

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И КРОВИ. ПРОБЛЕМЫ И НАДЕЖДЫ

Т. Г. Матюхина¹, О. Ю. Комков², С. А. Чижик²

¹ Гомельский медицинский институт, ул. Ланге 15, 246050 г. Гомель, Беларусь.

² Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАНБ, ул. Кирова 32А, 246050 г. Гомель, Беларусь.

Зондовая микроскопия клеток еще очень далека от состояния рутинной методики. Она сталкивается с рядом специфических ограничений и трудностей, связанных с самой природой биологических объектов. Это, в свою очередь, приводит к поиску новых методов и принципиально новых технологий, расширяя уникальные возможности АСМ в биологии и медицине.

Первая группа проблем касается иммобилизации клеток для получения устойчивых изображений. Большинство клеток имеет довольно крупные размеры и округлую форму, что затрудняет их надежную адгезию на подложке. На сегодняшний день предложено несколько оригинальных решений:

- фиксация клетки в капле раствора на кончике микропипетки;
- использование пористой подложки, где размер пор соотносится с размерами клетки;
- погружение клеток в такую среду, как, например, агар;

Два последних способа не только надежно закрепляют клетки, но и решают проблему лимитирующего z-перемещения сканера.

- исследование монослоев клеток, которые прочно соединены друг с другом, оставляя свободной только исследуемую поверхность;
- модифицированные подложки. Например, стекло, покрытое антителами, которые специфически связываются с определенными рецепторами. В этом случае решается и проблема селективной адгезии клеток определенного типа.

Вторая группа проблем связана с тем, что клетки легко деформируются и разрушаются при сканировании. Деформация увеличивает площадь контакта между иглой и клеткой и заметно снижает разрешающую способность. Один из путей решения – фиксация клеток традиционными для микроскопии фиксаторами (формалин, глутаровый альдегид) либо замораживанием. Жесткость клеток можно дополнительно увеличить путем частичной (высушивание на воздухе) или более полной дегидратации (метод замораживания-высушивания, высушивание в критической точке). Однако, все эти способы нивелируют одно из важнейших достоинств АСМ – возможность исследовать живую клетку в ее естественной среде. Кроме того, сама деформация поверхностной клеточной мембраны позволяет выявить подлежащие под ней внутриклеточные структуры.

Третья группа проблем возникает при интерпретации полученных результатов, поскольку клетка – это сложная гетерогенная и высоко чувствительная к внешним воздействиям биологическая система.

Разрешения, которые достигаются при работе с биологическими образцами, много скромнее, чем в случае «неживых» материалов, поэтому трудоемкая ТЭМ составляет вполне обоснованную конкуренцию в области морфологических исследований. Однако АСМ имеет ряд несомненных преимуществ. Во-первых, это возможность наблюдать живую клетку *in vivo* с высоким пространственным и временным разрешением. Во-вторых, это уникальная способность оценки биомеханических свойств различных клеточных структур. Среди них такие важнейшие свойства как эластичность, мобильность поверхностных слоев, адгезия, молекулярное связывание и электростатичность. Это совершенно новое направление АСМ, где активно разрабатываются как технические режимы сканирования, так и теоретические модели интерпретации результатов.

Наиболее перспективным и разработанным представляется метод картографирования сил, когда кривые сила–расстояние рассматриваются как функция локального позиционирования зонда [1]. Метод позволяет картографировать локальные эластические свойства клеточной поверхности и внутри-

клеточных структур и комбинировать их с топографическим изображением.

Другой метод – режим фазового контраста – находится в стадии развития, но уже сейчас позволяет выявлять свойства поверхности, которые недоступны для других АСМ-методик. Вероятно, что он сможет дать не только качественную, но и количественную информацию о клеточных свойствах.

АСМ-исследование форменных элементов крови

Эритроциты – одни из первых клеточных объектов АСМ. Характерная форма и относительно небольшая толщина обеспечивают весьма прочную их иммобилизацию на обычном предметном стекле. Фиксация в глутаровом альдегиде и частичная дегидратация на воздухе достаточны для хорошей сохранности клеток при сканировании. Использование больших полей сканирования позволили получить исчерпывающую стереометрическую характеристику целых эритроцитов [2] (рис. 1). Оценка формы эритроцитов имеет значительный практический интерес, поскольку определяет функциональную состоятельность этой клетки. Форма может изменяться под влиянием многих внешних факторов, а также в случае некоторых патологий. В режиме *tapping mode* было достигнуто нанометровое разрешение, что выявило на мембранной поверхности выступающие белковые глобулы. Takeuci et al [3] получили на фиксированных клетках АСМ-изображение их подмембранного цитоскелета, который определяет форму клетки и может разрушаться, например, при инфекциях.

При исследовании эритроцитов был также применен и метод фазового контраста, который показал различия в упругих свойствах отдельных участков этих форменных элементов [4]. Было также выявлено, что при стандартной методике приготовления мазка форма клетки искажается, поскольку центральная область плотно прилегает к подложке. В некоторых случаях отмечалось ее разрушение (рис. 2).

