

Сканирующий зондовый нанотомограф: особенности технических решений для анализа биомедицинских материалов при низких температурах

Аннотация

Представлена конструкция нанотехнологического комплекса для сканирующей зондовой нанотомографии, основанная на объединении технологий криоультрамикротомии и сканирующей зондовой микроскопии. Рассмотрены особенности конструктивных и технических решений модуля сканирующего зондового микроскопа, необходимые для эффективного функционирования в криокамере при низких температурах и согласованной работы с ультрамикротомом для выполнения трехмерных томографических реконструкций образцов. Представленный комплекс позволяет получать уникальную информацию о нативной микро- и наноструктуре исследуемых объектов. Рассмотрены перспективные возможности и направления применения комплекса для биомедицинских исследований.

Развитие технологий анализа микро- и наноструктурных особенностей искусственных и нативных биологических объектов и биотканей имеет ключевое значение для структурной биологии, медицинской диагностики, создания новых материалов и биоинженерных конструкций медицинского назначения. Разработка новой технологии трехмерного анализа внутриклеточных и тканевых структур (нанотомографии) позволит значительно повысить эффективность исследований биологических объектов и тканеинженерных конструкций, а также анализа структуры органов и тканей, в том числе предназначенных для трансплантации. При этом важнейшими требованиями для микроскопических исследований биообъектов являются сохранение и стабилизация нативной структуры на уровне индивидуальных макромолекул. Наилучшим способом стабилизации макромолекулярной структуры биообъектов является фиксация при низкой температуре [1].

Существующие техники ультрамикротомии позволяют получать сверхтонкие срезы поверхности различных биообъектов и материалов – толщиной от 25 до 250 нм. При этом криофиксация нативной структуры биологических объектов требует применения криоультрамикротомии, при которой срезы производятся при низких температурах (до $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для достижения наилучших результатов образец должен быть подвергнут измерениям через минимальное время после среза, при низкой температуре и с минимальными механическими и структурными нарушениями. Предпочтительным в данном случае является анализ не среза, а поверхности блока образца непосредственно после среза, также при низкой температуре, так как поверхность блока испытывает гораздо меньше механических нарушений в процессе среза [2]. В качестве методики анализа наноструктуры поверхности блока мы предлагаем метод сканирующей зондовой микроскопии, который является методом неразрушающего многопараметрического анализа поверхности с наноразмерным (вплоть до молекулярного и атомного) разрешением. Более того, ключевым преимуществом предлагаемого подхода является возможность выполнять серии последовательных измерений поверхности после сверхтонких срезов исследуемого биологического объекта и восстанавливать его трехмерную наноструктуру посредством нанотомографии [3], [4].

В данной статье мы представляем разработку дизайна нового прибора для выполнения томографических наномасштабных исследований трехмерных наноразмерных структурных и морфологических свойств биологических объектов – клеток и нативных образцов биотканей – в криогенных условиях. Его применение позволит получить новые научные результаты, касающиеся трехмерной организации внутриклеточных органелл и структур в клетках и тканях, а также существенно расширить существующие представления о наноструктурных особенностях биологических тканей и искусственных материалов, перспективных для применений в регенеративной медицине, и позволит проводить диагностику ряда патогенных изменений структуры тканей и органов перед трансплантацией.

Концепция разработки заключается в объединении методик и аппаратных решений сканирующей зондовой микро-

скопии (СЗМ) и ультрамикротомии при низких температурах (криоУМТ) в рамках одной измерительной системы для сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), обладающей следующими базовыми характеристиками:

- 1) возможностью измерений основными методами СЗМ (топография, фазовый и амплитудный контраст) поверхности образцов непосредственно после среза ультрамикротомом *in situ* в рамках рабочего цикла среза криоУМТ;
- 2) согласованным функционированием СЗМ и ультрамикротомом для осуществления трехмерной реконструкции структуры образцов на основе последовательных измерений;
- 3) обеспечением достаточного разрешения и уровня шума СЗМ, необходимых для изучения ультраструктуры биологических объектов и биоматериалов: уровень шума по вертикали Z составляет 0,05 нм RMS, латеральное разрешение в плоскости образца XY равно 5...10 нм.

