

МУЛЬТИМАСШТАБНАЯ ОБЪЕМНАЯ МИКРОСКОПИЯ: ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В.Я. Шкловер, П.Р. Казанский
ООО “Системы для микроскопии и анализа”, Сколково

Методы объемной микроскопии и средства 3D-визуализации микроструктур позволяют получать объемные реконструкции исследуемого объекта в макро-, микро- и субмикронном/нанометровом масштабе, что дает возможность лучше понять пространственные взаимоотношения элементов исследуемого объекта на разных уровнях структурной детализации и получить полную морфологическую картину – от органа до клетки и субклеточных структур. Представлены результаты применения методов и возможностей мультимасштабной объемной микроскопии при исследовании биологических объектов.

Ключевые слова: *мультимасштабная объемная микроскопия, объемная реконструкция, волюметрический анализ, микроскопия, рентгеновская микротомография, растровая электронно-ионная микроскопия, Slice&View*

В последнее время все большую актуальность приобретают методы объемной микроскопии и средства 3D-визуализации микроструктур: объемные реконструкции исследуемого объекта выполняются в макро-, микро- и субмикронном/нанометровом масштабе, позволяющие лучше понять пространственные взаимоотношения элементов исследуемого объекта на разных уровнях структурной детализации и получить полную морфологическую картину – от органа до клетки и субклеточных структур.

Современные методы мультимасштабной объемной микроскопии позволяют не только проводить количественные волюметрические структурные исследования, но и моделировать функциональные процессы в тканях, в том числе капиллярные процессы, перфузию и газообмен. При этом чрезвычайно важно иметь полную трехмерную визуализацию границ раздела (интерфейсов) взаимодействующих объектов.

Мультимасштабность исследований обеспечивается комплексным применением разных методов структурной характеристики, в частности, световой флуоресцентной конфокальной микроскопии, рентгеновской микротомографии (рентгеновской микроскопии), растровой электронно-ионной микроскопии (FIB/SEM), просвечивающей электронной микроскопии, а также программных средств реконструкции, визуализации, количественных расчетов и функционального моделирования тканей и органов (AMIRA Resolve RT, AVIZO Fire, Xlab HYDRO).

Целью настоящего исследования является отработка методов и демонстрация преимуществ мультимасштабной (и мультимодальной) объемной микроскопии для трехмерной визуализации и характеристики биологических тканей и интерфейсов между живой и неживой материей, клеточных и субклеточных структур с микронным и нанометровым разрешением.

В настоящем исследовании решались следующие задачи:

- ✓ Пробоподготовка. Для достижения лучшего контраста и разрешения при структурном исследовании необходимо оптимизировать методику подготовки образцов. В том числе, необходимо определить способы фиксации тканей, их контрастирования (окрашивания), а также заливки препарата в полимерную смолу для обеспечения совместимости образца с электронно-микроскопическими методами исследования. Фактически, речь идет об определении универсального протокола подготовки биологических тканей для мультимодального структурного исследования, в частности для объемной микроскопии с нанометровым разрешением.
- ✓ Визуализация. Подбор параметров получения структурной информации, в том числе, оптимизация ускоряющего напряжения и тока пучка, выбор детекторов и их параметров при получении изображения в электронном микроскопе, подбор параметров рентгеновского источника и фильтров при рентгеновском микротомографировании.
- ✓ Применение методик корреляционной микроскопии для мультимасштабной трехмерной структурной характеристики, дающих возможность исследовать микро- и наноструктурную информацию в контексте более крупных структурных деталей, вплоть до макрообраза исследуемого объекта.
- ✓ Трехмерные реконструкции объекта на основе полученной мультимасштабной структурной информации. Оптимизация контраста с применением фильтрации и компьютерной обработки исходных двумерных изображений (снимков, проекций). Сегментация структурной информации (автоматизированная, по контрасту, на основе алгоритмов распознавания изображений, или ручная, на основе особенностей структурных деталей на исходных изображениях). Морфометрический и волюметрический анализ структурной информации на полученной реконструкции.

