ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ МАРКИРОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НЕОДИМОМ И СВИНЦОМ ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

УДК 579.246, 53.086

И.А.Новиков, А.М.Суббот, О.А.Пак, ФГБНУ "НИИ глазных болезней", Москва
i.novikov@niigb.ru

И.В.Чеботарь, Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей,
Москва

Визуализация биологических объектов с ультраструктурным разрешением возможна как оптическими методами, так и посредством электронного микроскопа. Современные оптические методы высоко специфичны, однако сложны в исполнении, либо не обладают достаточным разрешением. Лидирует по разрешающей способности чрезвычайно трудоемкая просвечивающая электронная микроскопия, которая позволяет визуализировать преимущественно лишь белковые структуры и липофильные элементы. Представлена быстрая двухступенчатая методика подготовки образцов для визуализации внутреннего строения биологических объектов с ультраструктурным разрешением методом сканирующей электронной микроскопии. Последовательная съемка объектов после суправитального насыщения неодимом и пассивного связывания со свинцом позволяет повысить специфичность метода. В качестве примера рассмотрена возможность дифференцированной визуализации в биологических объектах: Са-зависимых систем, структурных позиций фосфат-анионов, а также структур, содержащих углеводы и ближайшие продукты их метаболизма.

ВВЕДЕНИЕ

В качестве аналитического метода в биологии и медицине сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) применяется с 60-х годов прошлого столетия. С 1975 по 2000 год наблюдался постоянный рост числа статей медико-биологического направления, проиллюстрированных изображениями, полученными с применением СЭМ. Появление оптических методов, пусть и уступающих СЭМ по разрешающей способности, но дающих возможность заглянуть во внутреннюю структуру изучаемого объекта с избирательной визуализацией в ней образований различной природы, привело к снижению популярности метода. Отчасти такая ситуация связана с отсроченным эффектом наблюдающегося с 1990 года уменьшения количества предлагаемых к внедрению новых технологий для изучения биологических объектов методами электронной микроскопии. Актуальность проблемы падения популярности СЭМ в самых значимых медико-биологических направлениях, например в фундаментальной онкологии проиллюстрирована на рис.1.

В новейшей истории развития электронной микроскопии предпринимались попытки предложить методы маркирования отдельных структур с привлечением иммунных механизмов, например посредством конъюгирования коллоидного золота с иммуноглобулинами. Анализ современных публикаций показывает, что подобные технологии весьма ограничены для применения на практике. Основные причины: сложность исполнения, низкая воспроизводимость, проблема проницаемости биологических систем по отношению к частицам, дороговизна препаратов [1, 2].

Очевидно, что новый метод подготовки биологического образца к СЭМ, позволяющий просто, быстро и экономично визуализировать отдельные элементы ультраструктуры с присущим электронному микроскопу разрешением, будет востребован исследователями.

Цель работы – создание метода подготовки биологических объектов к наблюдению посредством сканирующей электронной микроскопии для дифференцированной 3D-визуализации Са-зависимых систем, структурных пози-

ций фосфат-анионов, а также структур, содержащих углеводы и ближайшие продукты их метаболизма.

ТЕХНИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Сканирующая электронная микроскопия в обратно-рассеянных электронах

Ранее сканирующий электронный микроскоп рассматривался применительно к биологическому объекту наблюдения только для получения информации исключительно о микротопографии поверхности объекта. Для решения этой задачи на "биологических" комплексах электронных микроскопов традиционно используются датчики вторичных электронов различных конструкций. Вместе с датчиками такого типа большинство выпускаемых серийно микроскопов дополнительно оборудовано детекторами обратно-рассеянных электронов, позволяющими реконструировать материальный контраст образца в некотором объеме под его поверхностью. Под материальным контрастом следует понимать произведение среднего атомного веса вещества на его плотность в том объеме, где оно взаимодействует с электронами пучка. При этом эффективный объем взаимодействия и глубина проникновения электронного пучка под поверхность изучаемого объекта связаны не только с этими двумя параметрами – плотностью и атомным весом, но также определяется и кинетической энергией электронов. Чаще всего метод получения изображений "материального контраста" используется в материаловедении, металлур-

гии и минералогии. При решении биологических задач его роль становится значимой лишь при наблюдении "тяжелых" объектов: магнитных частиц, костной ткани, петрификатов и т. п.