Лейкоциты – клетки крови, обеспечивающие защитные реакции организма. Если суспензию фиксированных форменных элементов крови нанести на кварцевое покровное стекло, а затем промыть, то эритроциты удаляются, а лейкоциты остаются на подложке. Они имеют более неправильную форму и шероховатую поверхность. Комбинация оптического и атомно-силового микроскопа с методами иммунологического мечения позволяет идентифицировать различные типы этих клеток и исследовать особенности их поверхностной организации, в том числе и лигандные комплексы [5].

Тромбоциты – мелкие безъядерные элементы крови, обеспечивающие ее свертываемость в случае повреждения стенки сосуда. В работе Fritz et al [6] были продемонстрированы специфические возможности АСМ в биологических исследованиях. Сканирующая игла оказалась иницирующим фактором, запускающим реакцию активации тромбоцитов. Используя различные режимы, были исследованы процессы, связанные с активацией: изменение формы клетки, перемещение внутриклеточных гранул, детали цитоскелета и др, а также установлен уровень сил, при котором тромбоциты активировались.

АСМ-исследование клеток сосудов и сердца

Эндотелий – однослойный пласт плоских эпителиальных клеток, выстилающий кровеносные и лимфатические сосуды. Плоская форма обеспечивает хорошие условия сканирования, поскольку высота клеток не превышает верхнего положения кантилевера. Исключение составляет область ядра, заметно выступающая над остальными участками клетки. Эндотелий регулирует обмен газами и питательными веществами между циркулирующей кровью и окружающими тканями организма. АСМ-исследования живой культуры эндотелиальных клеток выявили изменения формы клеток и их цито-

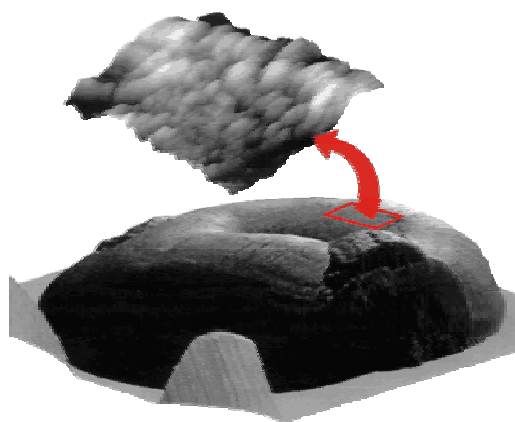


Рис. 1. АСМ-изображение эритроцита и участка его поверхности

скелетных структур под влиянием тока жидкости [7]. Были также получены АСМ-изображения фенестрированного эндотелия печеночных синусов, описана структура фенестр и динамика их изменений при воздействии различных физиологических и повреждающих факторов [8].