Краткое описание экспериментальных методик

1. Компьютерная рентгеновская микротомография

На специальной виброизолированной и термостатированной платформе располагают точечный источник рентгеновского излучения с размером пятна порядка 1 мкм, исследуемый объект на поворотном столике с 4 степенями свободы перемещений, и систему регистрации изображений. Производится съемка проекций объекта от точечного источника под разными углами разворота с шагом менее 1°, в диапазоне углов поворота 0°–360°. Компьютерный анализ серии проекций позволяет реконструировать трехмерный образ объекта и получить изображения виртуальных сечений объекта в произвольной плоскости. Метод позволяет получать и обрабатывать полную информацию о трехмерной структуре объекта, осуществлять навигацию для поиска области интереса и при переходе от макро- к микромасштабу, а также получать объемную структурную информацию от выбранных областей внутри объекта исследования с разрешением <1 мкм.

2. Метод послойной резки объекта посредством фокусированного ионного пучка с последовательной съемкой полученных сечений в обратно-отраженных электронах (FIB/SEM Slice&View)

Метод реализуется в двулучевой системе сканирующей электронно-ионной микроскопии, сочетающей воздействие на поверхность исследуемого объекта фокусированного ионного пучка (позволяющего, например, вскрывать поперечное сечение приповерхностного слоя исследуемого объекта с последующим послойным удалением материала с поверхности сечения) с возможностями сканирующей электронной микроскопии для визуализации полученных последовательных сечений. На основе полученной серии последовательных послойных изображений средствами специализированного программного обеспечения реконструируется объем исследуемого объекта. Для получения изотропного по разрешению трехмерного изображения необходимо, чтобы толщина удаляемых в каждом цикле съемки слоев была одинакова и примерно равна разрешению в плоскости сечения, т.е. воксел реконструированного изображения должен быть равноосным. Таким образом, минимальная (стабильно воспроизводимая) толщина удаляемого ионным пучком слоя материала определяет разрешение трехмерной реконструкции и составляет величину порядка 10 нм.

Изображения последовательных сечений регистрируются в обратно-отраженных элек-

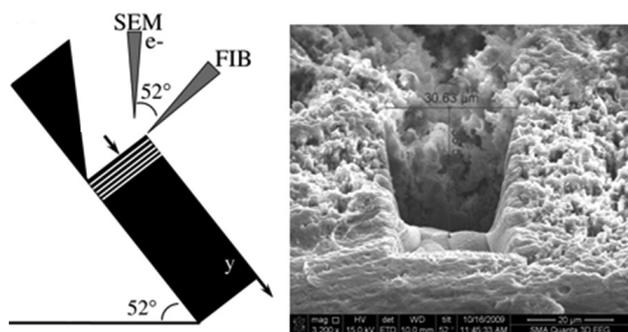


Рис. 1. Геометрия резки FIB/SEM Slice&View и визуализации сечений

тронах при ускоряющем напряжении 1–2 кэВ. Контраст на изображениях соответствует распределению плотности/рассеивающей способности материала объекта (т.н. Z-контраст) (рис. 1).

Результаты

Ниже представлены результаты исследования биологических объектов, полученные в лаборатории применения ООО СМА и демонстрирующие преимущества методов объемной микроскопии в сравнении с традиционными методами.

1. Исследование объемных клеточных структур коры головного мозга человека; применение полученной информации для количественного анализа

Работы [1–3] выполнены в сотрудничестве с Научным центром психического здоровья РАМН.

Образцы специально подготовленного (контрастирование солями тяжелых металлов, фиксация в полимерной смоле) посмертного препарата ткани белого вещества головного мозга человека (здорового индивидуума и больного шизофренией) исследовались с применением методов компьютерной рентгеновской микротомографии и послойной резки посредством фокусированного ионного пучка.

Данные компьютерной рентгеновской микротомографии позволили визуализировать текстуру миелиновых волокон белого вещества, выбрать область интереса для послойной резки и поместить результаты объемной реконструкции ультраструктур в макро-контекст исследуемого объекта (рис. 2).