По сравнению с полученными на основе принципа оценки плотности вторичных электронов изображениями детектирование обратно-рассеянных электронов дает меньшее пространственное разрешение. Однако, в отличие от датчиков вторичных электронов, разрешение классических датчиков обратно-рассеянных электронов возрастает с увеличением ускоряющего напряжения. Также с повышением ускоряющего напряжения возрастает глубина эффективного взаимодействия пучка и объема исследуемого образца (рис.2). Таким образом, учитывая низкий средний атомный номер биологических объектов, уже при ускоряющем напряжении 20–25 кВ, любая химически интактная животная, бактериальная или растительная клетка может быть эффективно зондирована электронным пучком на всю толщину с разрешением в несколько десятков нанометров.

Полученные при высоких ускоряющих напряжениях изображения легких биологических образцов в обратно-рассеянных электронах на СЭМ подобны изображениям полупрозрачных объектов в световой микроскопии.

Избирательное насыщение структуры элементами с высокими атомными номерами

Изначально большинство биологических объектов не обладают достаточной химической контрастностью для образо-

Рис.1. Статистика популярности СЭМ в фундаментальной онкологии: синяя линия – удельное число СЭМ-изображений в год в статьях с ключевым словосочетанием cancer cell (данные "Академии Гугл" на 05.2018). Оранжевая линия – динамика публикаций медико-биологического направления с новыми методиками СЭМ (данные "Академии Гугл" на 03.2018)

Рис.2. Зависимость контрастности и разрешения СЭМ-изображения в обратно-рассеянных электронах частиц кремния, импрегнирующих агар, от глубины их расположения в объеме образца. Однократное измерение при двух ускоряющих напряжениях: 10 кВ (пунктир) и 20 кВ (сплошная линия) в режиме низкого вакуума, ток 120 пА

вания информативных изображений в плотности обратного рассеяния электронов на элементах своей структуры.

В качестве первого этапа химического преобразования образца выбран суправитальный метод лантаноидного контрастирования [3]. В его основе лежит способность живой клетки метаболизировать осмотически сбалансированный раствор, содержащий хлорид одного или нескольких элементов группы лантана. Как известно, лантаноиды в биологических и минеральных системах являются идеальными заместителями кальция [4]. Дополнительно к этому, они способны связывать свободные остатки минеральных кислот, образуя с ними простые соли. В большинстве случаев связывание происходит с фосфат-анионом, в избытке образующимся на разных участках клеточного обмена. Возникающий при этом LnPO_4 весьма устойчив во внутриклеточных и внеклеточных композициях и надежно способен маркировать предшествующую его возникновению структурную позицию фосфатного остатка (Р_i).

Схема с замещением кальция лантаноидами реализуется в биологических системах в двух преимущественных механизмах: гетеровалентном изоморфизме типа $\text{Ln}^{3+} + \text{Me}^+ \rightarrow 2\text{Ca}^{2+}$ или $2\text{Ln}^{3+} \rightarrow 3\text{Ca}^{2+}$.

Первый тип, с участием щелочного металла и бинарной позицией замещаемого кальция, характерен для активных метаболических цепочек клеток и не может наблюдаться на пассивном объекте (подвергнутом обработке фиксатором, например).