С помощью комбинированного комплекса СЗМ/криоультрамикротом предполагается получение изображения морфологии наноразмерных структур на поверхности изучаемого объекта после каждого выполненного сверхтонкого среза при низких температурах (до $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$). Таким образом, в результате будет получен массив последовательных двумерных изображений наномасштабной морфологии срезов замороженных биологических объектов, которые будут при помощи специализированного программного обеспечения преобразовываться в визуализированные трехмерные представления морфологии наноразмерных структур в объеме.

Концепция экспериментального комплекса

В данном разделе мы рассмотрим ключевые технические решения, использованные в нашей разработке. Для выполнения поставленных задач нам необходимо осуществлять ультратонкие срезы толщиной от 25 до 500 нм биологических образцов с максимальным размером срезаемой поверхности не менее $3 \times 3\text{ мм}$ при температурах от -190 до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Всего лишь две компании на мировом рынке производят криоультрамикротомы, отвечающие базовым требованиям к толщине срезов и диапазону рабочих температур: «Leica Microsystems GmbH» (Австрия) и «Boeckeler Instruments» (США). Криоультрамикротом «Leica Microsystems EM UC6/FC6», оснащенный криокамерой для выполнения сверхтонких срезов образцов при низких температурах, удовлетворяет всем необходимым требованиям, рассмотренным выше, и поэтому был выбран в качестве системы модификации образца для экспериментального комплекса СЗНТ.

Выполнение ряда последовательных срезов толщиной от 25 нм требует применения специализированных алмазных ножей с углом раствора 35° , приспособленных для измерений как при комнатной, так и при низких температурах. Использование обычных стеклянных ножей не дает возможности получать ряд в несколько десятков срезов подобной толщины без снижения качества срезов, что критично для выполнения нанотомографических реконструкций. Специализированные алмазные ножи для СЗНТ были изготовлены компанией «Diatome AG» (Швейцария).

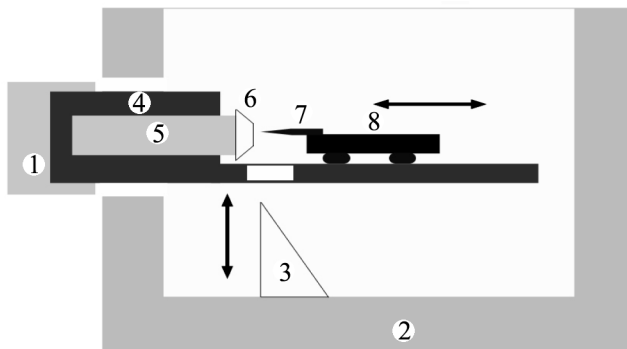


Рис. 1. Функциональная схема комплекса: 1 – подвижная консоль (рука) ультрамикротом; 2 – криокамера ультрамикротом; 3 – нож ультрамикротом; 4 – основа сканирующей системы; 5 – сканер СЗМ; 6 – образец; 7 – зонд СЗМ; 8 – держатель зонда (подвижная каретка)

Использование серийного криоультрамикротом в качестве системы модификации образца приводит к важному конструктивному и техническому решению по разработке комплекса СЗНТ, а именно: сборочные единицы (система сканирования и измерительный модуль СЗМ) должны быть встраиваемы в криокамеру ультрамикротом, которая будет служить основой всего устройства.

Предполагается следующая архитектура комплекса (рис. 1). Система сканирования образцов (рис. 2) состоит из модулей сканера, основы и приводов подвижки для образца. Она размещается в криокамере ультрамикротом и закрепляется вместо штатного держателя образца криоультрамикротом так, что ось пьезотрубок сканера совпадает с осью руки (подвижной консоли) криоультрамикротом. Данное расположение позволяет установить никелевый носитель образца на сканере при помощи магнита и выполнить его срез при помощи ножа ультрамикротом, а затем без перемещения образца на сканере выполнить сканирование образца непосредственно после среза в камере ультрамикротом. При этом сканирование образцов выполняется в вертикальной плоскости, совпадающей с плоскостью среза.