На следующем этапе на выбранном с учетом данных компьютерной рентгеновской мик-

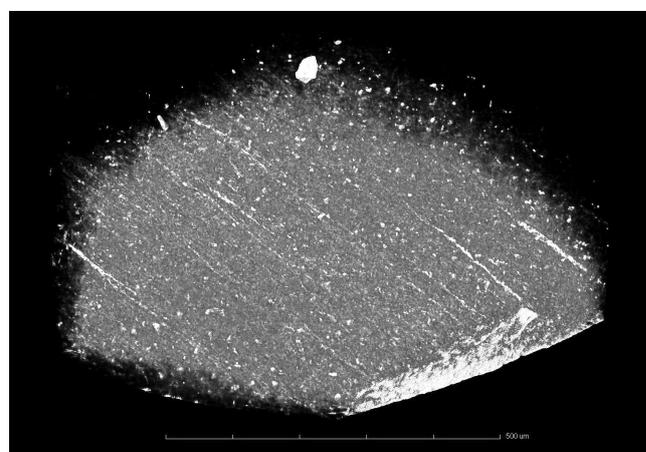
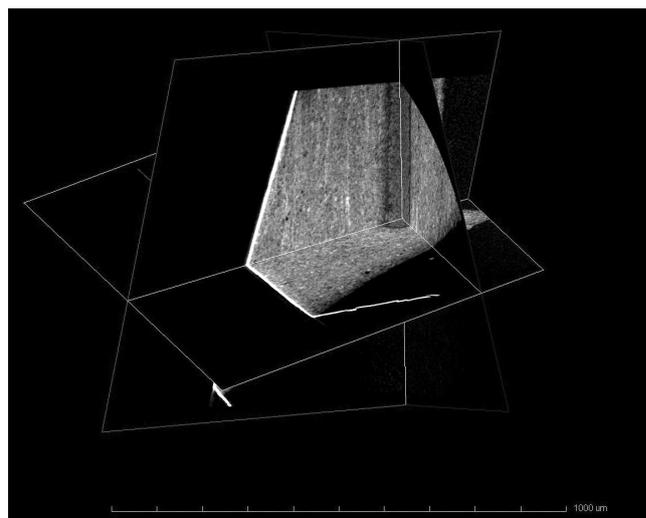


Рис. 2. Трехмерная реконструкция структур белого вещества головного мозга человека (префронтальный кортекс BA10) по данным компьютерной рентгеновской микротомографии. Четко различимы отдельные миелиновые волокна, ориентированные в одном направлении

ротомографии месте образца на двухлучевой установке FIB/SEM в автоматическом режиме производилась съемка последовательных поперечных срезов.

Посредством специального программного обеспечения из массива последовательных срезов получены трехмерные реконструкции заданных объемов ткани, в частности, области контакта микроглиальной клетки с миелиновыми волокнами, а также миелиновых волокон, для которых был выполнен количественный волюметрический анализ отдельных структурных элементов (рис. 3, 4).

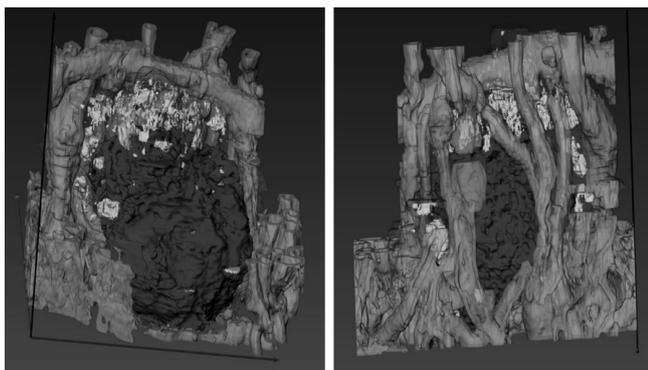


Рис. 3. Ультраструктура микроглиальной клетки в контакте с миелиновыми волокнами. Объемная реконструкция позволила идентифицировать области плотного контакта миелиновых волокон с цитоплазмой микроглии [3]

