

Роль современной электронной микроскопии в изучении живой природы

*Ахметова А.И., инженер МГУ имени М.В. Ломоносова,
Мешков Г.Б., научный сотрудник МГУ имени М.В. Ломоносова,
Яминский И.В., профессор МГУ имени М.В. Ломоносова,
Yaminsky@nanoscopy.ru*

Аннотация: Настоящая статья была запланирована в начале лета 2017 года. Тогда мы еще не знали, что Нобелевский комитет так высоко оценит достижения в области криогенной электронной микроскопии[1]. Как было сказано в пресс-релизе Нобелевского комитета о вручении премии по химии: «Картинка – это ключ к пониманию. Научные прорывы часто основываются на успешной визуализации объектов, невидимых для человеческого глаза».

Ключевые слова: криогенная электронная микроскопия, сканирующая зондовая микроскопия, вирус гриппа А, вирус бешенства, эритроцит, биосенсор, проточная жидкостная ячейка.

The Role of Modern Electron Microscopy in the Study of Living Nature

*A.I. Akhmetova, Engineer of Lomonosov Moscow State University,
G.B. Meshkov, Researcher of Lomonosov Moscow State University,
Yaminsky I.V., Professor of Lomonosov Moscow State University,
Yaminsky@nanoscopy.ru*

Abstract: This article was planned in early summer of 2017. At that time, we did not yet know that the Nobel Committee would so highly appreciate the achievements in the field of cryo-electron microscopy. As it was said in the press release of the Nobel Committee about the awarding of the Chemistry Prize: «A picture is a key to understanding. Scientific breakthroughs often build upon the successful visualisation of objects invisible to the human eye».

Key words: cryo-electron microscopy, scanning probe microscopy, influenza A virus, rabies virus, erythrocyte, biosensor, flowing liquid cell.

Роль современной электронной микроскопии в изучении живой природы

Криогенная электронная микроскопия живых клеток и сканирующая зондовая микроскопия являются взаимно дополняющими методами. Криогенная электронная микроскопия позволяет легко заглянуть внутрь замороженной клетки, а зондовая дает детальную информацию о структуре поверхности. В криогенной микроскопии можно замораживать клетку на различных этапах её развития, а зондовая позволяет снимать реальное кино, происходящее с клетками в физиологически приятной для них среде – на воздухе и в жидкости.

В своей деятельности по изучению биологических объектов мы объединяем оба метода: электронную и зондовую микроскопии.

В частности, для вирусологии электронная микроскопия позволяет воочию увидеть вирус гриппа А и вирус бешенства.

Изображения вирусов гриппа штаммов H4N6 и H3N6 представлены на рис. 1 и 2.

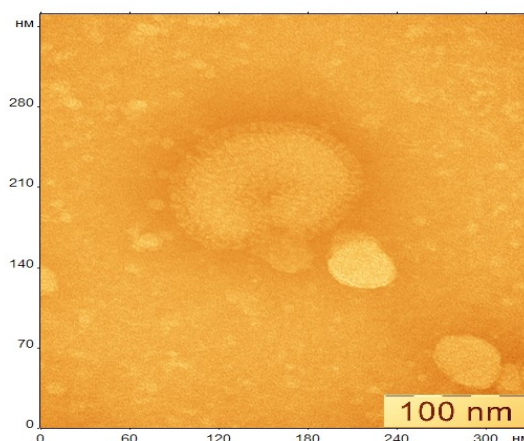


Рис. 1. Изображение вируса гриппа H3N6, полученное на просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB

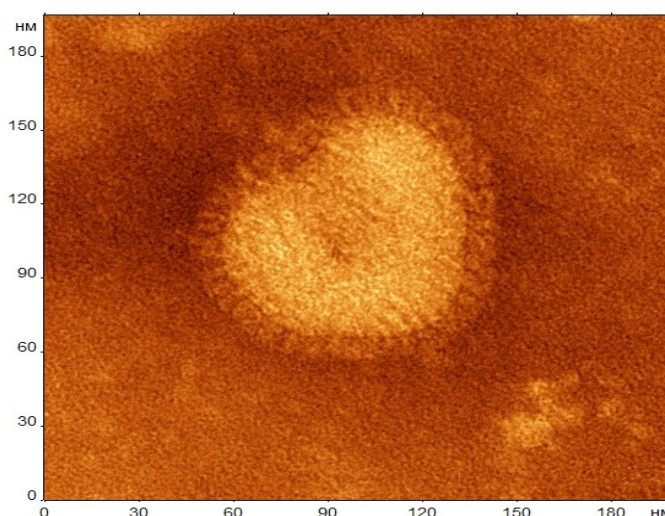


Рис. 2. Изображение вируса гриппа H4N6, полученное на просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB

В экспериментах мы использовали ослабленный формальдегидом вирус гриппа H3N6 и H4N6, предоставленный Институтом полиомиелита вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова [1].