Второй этап предлагаемой химической подготовки образцов к СЭМ необходим для дополнительного увеличения контрастности за счет последовательного вытеснения из фосфатов катиона группы лантана и замещения его свинцом. Это возможно исходя из различий в растворимости их солей ($\text{ПР} = n \cdot 10^{-23}$ у фосфатов лантаноидов, против $\text{ПР} = 7,9 \cdot 10^{-43}$ у $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$). Замещение лантаноидов свинцом приводит к увеличению интенсивности обратного рассеяния электронов на 30–50%, соответственно атомному номеру. Помимо этого, два фосфат-аниона способны связать три катиона свинца, вместо двух катионов элементов группы лантана.

Этот этап проходит уже пассивно. Применение на втором шаге свинца в форме соли уксусной кислоты добавляет целую группу доступных для визуализации структур, ответственных за энергетическое состояние клетки. В этом случае, протекание реакции (по типу реакции Барфедда, только со свинцом вместо меди) приводит к депонированию оксида свинца (II) в зонах клеток или тканей, которые были исходно обогащены углеводами, либо ближайшими продуктами их метаболизма:

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Последовательное химическое контрастирование и визуализацию каждого из двух этапов проводили на двух типах образцов – биопленки бактериальной культуры *S. aureus* ATCC 29213 и клеточной культуры фибробластов стромы роговицы глаза человека.

Бактерии культивировали с формированием биопленки на поверхности полистироловых дисков (диаметр 7 мм), помещаемых в лунки 24-луночного планшета (Greiner Bio-One GmbH, Австрия). Суточную культуру *S. aureus* ATCC 29213 (объем – 0,05 мл) в бульоне Мюллера – Хинтона, стандартизованную по оптической мутности до показателя 0,5 ед. по шкале МакФарланда, инокулировали в лунки планшета с 0,95 мл трипсинизированного соевого бульона Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton, Dickinson and Company, США), содержащего 1% глюкозы. Далее инкубировали 48 ч при 37 °С. Два одинаковых образца отдельно подвергали одноступенчатой (только элемент группы лантана) или двухступенчатой (с применением на втором шаге ацетата свинца) пробоподготовке.

Сравнивали контрастность двух эквивалентных образцов.

Фибробласты стромы роговицы глаза человека (кератоциты) получали методом ферментативной диссоциации центральной зоны консервированной в жидкой питательной среде кадаверной роговицы человека, не востребованной в ходе кератопластики, по методике, описанной ранее [5]. Использовали культуру кератоцитов, адгезированных на пластиковых покровных стеклах (Thermanox) после третьего пассажа при культивировании на среде DMEM high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate (Gibco), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma) и коктейль антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Клетки культивировались при 37 °С в атмосфере 5%-ного CO_2 . Высеивались на подложку за трое суток до исследования.

Для подготовки к СЭМ использовали серийно выпускаемый набор реактивов BioREE (ООО "Глаукон", Россия), содержащий в качестве контрастирующего агента раствор неодима.

Второй контрастирующий агент – рН-нейтральный нормотонический водный раствор уксусно-кислого свинца. В нем дополнительно экспонировали образцы в течение 15 мин, а затем промывали и высушивали воздушной кистью.

Для оценки влияния дополнительной обработки солью свинца брали два одинаковых образца. К исследованию один готовили в соответствии с рекомендациями производителя (контрастировали только неодимом), а второй дополнительно обрабатывали ацетатом свинца.

Образец кератоцитов был также изначально подготовлен по протоколу, то есть контрастирован только неодимом. После того, как было получено первое изображение на СЭМ, он снова был подвергнут химической обработке. А после дополнительного контрастирования ацетатом свинца – повторной съемке.

