

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 57.086.8

## Криоконвейерные протоколы в корреляционной световой и электронной микроскопии: от многоуровневой визуализации до моделирования биофизических эффектов и «криотераностики»

О.В. Градов<sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова,  
Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4;

<sup>2</sup>Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, Российская академия наук,  
Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

\*e-mail: o.v.gradov@gmail.com

Данная статья может рассматриваться как технико-методическая заметка, целью которой является внедрение в практику биологических исследований методов криомикроскопии в конвейерном режиме, начиная с малых увеличений и заканчивая пределами увеличения/разрешения сканирующей электронной криомикроскопии (scanning electron cryomicroscopy, CryoSEM). Описываемый протокол может быть применен на образцах с малой сложностью пробоподготовки, без ультратомии и проводки, свойственной методам просвечивающей криоэлектронной микроскопии. В рамках данного протокола анализ образцов производится в единой микрокювете (чипе), последовательно перемещаемой от инструментов оптической микроскопии низкого разрешения (таких, как безлинзовые криомикроскопы) на уровень CryoSEM/CryoESEM (environmental scanning electron microscope – криоэлектронной микроскопии в программируемых средах/атмосферах). Были внедрены и апробированы методы: корреляционной безлинзовой криомикроскопии и CryoSEM (в том числе, с последовательным переходом к микроанализу на волнодисперсионном рентгеновском спектрометре на круге Роуланда); микроскопии и микроинтерферометрии в диапазонах от инфракрасного до дальнего ультрафиолетового. Преимущество протокола криоконвейерного анализа состоит в: обеспечении сохранности образца в единой переносимой кювете при возможности установления пространственной колокализации данных оптической и электронной микроскопии с использованием программного обеспечения для распознавания образов (вплоть до индексирования в лабораторной информационной системе – laboratory information system, LIS) при проведении полного комплекса криомикроскопических изысканий. При этом предоставляется возможность обеспечения комплексного неразрушающего анализа при последовательном исследовании микроскопических систем с возможностью варьирования последующих стадий микроскопии высокого разрешения, в зависимости от результатов, полученных на предшествующих стадиях микроскопии (более низкого разрешения).

**Ключевые слова:** *CryoSEM, CLEM, CryoCLEM, ESEM, CryoESEM, ASEM, безлинзовая криомикроскопия*

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-10

Основной фокус методов исследований в современной структурной биологии смещен в сторону просвечивающей криоэлектронной микроскопии (cryoTEM, transmission electron cryomicroscopy) и электронной криотомографии (cryo-ET, cryogenic electron tomography) на уровень одиночных макромолекул, кристаллов и супрамолекулярных ансамблей, но это не умаляет значения других методов криомикроскопии в науках о жизни (*sensu lato*).

В связи с этим необходимо обеспечение стабильности поддержания температуры в этих методах или сериях методов, связанных в отдельные протоколы криомикроскопии (даже в случаях, когда до криоэлектронной микроскопии сверхвысокого разрешения протоколы не доходят, в силу ограниченности задачи исследований и визуализации более крупными масштабами, свидетельствующими о клеточных изменениях на микроструктурном

уровне, элементарно достигавшемся более 30 лет назад [1]).

К таким методам можно отнести как методы сканирующей криоэлектронной микроскопии (CryoSEM, scanning electron cryomicroscopy), в том числе – с программируемой средой или атмосферой (cryoESEM, cryogenic environmental scanning electron microscopy / cryoASEM, cryogenic atmospheric scanning electron microscopy [2, 3]), так и различные методы оптической криомикроскопии. В качестве примеров широкого распространения и высокой (параллельной или последовательной) интегрируемости методов оптической криомикроскопии, представляющих, по нашему мнению, широкий интерес для биологов [4, 5], можно привести:

1) рамановскую криомикро(спектро)скопию и конфокальную рамановскую криомикроскопию [6, 7];

2) интегрированные методы инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR, fourier-transform infrared spectroscopy) и оптической или лазерной конфокальной сканирующей криомикроскопии [8, 9];

3) многофотонную криомикроскопию [10];

4) интегрированные синхротронные криопротоколы с анализом дифракции синхротронного излучения [11];

5) методы криомикроскопии неоптического спектрального диапазона, в том числе в ультрафиолетовом и вакуумном ультрафиолетовом диапазонах (UV/VUV) [12, 13];

6) криомикроскопию, интегрированную с дифференциальной сканирующей калориметрией (DSC, differential scanning calorimetry) [14];

7) интегрированную криопресервацию в различных средах и криоосмометрию данных сред, в том числе – с картированием состояния образца в данной среде [15–17];

и др.