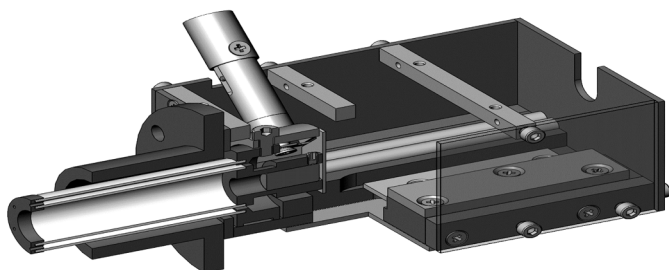


Рис. 2. Вид модели сборки разработанной системы сканирования

В разработанной конструкции используется двухтрубчатый пьезосканер с использованием трубок из пьезокерамики толщиной $h = 0,5$ мм и длиной $L = 32$ мм. Конструкция вложенных пьезотрубок обеспечивает компенсацию термического расширения и дрейфа трубок при изменениях температуры, что особенно важно при работе комплекса в широком диапазоне температур.

Внешняя пьезотрубка большего диаметра (внешний диаметр $D = 12$ мм, внутренний диаметр $d = 11$ мм) служит для перемещения образца по оси сканера (оси Z). Внутренняя пьезотрубка меньшего диаметра (внешний диаметр $D = 9$ мм, внутренний диаметр $d = 8$ мм) имеет четырехсекционные электроды и используется для сканирования образца в плоскости XY. В результате подачи противозападного напряжения на противоположные электроды возникает изгиб пьезотрубки и происходит перемещение образца в плоскости сканирования. При заданных размерах трубки и диапазоне прикладываемого электрического напряжения от -300 до $+300$ В получаем размер области сканирования около 50×50 мкм, а диапазон перемещения образца по оси Z – около 7 мкм. Необходимо учитывать, од-

нако, что реальное значение диапазона может зависеть от особенностей поляризации конкретной трубки и определяется в процессе калибровки и испытаний системы. Расчетные резонансные частоты сканера составляют более 10 кГц в аксиальном направлении и более 1 кГц в латеральном направлении.

Корпус сканера и соединенные с ним детали основы системы сканирования выполнены из титана, что снижает термические и нефункциональные дрейфы при работе при низких температурах.

Для достижения необходимого качества СЗМ-измерений необходимо ограничить влияние на систему механических вибрационных и акустических шумов, а также конвекционных газовых потоков в криокамере на систему «зонд-образец». Уменьшение влияния механических вибрационных и акустических шумов достигается за счет увеличения жесткости и уменьшения массы элементов системы, что приводит к увеличению резонансных частот и снижению чувствительности к низкочастотным вибрациям. Использование предложенной конфигурации сканирующей системы позволяет закрыть стенками и шторкой зону измерений с держателем зонда во время измерений. Это позволяет также эффективно изолировать зону измерений от газовых конвекционных потоков в криокамере, что снижает шумы и повышает точность измерений.

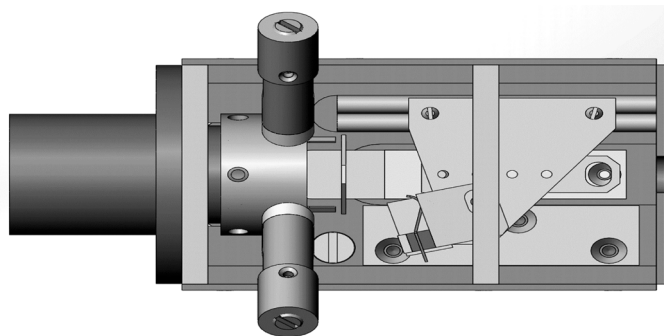


Рис. 3. Расположение держателя зонда в системе сканирования (вид сверху)

