

АНАЛИЗ ТРЕХМЕРНЫХ НАНОСТРУКТУР БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ И ОБЪЕКТОВ МЕТОДАМИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ И ОПТИЧЕСКО-ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

© 2025 г. А. Е. Ефимов^а, *, О. И. Агапова^а, И. И. Агапов^а

^аНациональный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова МЗ РФ, Москва, 123182 Россия

*E-mail: antefimov@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

Данная работа посвящена современным методам исследования трехмерной наноструктуры биоматериалов и биологических объектов на основе сканирующей зондовой нанотомографии – объединения зондовой микроскопии и ультрамикротомии, и флуоресцентной микроскопии. В работе представлены результаты экспериментов по изучению трехмерной наноструктуры композитных скаффолов на основе фибронаина шелка *Bombyx Mori* и микрочастиц внеклеточного матрикса, полученных из децеллюляризованной ткани печени. Подобные скаффолды обладают значительным потенциалом для использования в задачах регенеративной медицины. Показано, что методы зондовой нанотомографии позволяют эффективно анализировать трехмерную наноструктуру микровключений и их морфологические параметры, влияющие на биологическую активность изделий.

Ключевые слова: сканирующая зондовая нанотомография, биоматериалы, наноструктура, регенеративная медицина

DOI: 10.56304/S2079562925010051

ВВЕДЕНИЕ

Развитие современных направлений биоинженерии, регенеративной медицины и структурной биологии требует разработки новых технологий и методик позволяющих с высоким разрешением анализировать трехмерные структуры биоматериалов и биоинженерных конструкций, а также структурные особенности клеток и тканей на микро- и наноуровне.

Эффективное решение данных задач невозможно без разработки новых технологий и методик анализа структурных изменений в тканях и клетках на микро- и наноуровне. Такие методы как электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, оптическая микроспектроскопия высокого разрешения и другие позволяют исследовать структуру биоматериалов и клеточных компонентов и распределение биомаркеров с разрешением до десятков нанометров [1–3]. Каждый из подобных методов обладает значительным потенциалом, однако наиболее перспективным направлением является комбинирование различных техник микроскопии для коррелятивных исследований [4, 5]. Взаимодополняющая информация, полученная разными методами, приводит к появлению

новых знаний о структуре и функциональных свойствах биологических объектов и систем.

Разрабатываемые в настоящее время современные технологии анализа трехмерной наноструктуры клеток и тканей, в частности технологии сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) [6, 7] и сканирующей зондово-оптической нанотомографии (СЗОНТ) [8–10], позволяют получить уникальную информацию об особенностях трехмерной наноморфологии биологических материалов, клеток и тканей.

Для трехмерного анализа с использованием сканирующей зондовой микроскопии используются последовательные сверхтонкие срезы поверхности материала с использованием ультрамикротома. Трехмерная реконструкция при этом строится за счет интеграции послойных СЗМ изображений [11, 12]. Разрешение метода по глубине определяется минимальной толщиной среза ультрамикротома и достигает 12 нм [13]. Использование методики позволяет изучать не только наноморфологию, но и распределения наночастиц в объеме [14], а также трехмерные параметры нанопористых материалов [15].

В частности, метод СЗНТ может эффективно применяться для трехмерной реконструкции мик-

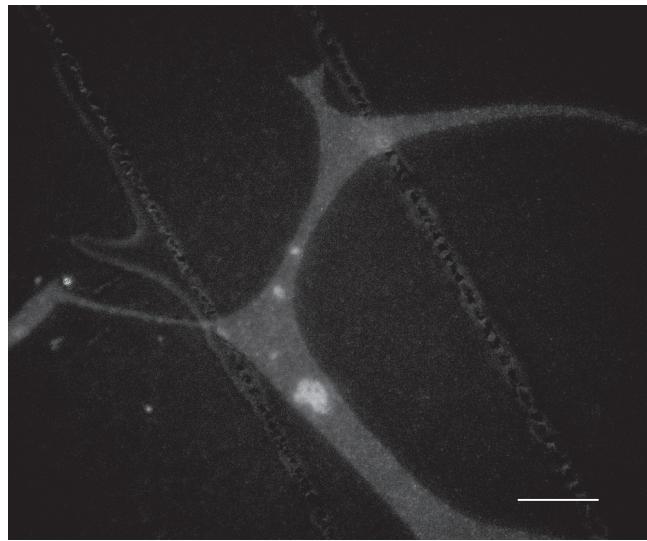


Рис. 1. Флуоресцентное оптическое изображение среза биодеградируемого композитного скаффолда на основе фиброна шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека, размерный отрезок 10 мкм.