Учитывая разнообразие и распространение методов оптической микроскопии и их интегрируемость с CryoSEM, как в случае корреляционной световой и электронной криомикроскопии (CryoCLEM, cryogenic correlative light and electron microscopy), так и в последовательных реализациях, нами предложена и позднее испытана система «Криоконвейер» (данное название было новым, так как первая работа с подобным названием для другой системы появилась позже [18]). В рамках данного протокола анализ образцов производится в единой микрокювете-криочипе (в перспективе – «лаборатории на чипе» для ESEM), индексируемой лабораторной информационной системой (LIS, laboratory information system) и последовательно перемещаемой от неразрушающих инструментов оптической микроскопии низкого разрешения (таких, как безлинзовые криомикроскопы) и оптического сверх-

разрешения (некоторые микроинтерферометры и микроскопы типа МИМ с криостолом) на уровень CryoSEM/CryoESEM (в программируемых средах и атмосферах).

В период до 2019 г. был осуществлен ряд попыток реализации этого принципа как по последовательной, так и по параллельной схеме (CryoCLEM). Последняя включала в себя совмещение CryoSEM с оптической микроскопией на микроскопах с криосистемами путем модификации оптической схемы встроенного в колонну оптического микроскопа для позиционирования рентгеновского микроанализатора (какие встраивались также и на полноценных микрозондовых рентгеноспектральных анализаторах Camebax до 1990-х гг.). В частности, были внедрены методы корреляционной безлинзовой криомикроскопии и сканирующей электронной микроскопии (в том числе, с последовательным переходом к микроанализу и YMD (modulated detection methods) – методу трехмерной визуализации на принципах Y-модулированного детектирования); методы криогенной корреляционной электронной и оптической микроскопии в ультрафиолетовом В и С (CryoCUEM – cryogenic correlative ultraviolet and electron microscopy) и инфракрасном (CryoCIEM – cryogenic correlative infrared and electron microscopy) диапазонах соответственно, однако последние оказались малоинформативными для охлаждаемых биологических систем; методы интерферометрии с использованием многолучевого интерферометра отраженного света (на платформе микроинтерферометра МИИ-11 с конструктивными изменениями; разработка не была завершена); инициирована разработка систем CryoCDICEM (схема криогенной корреляционной оптической и электронной микроскопии с использованием оптики Номарского, метод дифференциального интерференционного контраста) на основе оптического тракта инвертированного металлографического микроскопа с приставкой для дифференциального интерференционного контраста и доступным спектрально-светодиодным излучателем (опытно-конструкторские работы не завершены, вследствие уничтожения инфраструктуры, связанного с реорганизацией институтов и передачей площадей) [19].