Измерительный модуль СЗМ состоит из двух основных модулей: держателя зонда и модуля подвода. Держатель зонда размещается на направляющих на основе системы сканирования и подводится горизонтально к поверхности образца для сканирования (рис. 3). В качестве зонда используют СЗМ-зонды на основе кварцевых резонаторов («А-probe», «Nanosensors», Германия) [5], [6], что позволяет исключить из конструкции обычную для СЗМ оптическую систему регистрации отклонений зонда и обеспечить его уверенное функционирование в криокамере. При выполнении среза держатель перемещается вместе с системой сканирования, что минимизирует относительные нефункциональные перемещения «зонд-образец» в плоскости сканирования. Этот аспект критичен для выполнения последовательных измерений в одной и той же области образца после срезов и последующей трехмерной нанографической реконструкции структур образца, так как при значительных относительных нефункциональных перемещениях «зонд-образец» зонд не будет попадать в требуемую область с достаточной точностью, что усложнит трехмерную реконструкцию. То, что держатель зонда располагается на основе и перемещается вместе с рукой микротом, также эффективно минимизирует механическую петлю «зонд-образец» и отсеивает вибрационные и механические шумы, к которым чувствительна сама рука микротом.

Держатель зонда дополнительно прижимается к основе за счет магнитной системы, что позволяет уменьшить его массу при сохранении устойчивости. Это позволяет повысить резонансные частоты системы и снизить чувствительность измерительной системы к механическим и вибрационным шумам.

Модуль подвода закрепляется на верхней крышке криокамеры вне охлаждаемой зоны и передвигает держатель зонда вдоль оси Z к образцу или от образца при помощи толкателя, входящего во внутреннюю зону криокамеры. Для перемеще-

ния толкателя используется прецизионный шаговый двигатель. Это техническое решение позволяет использовать шаговый двигатель при комнатной температуре, что повышает надежность и снижает стоимость используемых комплектующих, и освободить ограниченное пространство внутри криокамеры.

Сканер, двигатель подвода и зонд СЗМ на базе кварцевого резонатора соединяются с блоком микропроцессорного управления для согласованного выполнения операции и измерений. Блок микропроцессорного управления, в свою очередь, соединяется при помощи интерфейса USB 2.0 с управляющим компьютером.

Результаты и обсуждение

Описанная выше архитектура комплекса и его сборочных единиц позволяет обеспечивать функционирование комплекса СЗНТ в цикле «срез-измерение», в результате чего получается серия послойных СЗМ-изображений после последовательных сверхтонких срезов, на базе которой при помощи специализированного программного обеспечения может быть реконструирована трехмерная структура изучаемого образца в объеме. На рис. 4 представлена трехмерная реконструкция наноструктуры полимерного композита ABS/ПА6 (акронитрил-бутадин-стирен/полиамид 6), используемая нами в качестве тестового образца. Мы можем визуализировать трехмерную структуру кластера ABS в полиамидной матрице с разрешением до 10 нм в плоскости XY и 50 нм (толщина среза) по оси Z. Тестирование разработанных узлов комплекса показывает, что использование вышеописанных технических решений позволяет достичь требуемых измерительных характеристик: уровня шума по вертикали Z – 0,05 нм RMS, латерального разрешения в плоскости образца XY не хуже 10 нм. Необходимо отметить, однако, что требуются дополнительные методические исследования по калибровке и повышению точности измерений шага трехмерной реконструкции по оси Z, определяемой толщиной среза.

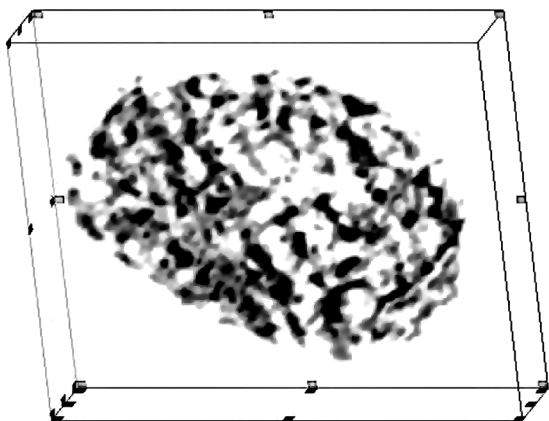


Рис. 4. Трехмерная СЗНТ-реконструкция кластера ABS в полиамидной матрице размерами $4,0 \times 4,0 \times 1,0$ мкм, 20 срезов толщиной 50 нм