Визуализацию осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Zeiss EVO LS10 (ZEISS, Германия). Пластиковый

носитель с подготовленной бактериальной или эукариотической культурой размещали на предметном столике микроскопа поверх адгезивной углеродной ленты. Наблюдения вели в режиме низкого вакуума (ЕР, 70 Па), при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе на образце 120–170 пА. Для достижения максимального разрешения в обратно-рассеянных электронах использовали катод LaB_6 , а съемку вели на коротком рабочем отрезке $\text{WD} < 4,5$ мм. Захват изображений с шагом скан-генератора микроскопа 3072×2476 точки осуществлялся при условном разрешении: 17 нм/точка – для изображения кератоцитов и 4,3 нм – для изображений бактериальной пленки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получена пара изображений коллекционного штамма *S. aureus* ATCC 29213 после химического контрастирования только неодимом и дополнительной обработки ацетатом свинца (рис.3а, б). На обоих изображениях удовлетворительно визуализируется структура биопленки, включая индивидуальные клетки, элементы их ультраструктуры, межклеточные контакты и матрикс. Трактовка полученного изображения соответствует нашим наблюдениям при подготовке аналогичного препарата с использованием только лантаноидов [6]. Вместе с этим можно отметить, что после дополнительной обработки ацетатом свинца контрастность всех элементов структуры заметно возрастает. Исходя из теоретических предпосылок, подобное последовательное увеличение яркости свидетельствует о преобладании фосфатных сайтов связывания во всех наблюдаемых структурах, включая адгезивные контакты между отдельными клетками. Последнее может косвенно указывать на минорную роль Са-зависимых белков адгезии в формировании контактов бактериальных клеток.

Рис.3. Культура *S. aureus* ATCC 29213. СЭМ в обратно-рассеянных электронах после контрастирования неодимом (а) и дополнительной обработки свинцом (б). Ширина поля зрения – 18 мкм. Во врезках – гистограммы частот распределения яркости. Ускоряющее напряжение 20 кВ, низкий вакуум (70 Па), ток 120 пА

Общее увеличение контрастности изображения по отношению к базовой яркости пластиковой основы после дополнительной химической обработки ацетатом свинца составило 214%.

Пара полученных изображений одного и того же участка пластикового носителя с кератоцитами позволила доказать возможность проведения корреляционных исследований методом СЭМ при последовательном "докрашивании" клеток химическими веществами. Первое изображение (рис.4а) было захвачено после химического контрастирования только неодимом, а второе (рис.4б) – после извлечения из камеры микроскопа и дополнительного контрастирования реактивом на основе ацетата свинца.

Уже после контрастирования только лишь элементом группы лантана в животной клетке хорошо визуализируются

Рис.4. Фибробласты стромы роговицы глаза человека (кератоциты) на поверхности пластика. Последовательная съемка на СЭМ одного поля зрения после контрастирования неодимом (а), а затем свинцом (б). Цветовая карта (в) характеризует соотношение контрастности на изображениях (а и б). Условные цвета карты: красный, оранжевый – структура контрастна только на изображении (а); бирюзовый, голубой – структура контрастна только на изображении (б); желтый, зеленый – структура визуализируется на изображении (а), но на (б) она более контрастна. Режим детекции обратно-рассеянных электронов, ускоряющее напряжение 20 кВ, низкий вакуум 70 Па, ток 146 пА

следующие элементы: клеточная мембрана, цитоскелет, ядерная мембрана, ядрышки. Каждый из этих структурных элементов имеет свой доминирующий механизм, позволяющий химически акцептировать лантаноид в своей позиции.

Ядерная и клеточная мембраны богаты кальциевыми каналами, предполагающими транспортировку двух катионов кальция одновременно, в одной структурной позиции, с последующим распараллеливанием (рис.5). В случае, если происходит изоморфная замена $\text{Ln}^{3+} + \text{Me}^+ \rightarrow 2\text{Ca}^{2+}$, то, при попытке развести транспорт на два независимых канала, транспортная система ингибируется, а лантаноид остается в структуре в качестве ее маркера [7]. Этот очень важный механизм имеет прикладное значение для СЭМ: он позволяет не только визуализировать активный кальциевый транспорт клетки, но и определяет дальнейшую устойчивость ее к высыханию в условиях относительного вакуума микроскопа.