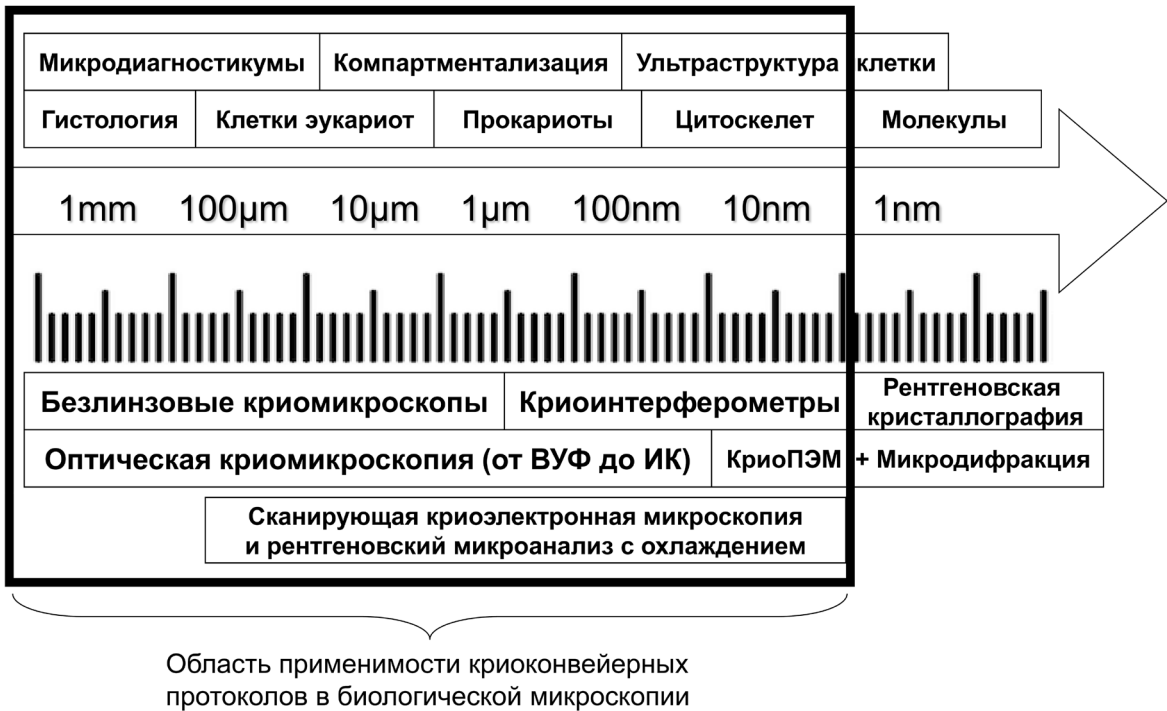
Преимущество протоколов криоконвейерного микроанализа состоит в обеспечении сохранности образца в единой кювете и возможности установления пространственной колокализации между данными оптической и электронной микроскопии (в том числе, в CLEM и CryoCLEM-режиме), а также в обеспечении при последовательном исследовании структур неразрушающего анализа микроскопических систем (достигаемого также путем использования низковакуумных ASEM/ESEM принципов организации экспери-

ментальной схемы, в противовес применявшимся с 1980-х гг. высоковакуумным и высоковольтным/сверхвысоковольтным техникам криомикроскопического анализа клеток [20, 21]). При этом реализуется варьирование последующих стадий микроскопии высокого разрешения, в зависимости от результата, полученного на предшествующих стадиях микроскопии более низкого разрешения. Схема серийного протокола «Криоконвейер» представлена на рис. 1.

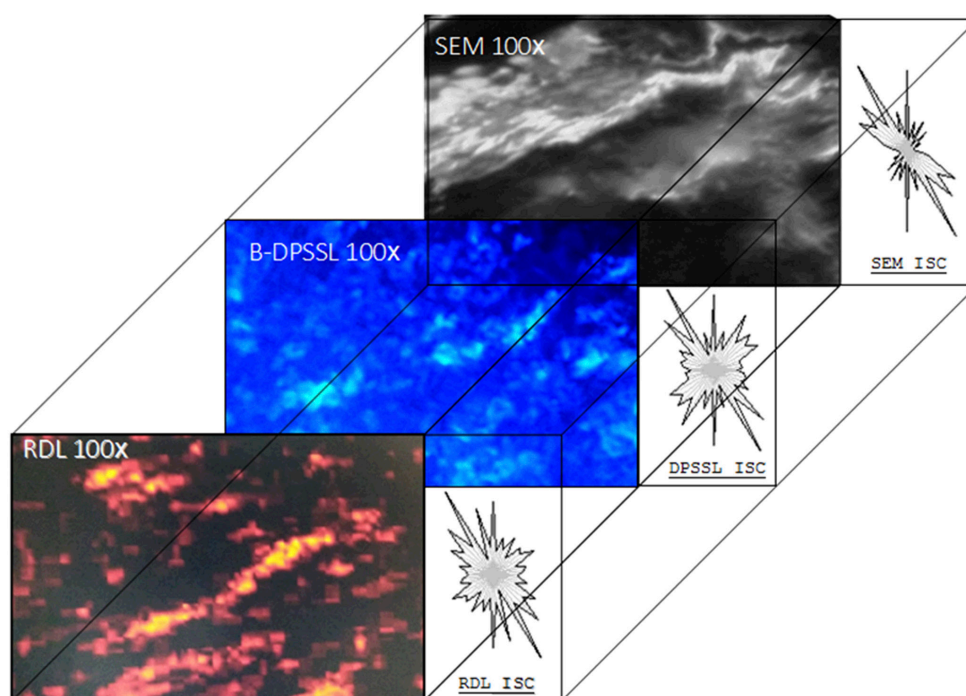
При криоконвейерных измерениях создается иерархическая система данных с различными ко-локализуемыми физическими (оптическими и неоптическими) дескрипторами, характеризующими образец в ходе его анализа, в том числе – в динамике при воздействии электронного либо оптического (ультрафиолетового) пучка на криостатируемый образец. Последнее позволяет отделить по ходу эксперимента следствия термического и нетермического воздействия на образец. Этот подход явно имеет смысл в биофизике, при-