Объем	мкм ³	%	мкм ³	%	мкм ³	%
Миелиновое волокно	4,65	100,0	39,32	100,0	4,917	100,0
Миелиновая оболочка	2,26	48,6	21,06	53,6	3,02	61,4
аксон	2,39	51,4	13,49	34,3	1,67	34,0
Edema	0	0,0	4,77	12,1	0,227	4,6

Объем отдельных отеков

мкм ³	%
0,58	1,48
3,06	7,78
0,106	0,27
0,98	2,49

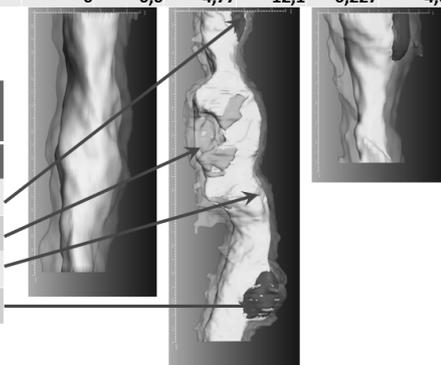
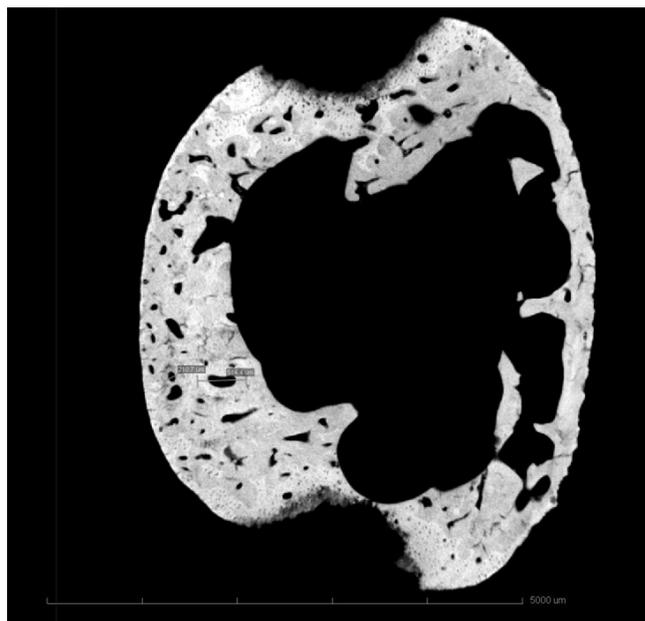


Рис. 4. Волюметрический анализ отдельных миелиновых волокон позволил охарактеризовать топологию отеков и определить объемные соотношения дефектных структур в миелиновых оболочках [1]

2. Рентгеновская микротомография костных останков древних людей и ископаемых форм гоминид

Вопросы роста и развития ископаемых форм имеют важнейшее значение в решении проблем антропогенеза. Анализ гистологических параметров кости, связанных с особенностями остеонного строения, в этом отношении очень важен. Рентгеновская микротомография позволяет получать такие данные с достаточным разрешением (до 1 мкм), являясь при этом неdestructивным методом, позволяющим работать с очень фрагментарным материалом, что особенно важно с учетом уни-



а



б

Рис. 5. Виртуальные срезы рентгеновской микротомограммы с определением величины остеонов: а – виртуальный срез во внешней (проксимальной) части метафиза; б – виртуальный срез в области диафиза

