на основе регенерированного шелка, витализированных клетками гепатокарциномы человека Hep G2. В результате экспериментальных исследований клеточных микро- и макроносителей получена уникальная наномасштабная информация о трехмерной структуре и количественных морфологических параметрах клеточных макро- и микроносителей, а также клеток культуры Hep G2, недоступная другим методам микроскопических исследований. Полученные результаты демонстрируют, что разработанный метод сканирующей зондовой нанотомографии может быть использован для эффективного изучения микро- и наноструктуры биоискусственных клеточных конструкций.

Использование метода сканирующей зондовой нанотомографии для трехмерного анализа характеристик биоматериалов, клеток и биоискусственных клеточных конструкций позволит повысить эффективность разработок по созданию новых клеточно-инженерных конструкций с заданными физико-химическими и биологическими характеристиками для задач тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-75-10098).

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. *Ho ST, Hutmacher DW.* A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*. 2006; 27 (8): 1362–1376. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.035.
4. *Bradley RS, Robinson IK, Yusuf M.* 3D X-Ray Nanotomography of Cells Grown on Electrospun Scaffolds. *Macromol. Biosci*. 2017; 17: 1600236. DOI: 10.1002/mabi.201600236.
5. *Langer M, Peyrin F.* 3D X-ray ultra-microscopy of bone tissue. *Osteoporosis Int*. 2016; 27: 441–455. DOI: 10.1007/s00198-015-3257-0.
6. *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.
7. *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.
8. *Caplan J, Niethammer M, Taylor II RM, Czymmek KJ.* The Power of Correlative Microscopy: Multi-Modal, MultiScale, Multi-Dimensional. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2011; 21: 686–693. DOI: 10.1016/j.sbi.2011.06.010.
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. *Alekseev A, Loos J, Koetse MM.* Nanoscale electrical characterization of semiconducting polymer blends by conductive atomic force microscopy (C-AFM). *Ultramicroscopy*. 2006; 106 (3): 191–199. DOI: 10.1016/j.ultramic.2005.07.003.
13. *Zhang L, Sakai T, Sakuma N, Ono T, Nakayama K.* Nanostructural conductivity and surface-potential study of low-field-emission carbon films with conductive scanning probe microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 1999; 75: 3527–3529. DOI: 10.1063/1.125377.
14. *Hartmann U.* Magnetic force microscopy: Some remarks from the micromagnetic point of view. *J. Appl. Phys.* 1988; 64 (3): 1561–1564. DOI: 10.1063/1.341836
15. *Noy A, Vezenov DV, Lieber CM.* Chemical Force Microscopy. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1997; 27: 381–421. DOI: 10.1146/annurev.matsci.27.1.381.
16. *Zlatanova J, Lindsay SM, Leuba SH.* Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2000; 74 (1–2): 37–61. DOI: 10.1016/S0079-6107(00)00014-6.
17. *Efimov AE, Tonevitsky AG, Dittrich M, Matsko NB.* Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples. *Journal of Microscopy*. 2007; 226 (3): 207–217. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2007.01773.x.
18. *Efimov AE, Gnaegi H, Schaller R, Grogger W, Hofer F, and Matsko NB.* Analysis of native structure of soft materials by cryo scanning probe tomography. *Soft. Matter*. 2012; 8: 9756–9760. doi:10.1039/c2sm26050f.
19. *Hunt A, Ewing R.* Percolation Theory for Flow in Porous Media, Lect. Notes Phys. Springer: Berlin Heidelberg, 2009: 771.
20. *Efimov AE, Moisenovich MM, Bogush VG, Agapov II.* 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography. *RSC Adv.* 2014; 4: 60943–60947. DOI: 10.1039/c4ra08341e.