На суперпозиции двух изображений (рис.4в) до и после дополнительного контрастирования ацетатом свинца применено цветовое кодирование как результат логического сложения. Красный цвет соответствует сайтам связывания только неодима, оранжево-зеленый – областям, где неодим вытеснен свинцом на втором шаге, голубой – зоны фиксации только свинца. На изображении клетки видно, что ядерная мембрана осталась красного цвета, так как нет предпосылок для фиксации халькофильных элементов в зонах ингибирования кальциевых каналов.

В процессе самосборки микротрубочки цитоскелета в окружающую цитоплазму выбрасывается значительное количество фосфат-аниона. В случае, если в цитоплазме

присутствует Ln^{3+} , то он связывается с анионом, образуя простой фосфат. При нескольких актах сборки микротрубочки в близком направлении зона цитоплазмы истощается по PO_4^{3-} и очередной акт разборки микротрубочки ингибируется. Вокруг этого направления образуется "облако" LnPO_4 , видимое в обратно-рассеянных электронах (рис.6).

Ранее отмечено, что свинец легко вытесняет из фосфатов лантаноиды с увеличением атомной доли катиона. Таким образом, при "докрашивании" ацетатом свинца фосфатные сайты связывания лантаноида (неодима) становятся заметно контрастнее, что показано на рис.4в оранжевым и зеленым тоном решетчатых структур цитоскелета.

Не получившие предварительной контрастности при использовании только препарата неодима, но ставшие контрастными после обработки ацетатом свинца зоны связаны с выпадением оксида свинца (II). Преимущественно они связаны с позицией простых органических соединений, отвечающих за "энергетический" обмен клетки. Наиболее распространенный углевод, который клетка метаболизирует в зоне эндоплазматического ретикулума (ЭПР) – глюкоза. На рис.4в видно, что зона ЭПР окрасилась голубым цветом при совмещении изображений, полученных последовательно после двух ступеней контрастирования, что означает появление контраста исключительно после применения ацетата свинца.

ВЫВОДЫ

Разработанный метод позволяет визуализировать бактериальные агрегаты и подповерхностные структуры эукариотических клеток. На получаемых изображениях последних можно раз-

Рис.5. Схема работы кальциевого канала в отсутствие лантаноида (а) и ингибирование кальциевого транспорта в присутствии лантаноида с его накоплением (б).
АТФ – аденозинтрифосфат, АДФ – аденозиндифосфат, Е – энзим

Рис.6. Схема самосборки тубулиновой микротрубочки цитоскелета в отсутствие лантаноида (а) и ингибирование разборки микротрубочки при связывании и накоплении лантаноида со свободным фосфатным остатком в цитоплазме (б)

личить зоны межклеточных контактов, клеточные мембраны, ядро с ядрышками, митохондрии, эндоплазматическую сеть, элементы цитоскелета и обогащенные углеводами зоны клетки.