ро- и наноструктурированных биосовместимых скаффолов на основе биополимеров [16, 17] и определения параметров их объемной морфологии. Реконструкция трехмерных структур клеточно-инженерных конструкций позволяет исследовать как топологию, так и численные параметры морфологии адгезированных клеток и интерфейсов между скаффолдами и клетками, такие как приростность, отношение площади поверхности к объему, трехмерную шероховатость и удельную площадь поверхности. Данные параметры могут служить определяющими индикаторами состояния и биологической активности клеток [18, 19].

В данной работе представлено исследование трехмерной структуры композитных скаффолов на основе фиброна шелка и микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека. Подобные биоискусственные конструкции обладают значительным регенеративным потенциалом, так, например они могут значительно (более чем на 40%) повышать скорость заживления полнослоистых ран кожи у крыс [20]. Анализ трехмерных структур подобных композиций важен для понимания особенностей их взаимодействия с клетками и тканями организма и повышения их биологической эффективности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Экспериментальная установка, использованная для исследований трехмерной наноструктуры скаффолов представляет собой специализированный сканирующий зондовый микроскоп, совмещенный с ультрамикротомом [11]. Данная кон-

струкция позволяет выполнять СЗМ-измерения поверхности образца непосредственно после среза алмазным ножом ультрамикротома, без дополнительных перемещений или переносов образца. После выполнения измерений сканирующая головка с зондом-кантилевером СЗМ отводится от поверхности и выполняется следующий сверхтонкий срез поверхности. Последовательное повторение операций среза и измерения позволяет получить серию СЗМ-изображений, используемую для трехмерной реконструкции с применением специализированного программного обеспечения (в данном случае был использован программный пакет Image Pro 6.0 (MediaCybernetics Inc., США). Флуоресцентные оптические изображения срезов, перенесенных на покровное стекло, были получены с использованием микроскопа Zeiss Axio.Vert (Carl Zeiss, ФРГ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скаффолды на основе фиброна шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека были получены и подготовлены к исследованию методом СЗНТ с использованием методик, подробно описанных в [20]. Исследование выполнено в соответствии с принципами, установленными Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и одобрено Этическим комитетом ФГБУ “НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова” Минздрава России (Заключение № 221222/1-1д от 22 декабря 2022 г.).

Далее был выполнен анализ объемной микро- и наноструктуры полученных композитных скаффолов, с применением технологий сканирующей зондовой и зондово-оптической нанотомографии. Микрочастицы децеллюляризованной ткани печени были обнаружены как в толще, так и на поверхности пленок. На рис. 1 приведено изображение сверхтонкого среза (толщина 150 нм) композитного скаффолда с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека, полученное методом флуоресцентной оптической микроскопии. На данном изображении идентифицируются микрочастицы внеклеточного матрикса, характеризующиеся более яркой флуоресценцией за счет окраски красителем FITC.

На рис. 2 приведено единичное СЗМ-изображение поверхности образца скаффолда после среза ультрамикротомом. Метод СЗМ позволяет идентифицировать микрочастицы децеллюляризованной ткани на поверхности скаффолда и проанализировать их наноструктуру. Для количественного анализа наноструктурных особенностей пленки с микрочастицами были выполнены трехмерные СЗНТ-реконструкции. Пример трехмерной реконструкции микрочастиц внеклеточного матрикса печени на поверхности скаффолда приведен

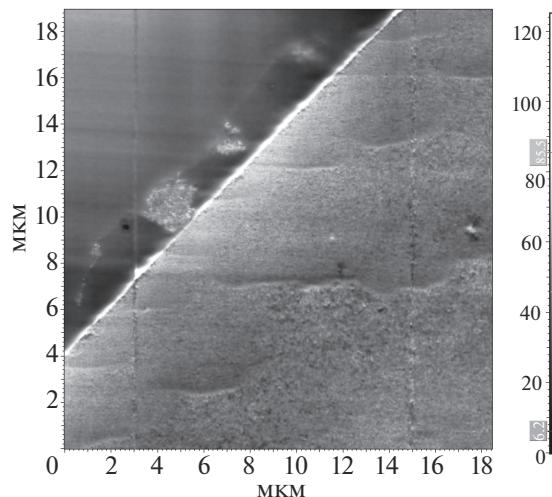


Рис. 2. СЭМ изображение поверхности поперечного среза скаффолда на основе фиброна шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени человека (область сканирования 18 × 19 мкм).