чем не только для «сверхнизкотемпературного», но и для «высокотемпературного» криобиологического интервала.

В частности, возможны и реализуемы на практике способы подачи в камеру CryoCLEM лазерных пучков с заданными длинами волн через иллюминатор встроенного оптического микроскопа, обеспечивающего позиционирование образца для рентгеновского микроанализа (вместо лампы накаливания), что дает возможность оптического воздействия на криопрепарат в задачах моделирования отклика тканей на фотодинамическую терапию и апробации будущих трендов биофотоники и тераностики на клеточном и тканевом уровне организации (что соответствовало задачам, *de facto*, решавшимся коллективом, в котором работал автор). Пример колокализации/корреляции изображений, полученных с использованием двух лазерных источников и сканирующего электронного микроскопа приводится на рис. 2.



**Рис. 1.** Применимость различных по пространственному разрешению методов микроскопии в рамках протокола «Криоконвейер», интегрированного с лабораторной информационной системой для обеспечения анализа колокализации и изменений образца во времени и при переносе по линии измерений. Изначально для структур от 1 мм до единиц микрон осуществляется безлинзовая криомикроскопия и обычные криооптические методы микроанализа в охлаждаемой кювете – от инфракрасного до ультрафиолетового диапазона. В диапазоне размеров порядка десятков микрометров и менее становится актуальной SEM (scanning electron microscopy, сканирующая электронная микроскопия)/CryoSEM (включая включая рентгеновский микроанализ с охлаждением – CryoEDX, регистрацию токов, наведенных электронным пучком, с охлаждением – CryoEBIC и трехмерно-отображающий комплекс методов Y-модулированного детектирования, YMD (Y-modulated detection methods) в криогенной микроскопии – CryoYMD), реализуемая на том же образце. В диапазоне много менее микрона целесообразным является коррелирование данных CryoSEM с данными криоинтерференционных техник/«криомикроинтерферометрии», используемыми, например, для анализа поверхностных свойств биологических клеток (например, микрошероховатости и наношероховатости в статическом криофиксированном состоянии, что при сопоставлении с методами YMD/CryoYMD заменяет современные методы профилометрии и зондовой микроскопии). В области перекрытия с диапазоном CryoTEM (transmission electron cryomicroscopy просвечивающей криоэлектронной микроскопии) этот комплекс методов («Криоконвейер») не является актуальным, так как чип, в котором может осуществляться исследование, а также способы пробоподготовки для TEM и SEM качественно отличаются, как и характерные размеры образца.



**Рис. 2.** Пример поиска-выявления идентичных структур и установления колокализации их на электронной микрофотографии и двух оптических изображениях. В отличие от старых лазерных источников, компактные красные диодные лазеры ( $\lambda = 635$  нм, на рисунке — RDL) и твердотельные фиолетовые лазеры с диодной накачкой ( $\lambda = 405$  нм, на рисунке — B-DPSSL), используемые в флуоресцентных методах визуализации, удобно интегрировать с оптическими микроскопами и камерами в CryoSEM. Для установления соответствия микроизображений сканирующей электронной (SEM) и оптической микроскопии можно пользоваться методами корреляционно-спектрального анализа: рядом с сопоставляемыми микрофотографиями приведены их ISC (integral spatial characteristics, интегральные пространственные характеристики), полученные на основе двумерного преобразования Фурье (2D FFT, 2D fast Fourier transform). Можно видеть, что ориентации структур на данных микрофотографиях подобны, как следует из эмуляции дифракции лазерного пучка на них.