Таким образом, с помощью лантаноидного контрастирования и СЭМ в обратно-рассеянных электронах можно быстро и просто визуализировать пространственное расположение и ультраструктуру максимально нативных биологических тканей. Применение второй ступени контрастирования на основе ацетата свинца увеличивает контрастность объектов и позволяет отличить фосфатные сайты связывания лантаноидов от Са-зависимых транспортных систем и зон клетки, в которых накапливаются и метаболизируются углеводы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Electron Microscopy: Methods and Protocols. 3rd ed. Humana Press; 2014 // Kuo J., editor. (Methods in Molecular Biology), P.95–132. doi: 10.1007/978-1-62703-776-1.
2. Richards R.G., Stiffanic M., Owen G.Rh., Riehle M., ap Gwynn I., Curtis A.S.G. Immunogold labeling of fibroblast focal adhesion sites visualized in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy // Cell Biol. Int. 2001. Vol. 25. № 12. P. 1237–1249. doi: 10.1006/cbir.2001.0807.
3. Новиков И.А., Суббот А.М., Федоров А.А., Грибоедова И.Г., Антонов Е.Н., Вахрушев И.В. Суправитальное контрастирование лантаноидами для визуализации структуры биологических образцов на сканирующем электронном микроскопе // Гены и Клетки. 2015. Т. 10. № 2. С. 90–96.
4. Doggenweiler C.F., Frenk S. Staining properties of lanthanum on cell membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1965. Vol. 53. P. 425–430.
5. Sidney L.E., McIntosh O.D., Hopkinson A. Phenotypic Change and induction of cytokeratin expression during In vitro culture of corneal stromal cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. Vol. 56. № 12. P. 7225–7235. doi: 10.1167/iov.15-17810.
6. Чеботарь И.В., Новиков И.А., Суббот А.М., Маянский Н.А. Лантаноидное контрастирование как ускоренная технология пробоподготовки микробиологических препаратов для сканирующей электронной микроскопии // Современные технологии в медицине. 2017. Т. 9. № 3. С. 23–30. doi: 10.17691/stm2017.9.3.03.
7. Chebotar I.V., Novikov I.A., Subbot A.M., Mayansky N.A. Lanthanoid staining as a fast technology of preparing microbiological specimens for scanning electron microscopy // Sovremennye tehnologii v medicine [Modern technologies in medicine]. 2017. Vol. 9. № 3. P. 23–30.
8. Ferreira-Gomes M.S., González-Lebrero R.M., de la Fuente M.C., Strehler E.E., Rossi R.C., Rossi J.P. Calcium occlusion in plasma membrane Ca²⁺-ATPase // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. № 37. P. 32018–32025. doi: 10.1074/jbc.M111.266650.

Вышел в свет очередной номер журнала "Аналитика и контроль"

Читайте в номере:

Суханов П.Т., Савина А.Г., Кушнир А.А., Полу-
женкова Е.В.
Концентрирование и определение бензойной и сали-
циловой кислот в водных средах и продуктах питания

Ревенко А.Г., Суворова Д.С., Худоногова Е.В.
Исследование возможности применения филь-
тров при рентгенофлуоресцентном анализе
в длинноволновой области

Ryohei Tanaka, Tomohiro Sugino, Daisuke
Yamashita, Naomi Shimura, and Jun Kawai
Polarized XRF spectrometer with a 40-mW X-Ray
tube

Пашкова Г.В., Мухамедова М.М., Айсуева Т.С.,
Финкельштейн А.Л., Щетников А.А.
Использование способа стандарта-фона при
определении элементов в донных отложениях
методом рентгенофлуоресцентного анализа
с полным внешним отражением

Левин А.Д., Нагаев А.И., Садагов А.Ю., Кара-
хотин С.Н.
Качественный анализ вин на основе совместного
использования их оптических спектров различ-
ной физической природы

Зенкевич И.Г., Носова В.Э.
Хроматомасс-спектрометрическая характери-
стика триалкилфосфитов

Самохин А.С., Каламбет Ю.А.
Определение параметров функции развертки
квадрупольного масс-спектрометра

Малышева А.О., Балдин М.Н., Груз-
нов В.М., Блинова Л.В.
Внелaborаторный экспрессный газохроматогра-
фический метод анализа выдыхаемого челове-
ком воздуха с автоматизированной градуировкой

Парийчук Н.В., Онучак Л.А., Арутю-
нов Ю.И., Куркин В.А., Правдивцева О.Е.
Парофазный газохроматографический анализ
летучих компонентов лекарственного расте-
ния «зверобой продырявленный» (hypericum
perforatum L.) и препаратов на его основе

Тищенко Е.А., Цюпко Т.Г., Воронова О.Б.
Электрофоретическое определение соединений
фенольной природы в растворимом кофе

Мезенцева О.Л., Слепченко Г.Б., Филимо-
нов В.Д., Михеева Е.В., Арбит Г.А.
Определение галонала и бензонала в таблетиро-
ванных формах лекарственных препаратов мето-
дом инверсионной вольтамперометрии