Благодаря полученным кадрам, мы можем рассмотреть липопротеидную оболочку, на поверхности которой расположены гемагглютинин (H) и нейраминидаза (N).

Просвечивающая электронная микроскопия позволяет увидеть отдельные вирусные частицы в вакууме с разрешением, обеспечивающим наблюдение структуры наружной мембраны вируса [1].

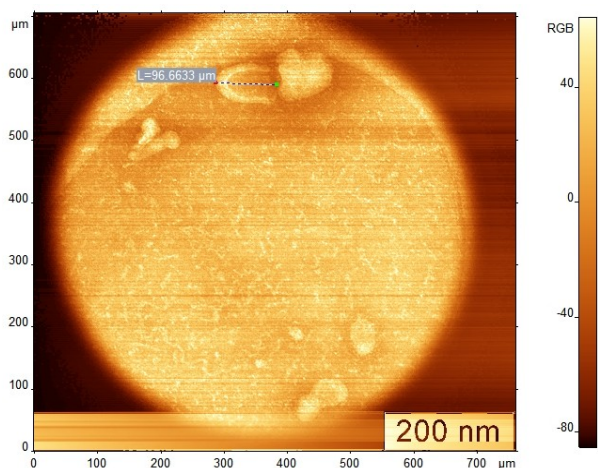


Рис.3. Изображение вируса бешенства. Просвечивающий электронный микроскоп LEO 912AB. Обработка в ПО «ФемтоСкан Онлайн» [1].

В рамках исследования концентрированной культуральной антирабической вакцины нами проводилось подробное изучение изменений оболочки вируса бешенства. Вирус представляет собой частицу пулевидной формы, внутри гликопротеиновой оболочки располагается рибонуклеопротеин. Сначала образец вакцины нанесли на медную сетку для просвечивающей электронной микроскопии, затем обработали фосфорно-вольфрамовой кислотой и подсушили.

В результате исследования был осуществлен подсчет количества вирионов в мл вакцины, а также были изучены структурные особенности оболочки вируса в процессе создания вакцины.

Одним из самых больших недостатков электронной микроскопии является невозможность работы с живыми клетками в естественной среде, поэтому для этих целей мы используем сканирующую зондовую микроскопию.

С помощью сканирующей зондовой микроскопии нами было проведено наблюдение эритроцитов. На рисунке 4а приведено изображение эритроцита в норме. Представленные эритроциты были предварительно подвергнуты электропорации. Благодаря применению СЗМ впервые удалось увидеть характер образовавшихся пор на их поверхности [5]. На увеличенном изображении фрагмента мембраны эритроцита отчетливо видны отдельные поры размером в 30-40 нм (рис. 4б).

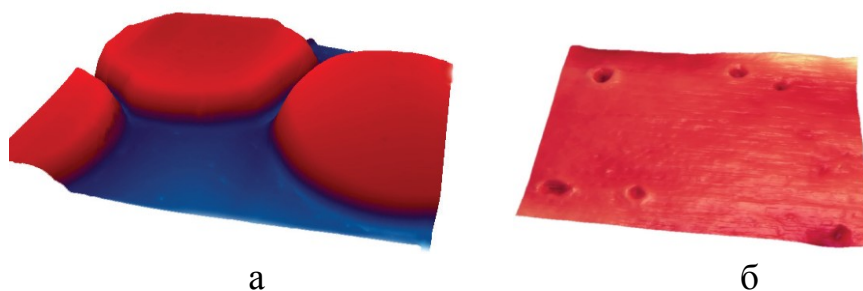


Рис. 4. Изображения: а) эритроцитов и б) фрагмента участка мембраны эритроцита с порами, образованными в результате электропорации. Изображения получены с помощью СЗМ ФемтоСкан

Как правило, наблюдение объектов в зондовой микроскопии требует очень тщательной и щепетильной пробоподготовки, но в данном случае наблюдение эритроцита относится к исключительному случаю, когда не требуется предварительная очистка исследуемого образца [6].

Таким образом, оба метода – и электронная микроскопия, и сканирующая зондовая – дают возможность визуализировать морфологию биообъектов, оценить особенности структуры и могут прекрасно друг друга дополнять.