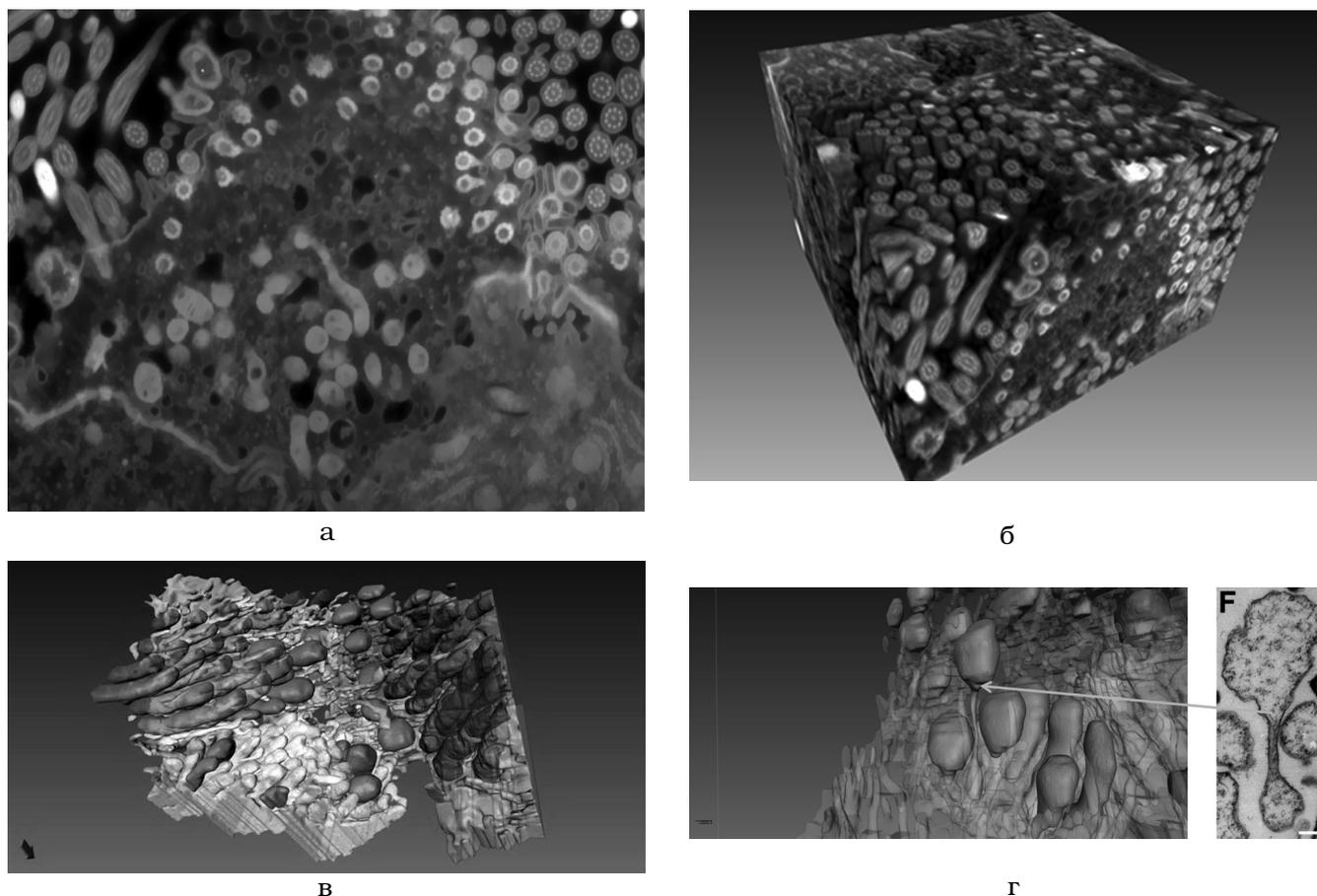


Рис. 6. Объемная реконструкция клеточных структур и микрофлоры эпителия трахеи мыши: а – срез препарата эпителия трахеи (растровая электронная микроскопия); б – трехмерная реконструкция объема на основе серии снимков срезов; в – ультраструктура эпителия (цилии и микроворсинки двух типов), колонии бактерий на поверхности эпителия; г – фрагмент сегментированной реконструкции, на котором отмечен процесс почкования бактерий (*bacterial budding*). Снимок справа – данные просвечивающей электронной микроскопии, Wang Y et al. 2004

кальности исследуемых объектов и степени их сохранности [5] (рис. 5).

3. Объемная реконструкция клеточных структур и микрофлоры эпителия трахеи мыши

Препарирование и съемка последовательных срезов ткани эпителиального пласта трахеи крысы производились аналогично методике, представленной в п. 2 краткого описания экспериментальных методик.