21. *Efimov AE, Agapova OI, Parfenov VA, Pereira FDAS, Bulanova EA, Mironov VA, Agapov II.* Investigating the Micro- and Nanostructure of Microfibrous Biocompatible Polyurethane Scaffold by Scanning Probe Nanotomography. *Nanotechnol. Russ.* 2015; 10 (11–12): 925–929. DOI: 10.1134/S1995078015060038.
22. *Thiele S, Vierrath S, Klingele M, Zengerle R.* Tomographic Analysis of Polymer Electrolyte Fuel Cell Catalyst Layers: Methods, Validity and Challenges. *ECS Trans*. 2015; 69 (17): 409–418. DOI 10.1149/06917.0409ecst.
23. *Alekseev A, Efimov A, Lu K, Loos J.* Three-dimensional electrical property reconstruction of conductive nanocomposites with nanometer resolution. *Advanced Materials*. 2009; 21 (48): 4915–4919. DOI: 10.1002/adma.200901754.
24. *Alekseev A, Chen D, Tkalya EE, Ghislandi MG, Syurik Y, Ageev O et al.* Local Organization of Graphene Network Inside Graphene/Polymer Composites. *Adv. Funct. Mater.* 2012; 22 (6): 1311–1318. DOI: 10.1002/adfm.201101796.
25. *Mochalov KE, Efimov AE, Bobrovsky A, Agapov II, Chistyakov AA, Oleinikov VA et al.* Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials. *ACS Nano*. 2013; 7 (10): 8953–8962. doi: 10.1021/nn403448p.
26. *Brazhnik K, Sokolova Z, Baryshnikova M, Bilan R, Efimov A, Nabiev I, Sukhanova A.* Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multiplexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2015; 11: 1065–1075. DOI: 10.1016/j.nano.2015.03.003.
27. *Bilan RS, Krivenkov VA, Berestovoy MA, Efimov AE, Agapov II, Samokhvalov PS et al.* Engineering of Optically Encoded Microbeads with FRET-Free Spatially Separated Quantum-Dot Layers for Multiplexed Assays. *ChemPhysChem*. 2017; 18 (8): 970–979. DOI: 10.1002/cphc.201601274.
28. *Efimov AE, Agapova OI, Agapov II.* Scanning Probe Nanotomograph: Features of Engineering Solutions for Low-Temperature Analysis of Biomedical Materials. *Biomed. Eng*. 2015; 49: 132–135. DOI: 10.1007/s10527-015-9514-x.
29. *Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA., Bobrova MM, Volkov AD, Khamkhash L, Agapov II.* Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers. *RSC Adv.* 2017; 7: 8808–8815. DOI: 10.1039/c6ra26516b.
30. *Сургученко ВА, Пономарева АС, Ефимов АЕ, Немец ЕА, Агапов ИИ, Севастьянов ВИ.* Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на пленках из бактериального сополимера поли (3-гидроксибутират-CO-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012; 14 (1): 72–77. DOI:10.15825/1995-1191-2012-1-72-77. *Surguchenko VA, Ponomareva AS, Efimov AE, Nemec EA, Agapov II, Sevast'yanov VI.* Osobennosti adgezii i proliferacii fibroblastov myshi linii NIH/ZTZ na plenkah iz bakterial'nogo sopolimera poli (3-gidroksibutirat-CO-3-gidroksivalerata) s razlichnoj sherohovatost'yu poverhnosti. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov.* 2012; 14 (1): 72–77. DOI:10.15825/1995-1191-2012-1-72-77.
31. *Vasilets VN, Surguchenko VA, Ponomareva AS, Nemetz EA, Sevastianov VI, Jin Woo Bae JW, Park KD.* Effects of surface properties of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) on adhesion and proliferation of mouse fibroblasts. *Macromol. Res.* 2015; 23: 205–213. DOI: 10.1007/s13233-015-3025-1
32. *Nikkhah M, Edalat F, Manoucheri S, Khademhosseini A.* Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface. *Biomaterials.* 2012; 33: 5230–5246. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.079.
33. *Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R.* Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology.* 2011; 6: 13–22. DOI: 10.1038/nnano.2010.246.
34. *Агапова ОИ, Ефимов АЕ, Мойсенович ММ, Богуш ВГ, Агапов ИИ.* Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биодеградируемых матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка для регенеративной медицины. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2015; 17 (2): 37–44. DOI:10.15825/1995-1191-2015-2-37-44. *Agapova OI, Efimov AE, Mojsenovich MM, Bogush VG, Agapov II.* Sravnitel'nyj analiz trekhmernoj nanostruktury poristyh biodegradiruemyh matriksov iz rekombinantnogo spidroina i fibroina shelka dlya regenerativnoj mediciny. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov.* 2015; 17 (2): 37–44. DOI:10.15825/1995-1191-2015-2-37-44.
35. *Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med.* 2010; 16 (7): 814–820. DOI: 10.1038/nm.2170.
36. *Онищенко НА, Крашенинников МЕ, Шагидулин МЮ, Боброва ММ, Севастьянов ВИ, Готье СВ.* Гепатоспецифический мелкодисперсный матрикс как важный компонент имплантируемых клеточно-инженерных конструкций вспомогательной печени. *Гены и клетки*. 2016; 11 (1): 54–60. *Onishchenko NA, Krasheninnikov ME, Shagidulin MYu, Bobrova MM, Sevast'yanov VI, Got'e SV.* Gepatospecificheskij melkodispersnyj matriks kak vazhnyj komponent implantiruemyh kletochno-inzhenernyh konstrukcij vspomogatel'noj pecheni. *Geny i kletki.* 2016; 11 (1): 54–60.
37. *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.
38. *Sulkin MS, Yang F, Holzem KM, Van Leer B, Bugge C, Laughner JI 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.

Статья поступила в редакцию 3.11.2017 г.
The article was submitted to the journal on 3.11.2017