на рис. 3. В данном случае для реконструкции было использовано 17 послойных СЭМ-изображений, полученных после последовательных срезов толщиной 150 нм, реконструированный объем составил $16.00 \times 13.30 \times 2.55$ мкм.

Количественный анализ полученных трехмерных СЭМ-данных показал, что при добавлении микрочастиц внеклеточного матрикса печени шероховатость поверхности скаффолдов возрастает

до 5-кратного уровня. Так, средняя ($n = 6$) трехмерная шероховатость поверхности скаффолдов с микрочастицами составила 225.0 ± 45.0 нм, в то время как для скаффолдов без микрочастиц эта величина составила 36.5 ± 10.6 нм [16, 20]. Полученные трехмерные данные позволили также напрямую рассчитать отношение объема микрочастиц децеллюляризованной ткани печени человека к

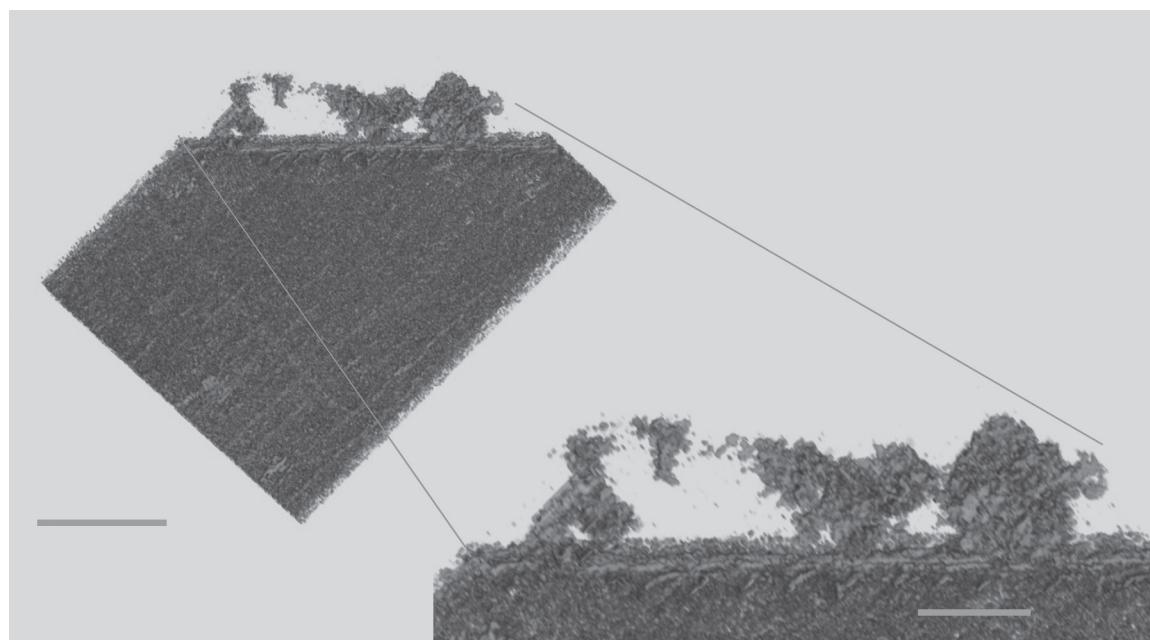


Рис. 3. Трехмерная реконструкция структуры скаффолда в виде пленки на основе фиброна шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани (размерный отрезок – 5 мкм, размерный отрезок на вставке – 2 мкм).

объему фиброновой пленки, которое в данном случае составило $1.2\% \pm 0.4$.

Адгезия, пролиферация и дифференцировка клеток во многом определяется шероховатостью подложки [21, 22]. Микрочастицы, находящиеся на поверхности, могут взаимодействовать с адгезирующими на пленку клетками еще до начала процесса биодеградации, что указывает на эффективность метода получения композитных скаффолдов. Использование технологии СЗНТ позволило проанализировать трехмерную структуру микрочастиц и особенности их контактов с поверхностью скаффолда, что было бы невозможно получить, применяя стандартные технологии зондовой, оптической или электронной микроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты подтверждают эффективность использования техники сканирующей зондовой нанотомографии для исследования параметров трехмерной наноморфологии композитных биоматериалов, предназначенных для регенеративной медицины. Полученные данные позволяют прогнозировать высокую биологическую активность разрабатываемых композитных материалов на основе на основе фиброна шелка *Bombyx Mori* и микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-20113). Авторы благодарят М.М. Боброву и Л.А. Сафонову за помощь в получении и подготовке образцов скаффолдов для исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Zhao J., Yu X., Shentu X., et al. // Cell Tissue Res. 2024. V. 396. P. 1–18.