В результате выполненных 3D-реконструкций получена информация о пространственной геометрии реснитчатых клеток эпителиального пласта трахеи крысы, визуализированы внутриклеточные структуры, реконструировано тонкое строение субмикроскопических деталей поверхности эпителия трахеи – ресничек и микроворсинок [4]. При рекон-

струкции микрообъема эпителия в нескольких случаях в непосредственной близости с ресничками и в апикальной части клеток эпителиальной выстилки были идентифицированы бактериальные тела. 3D визуализация микроорганизмов, взаимодействующих с эпителиальными ресничками и эпителиальными клетками дает представление о защитной функции слизистой оболочки трахеи в отношении бактериальной инфекции (рис. 6).

4. Объемная микроскопия поверхности металла, пораженной биокоррозией

Как показано в [6], некоторые микроорганизмы способны вызвать особенно “злокачественный” и агрессивный питтинг даже на сплавах, которые считаются коррозионно-устойчивыми при нормальных условиях. Трехмерная реконструкция биокорродированной

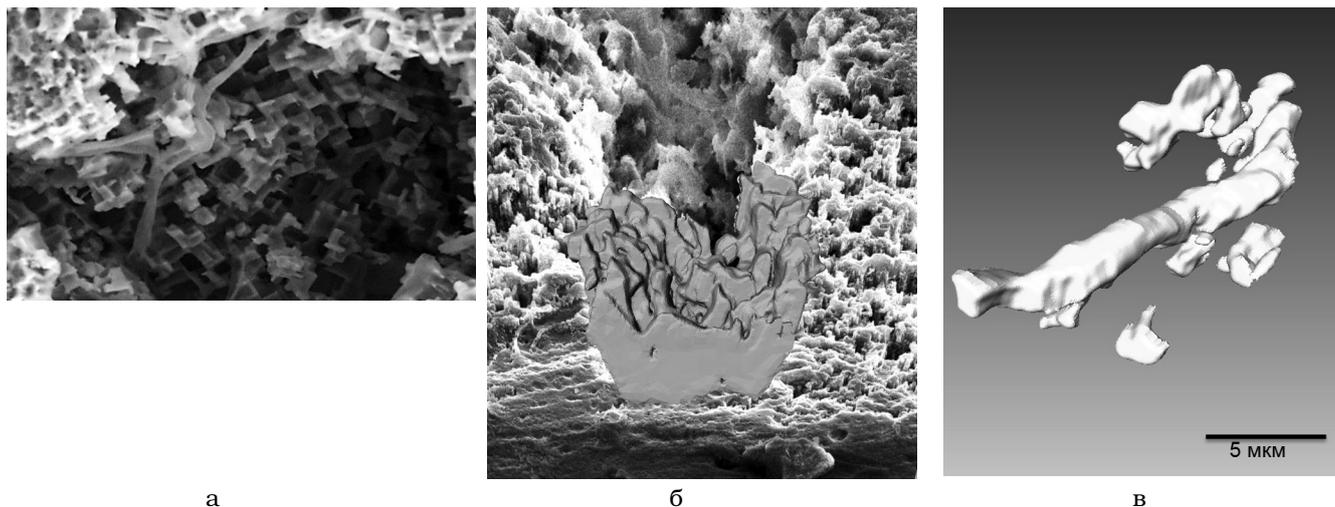


Рис. 7. Биогенные поры: а – зона питтинга на сплаве АМg6 с мицелием *Ulocladium Botrytis*; б – зона питтинга на сплаве АМg6, результат трехмерной реконструкции, наложенный на изображение одного из последовательных поперечных сечений, сделанных с шагом 0,5 мкм; в – реконструкция отдельного канала и пор

поверхности была предпринята с целью продемонстрировать степень и особый характер коррозионных дефектов поверхности алюминий-магниевого сплава АМg6, зараженного грибом. Реконструкция производилась на основании серии изображений поперечных сечений питтинговой каверны, полученных на двухлучевой системе FIB/SEM.

Серия из 100 последовательных изображений поперечных сечений корродированной поверхности с помощью специального программного обеспечения была преобразована в объемную реконструкцию размером 40×40×50 мкм.

