

УДК 549.086

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ МОРФОЛОГИИ
ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК ПРИ АПОПТОЗЕ****Л.В. Кухаренко¹, Х. Фукс², Н.Г. Циркунова³, А.А. Кухаренко⁴,
В.Ю. Байрамуков⁵, В.Г. Лещенко¹**

¹Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, 220116,
Минск, Беларусь

²Университет г. Мюнстера, D-48149, Германия

³Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, ул. П. Бровки, 6, 220013,
Минск, Беларусь

⁴Активные технологии, пр-т Независимости, 11, 220030, Минск, Беларусь

⁵Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, ул. Политехническая, 26, 194021, Санкт-Петербург,
Россия. E-mail: lvk@europe.com

Введение

Изучение и расшифровка механизмов апоптоза (программированной смерти клеток) являются одним из наиболее актуальных направлений современной биофизики. Методы скайрующей зондовой микроскопии (СЗМ) позволяют достигать уникальных научных результатов при исследовании изменений морфологии поверхности клеток, сопровождающих апоптоз.

Посредством апоптоза организм избавляется от «ненужных» в функциональном отношении на данный момент клеток или потенциально опасных клеток. Апоптоз лежит в основе таких важных биологических процессов, как позитивная и негативная селекции Т- и В-лимфоцитов, гибель клеток, вызванная облучением, нагреванием или отсутствием специфических ростовых факторов. Механизм программированной клеточной гибели запускается, как известно, различными сигналами: связыванием с рецепторами специфических киллерных лигандов, нехваткой факторов роста, повреждениями ДНК и разрушениями цитоскелета (например, при воздействии физических или химических факторов, приводящих к накоплению свободных радикалов или метаболическим клеточным изменениям). Необходимо отметить, что первоначальный сигнал для запуска апоптоза может быть различным, но морфологические и биохимические характеристики программированной клеточной смерти остаются неизменными.

В данной работе приведены результаты исследования морфологии поверхности β -клеток и лимфоцитов до и после воздействия внешнего индуктора апоптоза методом атомно-силовой микроскопии (DimensionTM 3000 и Nanoscope IIIa).

Существуют многочисленные доказательства тесной физиологической связи между окислительным стрессом и апоптозом. Показано, что активные формы кислорода (АФК), и в частности перексид водорода H_2O_2 как наиболее стабильной АФК, могут инициировать внутриклеточные программы, приводящие к гибели клеток. В отличие от радикалов и ионов H_2O_2 – это устойчивая в растворах молекула. Следует отметить, что из всех АФК только H_2O_2 может реагировать с веществами не только радикальным, но и безрадикальным путем. Действие перекиси водорода на клетки во многом определяется типом клетки, местом приложения (мишенью) действия агента и концентрацией агента. Специфичность действия цитотоксических доз H_2O_2 на клетки заключается в том, что в высоких концентрациях H_2O_2 инициирует гибель клеток посредством их разрушения (некроз), а в малых концентрациях индуцирует апоптотический путь гибели

клеток посредством изменения внутриклеточных сигнальных процессов [1]. Именно окислительный стресс и был использован как механизм для запуска апоптоза для β -клеток и лимфоцитов.

Методика эксперимента

β -клетки и лимфоциты фиксировались в 2%-м растворе глутарового альдегида в течение 95 мин. Затем образцы промывали фосфатным буфером и дегидратировали в 30–100 %-м этаноле. Одна группа клеток была контрольной, другая подвергалась воздействию 0,5 мМ раствора H_2O_2 .

Исследования морфологии поверхности клеток до и после воздействия H_2O_2 проводились на атомно-силовых микроскопах DimensionTM 3000 и Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa-Barbara, USA) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием стандартных кремниевых кантилеверов ($k = 29–57$ Н/м, Nanosensors GmbH).

Результаты и обсуждение

На рис. 1, *а* изображена фиксированная контрольная β -клетка. Контрольные β -клетки имеют круглую форму, и размер их составляет 10 мкм в ширину и 2.5 мкм в высоту. На малых окнах сканирования (рис. 1, *б*) визуализируется гранулярная структура плазматической мембраны контрольных β -клеток. Размер гранул составляет от 30 до 100 нм.

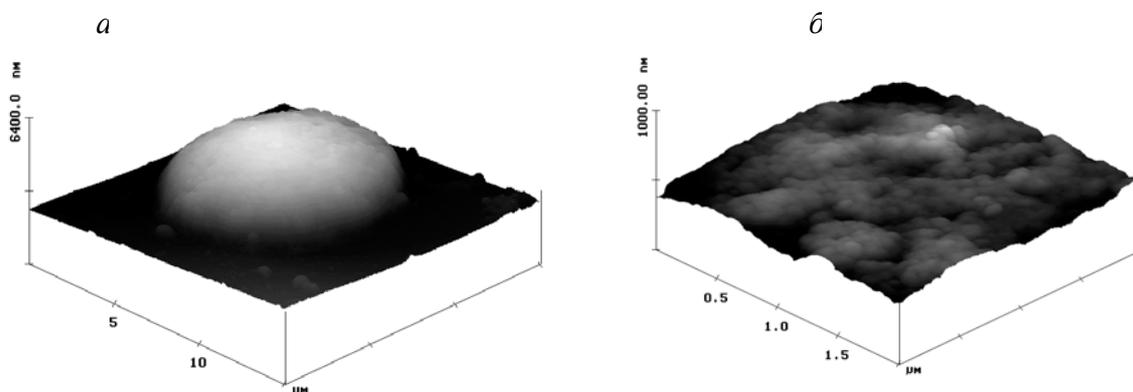


Рис. 1. АСМ-изображение контрольной β -клетки (*а*) и ее плазматической мембраны (*б*)