Для установления соответствия микроизображений сканирующей электронной и оптической микроскопии можно пользоваться методами корреляционно-спектрального анализа: рядом с сопоставляемыми микрофотографиями приведены их ISC (integral spatial characteristics, интегральные пространственные характеристики), полученные на основе двумерного преобразования Фурье (2D FFT, 2D fast Fourier transform). Можно видеть, что ориентации структур на микрофотографиях (рис. 2) подобны, как следует из эмуляции дифракции лазерного пучка на них. С позиций многоканального корреляционно-спектрального анализа изображений, это говорит о правдоподобии гипотезы о соответствии структур на коррелируемых таким образом изображениях. Полное соответствие при этом недостижимо, в силу различно-

сти спектральных свойств образцов в используемых спектральных диапазонах.

Более подробное изложение аннотированных в данном кратком сообщении методов и техник планируется в статьях автора ближайших лет.

Работа выполнена без финансовой поддержки от государственных фондов за счет собственных средств автора. Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов и благодарит коллег и студентов из МГУ, Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семенова и Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН за участие в апробации методов корреляционной микроскопии и криомикроскопии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holt W.V., Head M.F., North R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.* 1992;46(6):1086–1094.
2. Gradov O.V., Gradova M.A. Cryo-electron microscopy as a functional instrument for systems biology, struc-

tural analysis and experimental manipulations with living cells. A comprehensive analytical review of the current works. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2014;24(3):193–211.

3. Gradov O.V., Gradova M.A. Methods of electron microscopy of biological and abiogenic structures in artificial gas atmospheres. *Surf. Eng. Appl. Electrochem.* 2016;52:117–125.

4. Hauptmann A., Hoelzl G., Loerting T. Optical cryomicroscopy and differential scanning calorimetry of buffer solutions containing cryoprotectants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021;163:127–140.
5. Stott S.L., Karlsson, J.O. Visualization of intracellular ice formation using high-speed video cryomicroscopy. *Cryobiology.* 2009;58(1):84–95.
6. Terada N., Ohno N., Saitoh S., Ohno S. Application of “in vivo cryotechnique” to detect erythrocyte oxygen saturation in frozen mouse tissues with confocal Raman cryomicroscopy. *J. Struct. Biol.* 2008;163(2):147–154.
7. Yu G., Li R., Hubel A. Raman Cryomicroscopic Imaging and Sample Holder for Spectroscopic Subzero Temperature Measurements. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 2180. Eds.: W.F. Wolters and H. Oldenhof. N.Y.: Humana; 2021:351–361.
8. Tanino K., Liu J., Kobayashi S., Kawamura Y., Borondics F., Uemura M. Using synchrotron FTIR and confocal cryomicroscopy to explore mechanisms of cold acclimation and freezing resistance using a single cell layer of *Allium fistulosum* L. *Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World*. Eds. R. Imai, M. Yoshida and N. Matsumoto. N.Y.: Springer; 2013:165–177.
9. Wolters W., Diekmann U., Mueller T., Spindler R., Glasmacher B. Cryomicroscopy and FTIR studies on mouse embryonic fibroblast feeder cells during cryopreservation. *Hum. Gene Ther.* 2009;20(11):1434.
10. König K., Uchugonova A., Breunig H.G. High-resolution multiphoton cryomicroscopy. *Methods.* 2014;66(2):230–236.
11. Buleon A., Bizot H., Le Bail P., Paris M., Putaux J.L. New approaches to starch structure including cryomicroscopy and synchrotron diffraction. *2001 IFT Annual Meeting (New Orleans, Louisiana, U.S.A., June 23–27, 2001). Technical Program & Book of Abstracts*. Institute of Food Technologists. 2001.
12. Rousseau A., Valvin P., Desrat W., Xue L., Li J., Edgar J.H., Cassabo G., Gil B. Bernal boron nitride crystals identified by deep-ultraviolet cryomicroscopy. *ACS Nano.* 2022;16(2):2756–2761.
13. Valvin P., Pelini T., Cassabo G., Zobelli A., Li J., Edgar J.H., Gil B. Deep ultraviolet hyperspectral cryomicroscopy in boron nitride: Photoluminescence in crystals with an ultra-low defect density. *AIP Adv.* 2020;10(7):075025.
14. Mehl P.M. Cryomicroscopy as a support technique for calorimetric measurements by DSC for the study of the kinetic parameters of crystallization in aqueous solutions: Part 1. Nucleation in the water-2-propanediol system. *Thermochim. Acta.* 1992;203:475–492.
15. Müller T., Guggenheim R., Düggelin M., Lüönd G. Online cryopreparation and cryomicroscopy in SEM with SCU 020. *Electron Microscopy 1986. Proc. XIth Congr. Electron Microscopy*. Ed. H. Imura, S. Maruse and T. Suzuki. Japanese Society of Electron Microscopy; 1986:2233–2234.
16. Liu Z. *An integrated finite element modeling / cryomicroscopy investigation of osmotic environment and ice structure during freezing of tissues*. University of Calgary (Canada). 2003. doi: 10.11575/PRISM/21558.
17. Cosman M.D., Toner M., Kandel J., Cravalho E.G. An integrated cryomicroscopy system. *Cryo-Lett.* 1989;10(1):17–38.
18. Katiyar N.K., Biswas K., Tiwary CS. Cryomilling as environmentally friendly synthesis route to prepare nanomaterials. *Int. Mater. Rev.* 2021;66(7):493–532.
19. Gradov O.V. Novel perspectives for CLEM techniques in multiparametric morphology protocols. *Int. J. Biomed.* 2019;9(Suppl. 1):35. <https://ssrn.com/abstract=3457825>
20. O'Toole E., Kremer J., McIntosh J.R. HVEM cryomicroscopy of human blood-platelets. *Mol. Biol. Cell.* 1992;3:A63.
21. O'Toole E., Wray G., Kremer J., McIntosh J.R. High voltage cryomicroscopy of human blood platelets. *J. Struct. Biol.* 1993;110(1):55–66.