Результаты реконструкции демонстрируют сильно развитую поверхность с глубокими подповерхностными каналами и порами (рис. 7). Эта сложная объемная структура коррозионных повреждений формируется, по-видимому, благодаря глубокому проникновению микроорганизмов внутрь питтинговой каверны.

Выводы

- ✓ Данные объемной микроскопии дополняют и расширяют возможности традиционных методов морфологических исследований, таких как конфокальная световая микроскопия.
- ✓ Морфологические исследования тканей, клеточных и субклеточных структур традиционно выполняются на тонких срезах пре-

паратов тканей. Однако в последнее время новые методы объемной микроскопии и 3D-гистологии все чаще применяются для мультимасштабной структурной визуализации, поскольку обеспечивают более полную морфологическую картину препарата, отображая пространственное соотношение элементов структуры в разном масштабе – от органов до клеток и ультраструктур.

- ✓ Мультимасштабная объемная характеристика биологических объектов на основе корреляции данных рентгеновской микротомографии и FIB/SEM-томографии позволяет исследовать наноразмерные ультраструктуры в контексте микро- и макроструктурных особенностей образца.
- ✓ Объемная микроскопия позволяет проводить количественный волюметрический и морфометрический анализ микро- и наноразмерных деталей структур, а также моделировать функциональные процессы (капиллярные процессы, перфузия, газообмен и пр.) в трехмерной реконструкции реальных биологических объектов.
- ✓ В перспективе планируется разработка новых методик мультимасштабной объемной микроскопии применительно к биологическим объектам на основе принципов корреляционной микроскопии, а также применение методов трехмерной визуализации в области криомикроскопии, микроскопии естественной среды и электронной микротомографии.

Список литературы

1. Uranova N., Shklover V., Vikhрева O. et al. Ultrastructural alterations of myelinated fibers and oligodendrocytes in schizophrenia. // Eur. Arch. Psychiatry + Clinical Neurosci., 2013, **263**, Supplement 1, S-29-001.
2. Shklover V., Uranova N., Chelpanov V. et al. Correlative multiscale volume microscopy of white matter cell structures in post-mortem samples of human brain. // Eur. Arch. Psychiatry + Clinical Neurosci., 2013, **263**, Supplement 1, O-01-005.
3. Shklover V., Uranova N., Chelpanov V. et al. Correlative multiscale volume microscopy of white matter cell structures in post-mortem samples of human brain. // EMBO/EMBL Abstracts of Symposium Seeing is Believing - Imaging the Processes of Life. 3–6 October 2013, P. 231.
4. Целуйко С.С., Вислобоков Н.А., Казанский П.Р. и соавт. Новый метод изучения ультраструктурной пространственной организации покровного эпителия слизистой оболочки трахеи. // Бюлл. физиол. и патол. дыхания, 2012, № 45, С. 52–56.
5. Медникова М.Б., Добровольская М.В., Виола Б. и соавт. Радиологическая микроскопия фаланги руки девочки из Денисовой пещеры. // Археология, этнография и антропология Евразии, 2013, № 3, С. 120–125.
6. Shklover V., Alyokhova T., Kazanskiy P. et al. Microbially influenced bio-corrosion on Al – Mg AMG6 alloy. // Proc. of 15th Eur. Conf. on Applications of Surface and Interface Analysis 2013, ECASIA'13. Forte Village Resort, Sardinia, Italy, October 13–18, 2013.

MULTISCALE VOLUME MICROSCOPY: APPLICATION TO BIOMEDICAL STUDIES

V.Ya. Shklover, P.R. Kazanskiy

Systems for Microscopy and Analysis LLC, Skolkovo, Russia

Volume microscopy and 3D visualization techniques provide volume structure images of macro, micro and nano objects, which helps us better understand spatial relations of structural elements on different scales on a most complete morphological picture – from an organ through cell to subcellular ultrastructures. We present several cases of applying multiscale volume microscopy techniques to study biomedical objects.

Key words: *multiscale volume microscopy, volume reconstruction, volumetric analysis, microscopy, X-Ray MicroCT, FIB/SEM, Slice&View*

E-mail: microscop@microscop.ru