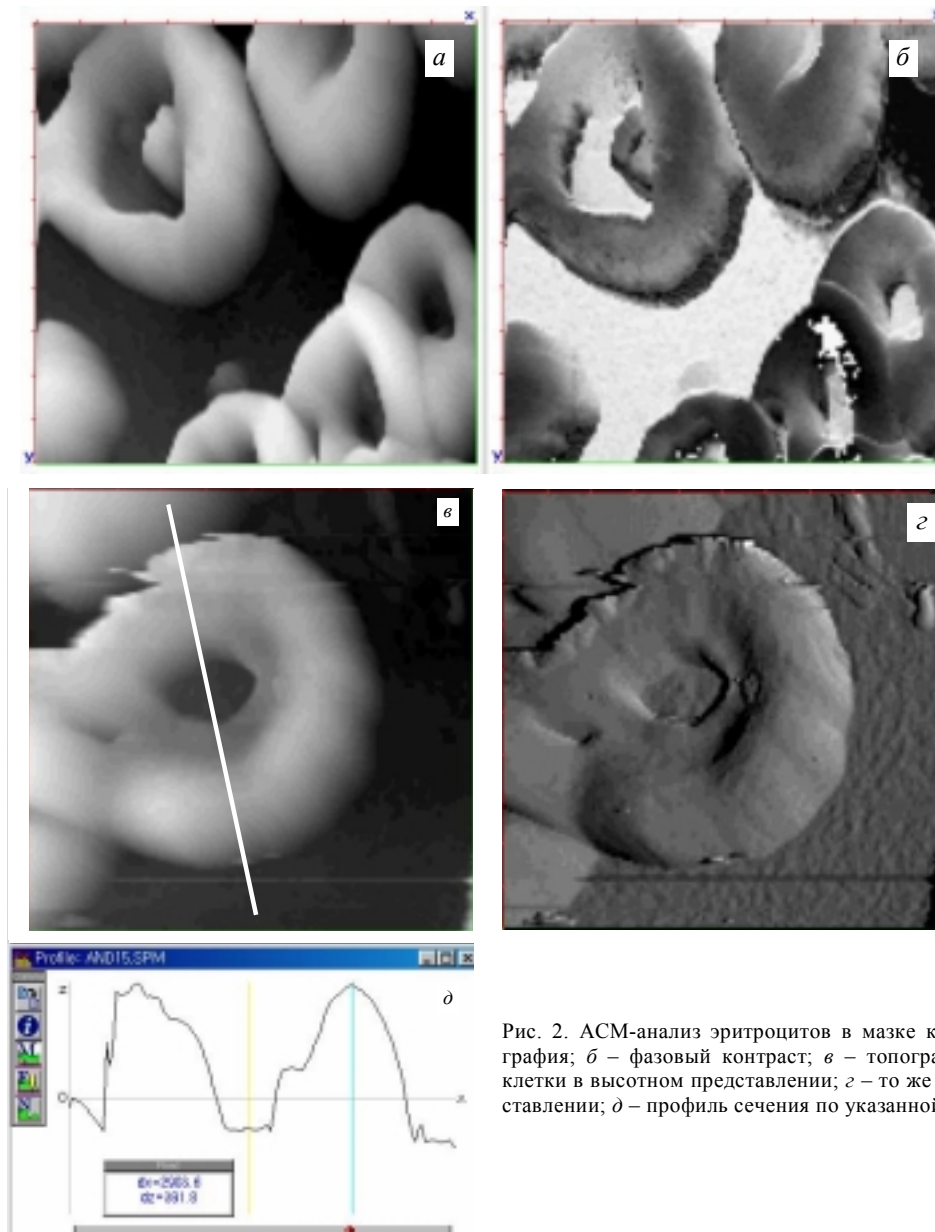


Рис. 2. АСМ-анализ эритроцитов в мазке крови: *a* – топография; *б* – фазовый контраст; *в* – топография одиночной клетки в высотном представлении; *г* – то же в угловом представлении; *д* – профиль сечения по указанной на (*в*) линии

Кардиомиоциты. Это сократительные клетки сердечной мышцы. АСМ-изображения живых кардиомиоцитов, сделанные Shroff et al [9], выявили центрально расположенное ядро и подмембранные структуры цитоскелета. Фиксация клеток позволила визуализировать пучки актина на периферии клетки. Была оценена жесткость в различных участках кардиомиоцитов. Она снижалась после добавления кальция, при разрушении цитоскелета цитохалазином В, а также изменялась в процессе сокращения клетки. АСМ позволила отследить активность сокращающихся клеток с высоким пространственным (1–3 нм) и временным (60–100 мс) разрешением. Совсем недавно АСМ была использована для анализа механической пульсации поверхности в различных точках изолированного кардиомиоцита и синхронизированного сокращения в монослойной культуре [10].

Приведенный здесь краткий обзор исследований клеток крови и сердечно-сосудистой системы, проведенных методом атомно-силовой микроскопии, выявляет, по меньшей мере, два перспектив-

ных пути развития биологической АСМ. Один – применение старых методов (например, АСМ фиксированных клеток на воздухе), которые будут использоваться для накопления дополнительной информации о строении и свойствах различных биологических систем. Второе направление – новые технологии, например, методы фазового контраста и force mapping, открывающие возможность изучения таких свойств и особенностей поведения клеток, оценка которых недоступна для других современных методов, а также экспериментальное моделирование клеточной жизнедеятельности *in vivo*.

Работа выполнялась при финансовой поддержке БР ФФИ (грант Б99-212).

Литература

1. Heinz W.F. and Hoh J.H. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope // *Trends Biotechnol.* **17** (1999), 143-150.
2. Матюхина Т.Г. Исследование эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии // *Клиническая лабораторная диагностика*, (1999) № 6, 13-16.
3. Takeuchi M. et al Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy. / *Micron* **28** (1998), 69-71.
4. Chizhik S.A., Huang Z., Gorbunov V.V., Myshkin N.K., Tsukruk V.V. Micromechanical properties of elastic polymeric materials as probed by scanning force microscopy // *Langmuir*. - 1998.- Vol.14, № 9.- P.3012-3015.
5. Putman C.A.J, de Grooth B.G., Hansma P.K. and van de Hulst N.F. Immunogold labels: cell surface markers in atomic force microscopy // *Ultramicroscopy* **48** (1993), 177-182.
6. Fritz M., Radmacher M. and Gaub H.E. Granule motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy // *Biophys.J.*, **66** (1994), 1328-1334.
7. Barbee K.A. Changes in surface topography in endothelial monolayers with time at confluence: influence on subcellular shear stress distribution due to flow // *Biochem.Cell Biol.*, **73** (1995), 501-505.
8. Braet F., de Zanger R., Kammer S. and Wisse E. Noncontact versus contact imaging: an atomic force microscopic study on hepatic endothelial cells *in vitro* // *Internal.J.Imaging Syst,Technol.*, **8** (1997), 162-167.
9. Shroff S.G., Saner D.R. and Lal R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy // *Am.J.Physiol.*, **269** (1995), C286-C292.
10. Domke J., Parak W.J., George M et al Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscope // *European Biophys.J.Biophys.Letts.*, **28** (1999), 179-186.