Описанный метод криоСЗНТ пока не применялся для анализа нативных биологических клеток и тканей ни в России, ни за рубежом, и его применение для подобных объектов потребует решения ряда методических задач, связанных как с подготовкой образцов, так и непосредственно с измерениями. Так, для сохранения нативной структуры и биологических объектов, и гелевых матриксов проведение последовательных сверхтонких срезов и СЗМ-анализа при низкой температуре (до -190 °C) потребует подбора соответствующих фиксаторов и криопротекторов, а также технологий заморозки образцов без нарушения нативной структуры вследствие кристаллизации содержащейся в них воды (витрификации), в частности технологии заморозки при высоком давлении. Разработка методик пробоподготовки и исследований для различных видов клеток и нативных тканей органов является важнейшей задачей дальнейших исследований в данном направлении.

Разрабатываемый нанотехнологический комплекс и технология СЗНТ могут быть использованы для решения широкого класса задач. В частности, применение данной технологии позволит оценивать трехмерное распределение наночастиц и их кластеров в биологических объектах и бионанотехнологических конструкциях (в том числе применяемых в средствах доставки лекарственных веществ), степень нанопористости и трехмерную структуру взаимосвязанных систем микро- и нанопор в биосовместимых матриксах, трехмерную организацию компарментов в клетках. Основной областью применения подобного оборудования является обеспечение нанотехнологических и материаловедческих исследований и разработок в области биотехнологии, создания и контроля качества новых фармацевтических препаратов и изделий медицинского назначения для регенеративной медицины и анализа структур клеток и тканей для целей медицинской диагностики.

Данная работа выполнена в рамках проекта ФЦПР 2014-2020 Минобрнауки России (соглашение № 14.604.21.0001, уникальный идентификатор проекта RFMEF160414X0001). Мы благодарим Кристиана Сайлера (Institute of Polymers, ETH Zurich, Швейцария) за предоставленный образец композита ABS/ПА6.

Список литературы:

1. Bouchet-Marquis C., Hoenger A. Cryo-electron tomography on vitrified sections: A critical analysis of benefits and limitations for structural cell biology // *Micron*. 2011. Vol. 42. № 2. PP. 152-162.
2. Walther P., Müller M. Biological ultrastructure as revealed by high resolution cryo-SEM of block faces after cryo-sectioning // *Journal of Microscopy*. 1999. Vol. 196. № 3. PP. 279-287.
3. Efimov A.E., Gnaegi H., Schaller R., Grogger W., Hofer F., Matsko N.B. Analysis of native structure of soft materials by cryo scanning probe tomography // *Soft Matter*. 2012. Vol. 8. PP. 9756-9760.
4. Mochalov K.E., Efimov A.E., Bobrovsky A., Agapov I.I., Chistyakov A.A., Oleinikov V.A., Sukhanova A., Nabiev I. Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials // *ACS Nano*. 2013. Vol. 7. № 10. PP. 8953-8962.
5. Akiyama T., Staufner U., de Rooij N.F., Frederix P., Engel A. Symmetrically arranged quartz tuning fork with soft cantilever for intermittent contact mode atomic force microscopy // *Rev. Sci. Instrum.* 2003. Vol. 74. PP. 112-117.
6. Akiyama T., Staufner U., de Rooij N.F. Self-sensing and self-actuating probe based on quartz tuning fork combined with microfabricated cantilever for dynamic mode atomic force microscopy // *Applied Surface Science*. 2003. Vol. 210. PP. 18-21.

Антон Евгеньевич Ефимов,
канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник,
Ольга Игоревна Агапова,
научный сотрудник,
Игорь Иванович Агапов,
д-р биолог. наук, профессор,
заведующий лабораторией,
лаборатория бионанотехнологий,
ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных
органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ,
г. Москва,
e-mail: igor_agapov@mail.ru