Визуализация биологических объектов – вирусов и клеток – имеет важное познавательное значение. Другой существенный аспект – это использование этих методов для визуализации процессов инфицирование клетки вирусными частицами. Опасен данный штамм вируса гриппа конкретному человеку или нет, можно выяснить по наблюдению за одной клеткой. Начальный этап инфицирования часто происходит за счет взаимодействия сиаловых кислот эпителиальных клеток носоглотки с гемагглютинином вируса гриппа А. В результате этого взаимодействия вирус попадает внутрь клетки. Инфекция развивается. Наблюдая за отдельной клеткой в лабораторных условиях – клеткой эпителия или, что проще, за отдельным эритроцитом – можно ответить на вопрос, опасен этот вирус человеку или нет.

Методы электронной и зондовой микроскопии, обладая уникальной чувствительностью и пространственным разрешением при наблюдении вирусов, позволяют проводить раннее обнаружение вирусных частиц в окружающей среде. Важным этапом такого метода является создание биоспецифических биосенсоров, избирательно осаждающих из биологических жидкостей на своей поверхности вирусные частицы [7]. Если этот этап проведен надлежащим образом, то последующая операция наблюдения и подсчета вирусных частиц с помощью электронного или зондового микроскопа становится рутинной операцией, легко поддающейся автоматизации.

Заражение вирусом гриппа А происходит воздушно-капельным путем. При кашле и чихании больной человек может отправлять в окружающую среду десятки тысяч и миллионы вирусных частиц. При этом капельки жидкости с вирусом, имеющие диаметр около 4 мкм, могут находиться в воздухе в течение многих часов. Такие микрокапли представляют существенную угрозу для здорового человека. Вдыхание капель, содержащих вирус, может привести к инфекционному заболеванию.

Для раннего обнаружения вирусных частиц в воздухе может помочь электронная и зондовая микроскопия. На первом шаге необходимо собрать капли жидкости из воздуха. Для этого воздушный поток можно направить на охлажденную поверхность элемента Пельтье и заморозить на его поверхности капли, содержащие воду и вирусы. После оттаивания собранной из воздуха жидкой смеси вирусные частицы следует осадить на сенсорную поверхность. Используя оригинальную конструкцию проточной жидкостной ячейки для сканирующего зондового микроскопа, процесс адгезии вирусных частиц на сенсорной поверхности можно наблюдать в режиме реального времени [7,8]. Одновременно с наблюдением вирусных частиц с помощью программного обеспечения ФемтоСкан Онлайн осуществляется подсчет числа вирусных частиц в поле зрения в зависимости от времени.

Таким образом, электронная и зондовая микроскопия становятся практическим инструментом медицинской диагностики вирусной инфекции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 15-04-07678).

Библиография

1. «The Nobel Prize in Chemistry 2017». Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 10 Oct 2017. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/
2. Ахметова А., Яминский И. Раннее обнаружение вирусов и бактерий с использованием методов нанотехнологий // *Наноиндустрия*. — 2017. — Т. 71, № 1. — С. 70–74.
3. Обнаружение вирусов и бактерий в сканирующей зондовой микроскопии / А. Ахметова, Г. Мешков, И. Назаров и др. // *Наноиндустрия*. — 2016. — Т. 69, № 7. — С. 80–85.
4. Яминский И., Филонов А., Симицына О., Мешков Г. // Программное обеспечение «ФемтоСкан Онлайн» // *Наноиндустрия*, 2(64), 42-46 (2016).
5. А. И. Ахметова, Г. Б. Мешков, О. В. Симицына, И. В. Яминский. Сканирующая зондовая микроскопия в медицине. *Медицина и высокие технологии*, (4):16–19, 2016.
6. Яминский И., Ахметова А., Назаров И. Детектирование вируса гриппа А с применением пьезокерамических кантилеверов // *Медицина и высокие технологии*. — 2017. — Т. 1. — С. 5–9.
7. Соснин В.С., Ахметова А.И., Яминский И.В., Яминский Д.И., Мешков Г.Б., Оленин А.В. Проточная жидкостная ячейка для сканирующей зондовой микроскопии // Заявка № 2016146597 от 29.11.2016.
8. Соснин В.С., Ахметова А.И., Яминский И.В., Яминский Д.И., Мешков Г.Б., Оленин А.В. Проточная жидкостная ячейка для сканирующей зондовой микроскопии // Заявка № 2016146599 от 29.11.2016.

Библиографическая ссылка: Ахметова А.И., Мешков Г.Б., Яминский И.В. Роль современной электронной микроскопии в изучении живой природы // *НБИКС: Наука. Технологии*. 2017. Т.2, №2, стр. 169-173

Article reference: Akhmetova A.I., Meshkov G.B., Yaminsky I.V., The Role of Modern Electron Microscopy in the Study of Living Nature // *NBICS: Science. Technology*. 2017. Vol. 2, No. 2, pp. 166-173