2. Evans J.E., Friedrich H. // MRS Bull. 2016. V. 41. P. 516–521.
3. Li X., Han Y., Liu W., et al. // Front. Phys. 2020. V. 8. P. 606217.
4. Hoffman D.P., Shtengel G., Xu C.S., et al. // Science. 2020. V. 367 (6475). P. 5357.
5. Lane R., Wolters A.H.G., Giepmans B.N.G., Hoogenboom J.P. // Front. Mol. Biosci. 2022. V. 8. P. 822232.
6. Alekseev A., Efimov A., Loos J., Matsko N., Syurik J. // Eur. Polym. J. 2014. V. 52. P. 154–165.
7. Zankel A., Wagner J., Poelt P. // Micron. 2014. V. 62. P. 66–78.
8. Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., et al. // Ultramicroscopy. 2017. V. 182. P. 118–123.
9. Agapova O.I., Efimov A.E., Mochalov K.E., et al. // Dokl. Biol. Sci. 2023. V. 509. P. 103–106.
10. Agapova O.I., Efimov A.E., Safonova L.A., et al. // Dokl. Biochem. Biophys. 2021. V. 500. P. 331–334.
11. Efimov A.E., Tonevitsky A.G., Dittrich M., Matsko N.B. // J. Microsc. 2007. V. 226. P. 207–217.
12. Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., et al. // Rev. Sci. Instrum. 2017. V. 88 (2). P. 023701.
13. Alekseev A., Efimov A., Lu K., Loos J. // Adv. Mater. 2009. V. 21 (48). P. 4915–4919.
14. Mochalov K.E., Efimov A.E., Bobrovsky A., et al. // ACS Nano. 2013. V. 7 (10). P. 8953–8962.
15. Efimov A.E., Moisenovich M.M., Bogush V.G., Agapov I.I. // RSC Adv. 2014. V. 4. P. 60943–60947.
16. Safonova L., Bobrova M., Efimov A., et al. // Pharmaceuticals. 2021. V. 13. P. 1561.
17. Safonova L., Bobrova M., Efimov A., et al. // Pharmaceuticals. 2021. V. 13. P. 1704.
18. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., et al. // Express Polym. Lett. 2019. V. 13. P. 632–641.
19. Balashov V., Efimov A., Agapova O., et al. // Acta Biomater. 2018. V. 68. P. 214–222.
20. Bobrova M., Safonova L., Efimov A., et al. // Pharmaceuticals. 2022. V. 14. P. 2313.
21. Ribeiro V.P., Almeida L.R., Martins A.R., et al. // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2017. V. 11 (10). P. 2853–2863.
22. Nikkhah M., Edalat F., Manoucheri S., Khademhosseini A. // Biomaterials. 2012. V. 33. P. 5230–5346.

Analysis of Three-Dimensional Nanostructures of Biological Materials and Objects Using Scanning Probe and Optical Probe Nanotomography

A. E. Efimov¹, *, O. I. Agapova¹, and I. I. Agapov¹

¹Academician Shumakov National Medical Research Centre of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: antefimov@gmail.com

Received June 17, 2024; revised June 17, 2024; accepted June 18, 2024

Abstract—This work is devoted to modern methods for studying the three-dimensional nanostructure of biomaterials and biological objects based on scanning probe nanotomography—a combination of probe microscopy and ultamicrotomy, and fluorescence microscopy. The paper presents the results of experiments on studying the three-dimensional nanostructure of composite scaffolds based on *Bombyx Mori* silk fibroin and extracellular matrix microparticles obtained from decellularized liver tissue. Such scaffolds have significant potential for use in regenerative medicine. It has been shown that probe nanotomography methods make it

possible to effectively analyze the three-dimensional nanostructure of microinclusions and their morphological parameters that affect the biological activity of scaffolds.

Keywords: scanning probe nanotomography, biomaterials, nanostructure, regenerative medicine