Поступила в редакцию 09.07.2023

После доработки 25.09.2023

Принята в печать 26.09.2023

## SHORT COMMUNICATION

# Cryoconveyor protocols in correlation light and electron microscopy: From multilevel imaging to modeling of biophysical effects and “cryotheranostics”

O.V. Gradov 

<sup>1</sup>N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
4–1 Kosygina, Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina st., Moscow, 119334, Russia  
\*e-mail: o.v.gradov@gmail.com

This paper is a technical and methodological note, the purpose of which is to introduce into the practice of biological research methods of cryomicroscopy in a conveyor mode, starting from small magnifications and ending with the limits of magnification/resolution of scanning electron cryomicroscopy. The protocol described can be applied to the samples with low sample preparation complexity without ultratotomy or the sample processing typical for

transmission electron microscopy methods. According to this protocol samples are analyzed in a single microcuvette (chip) indexed by laboratory information management system and sequentially moved from the non-destructive low-resolution optical microscopy instruments (such as lensless cryomicroscopes) and optical super-resolution methods (some microinterferometers and MIMs with cryotables) to the CryoSEM/CryoESEM level (in programmable environments and atmospheres). Methods of correlation lensless cryomicroscopy and scanning microscopy (including those with the subsequent transition to microanalysis) were introduced; CryoCUVEM and CryoCIREM methods in the ultraviolet and infrared range, respectively; microinterferometry methods using a multi-beam reflected light interferometer (based on the MII-11 platform with several changes); the development of CryoCDICEM systems based on the optical path of an inverted metallographic microscope with a DIC attachment and a LED emitter was also initiated. The advantages of cryoconveyor analysis protocols are ensuring the sample safety in a single cuvette-chip and the possibility of establishing spatial colocalization between the data of optical and electron microscopy (including in the CLEM/CryoCLEM mode), as well as providing a comprehensive non-destructive sample analysis in the sequential study of the microscopic systems with the possibility of varying the subsequent stages of high-resolution microscopy, depending on the results obtained at the previous stages of lower resolution microscopic studies.

**Keywords:** *CryoSEM, CLEM, CryoCLEM, ESEM, CryoESEM, ASEM, lens-less cryomicroscopy*

**Funding:** This research was completed without financial support of company, organization or foundation.

#### Сведения об авторах

Градов Олег Валерьевич — ст. науч. сотр. отдела динамики химических и биологических процессов ФИЦ ХФ РАН; инженер Лаборатории физико-химических основ рецепции ИБХФ РАН. Тел.: 8-915-492-29-43; e-mail: o.v.gradov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5118-6261>