С применением АСМ выявлены существенные различия в поверхностной морфологии клеток до и после воздействия H_2O_2 . На рис. 2, *а* показана β -клетка после воздействия H_2O_2 . Визуализируется сморщивание клетки и ее фрагментация. β -клетка становится более плоской, ее высота уменьшается до 0.5 мкм. На поверхности клетки видны локальные выпячивания наружной мембраны (рис. 2, *б*). Можно предположить, что под ними находятся остатки фрагментированного ядра, однако этот вопрос нуждается в дальнейшем исследовании. Вероятно, визуализируется образование апоптических телец.

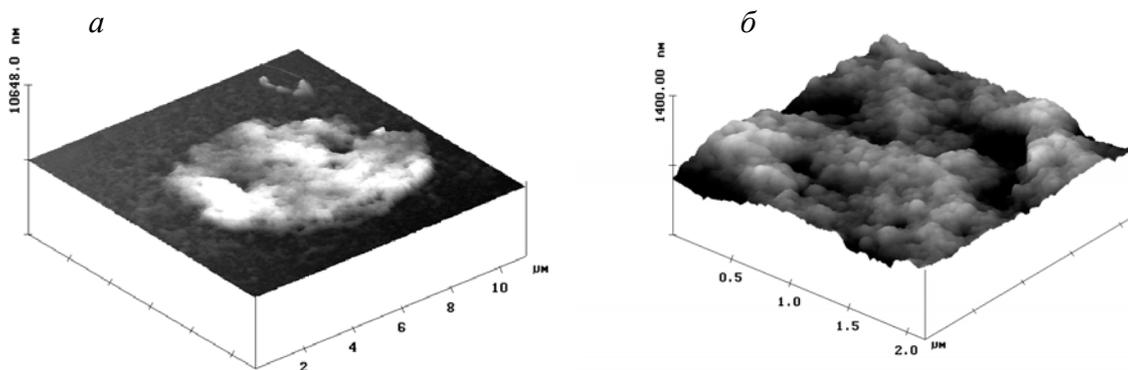


Рис. 2. АСМ-изображение β -клетки (а) и ее плазматической мембраны (б) после воздействия H_2O_2

На рис. 3 также приведено АСМ-изображение β -клетки после воздействия H_2O_2 . Морфология поверхности этой клетки отлична от предыдущего АСМ-изображения. Как видно, клетка уплощается, высота ее составляет 0,5 мкм. Центральная часть клетки окружена ареолом, состоящим из маленьких кусочков клетки. Плазматическая мембрана на границе центральной части полностью разрушена. Уменьшение окна сканирования (рис. 3, б) позволяет визуализировать не только гранулы, размер которых составляет от 10 до 40 нм, но и крупные глобулы размером от 200 до 400 нм. Визуализируемое изменение поверхностной морфологии β -клеток после воздействия H_2O_2 соответствует апоптическому механизму гибели клеток.

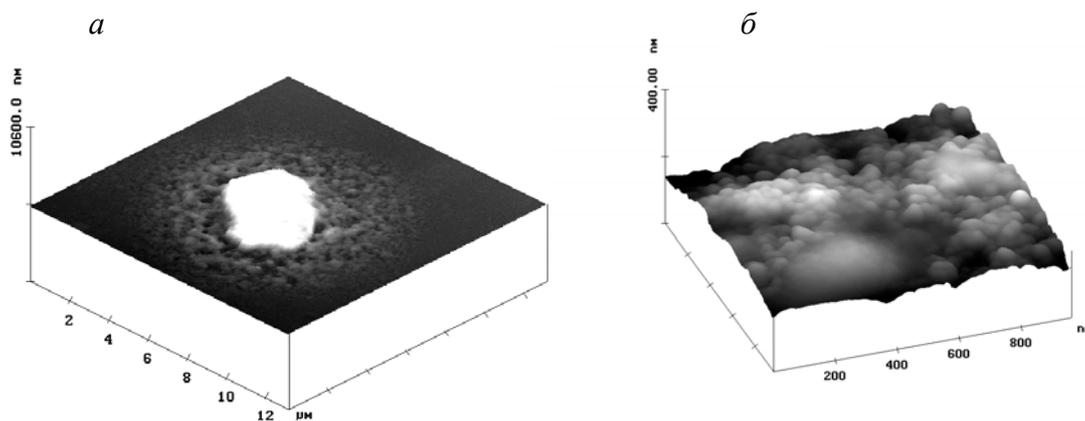


Рис. 3. АСМ-изображение β -клетки (а) и ее плазматической мембраны (б) после воздействия H_2O_2

На рис. 4, а приведено АСМ-изображение контрольного лимфоцита. Контрольные клетки были высокими, имели шероховатую гранулярную поверхность, что затрудняло их визуализацию, так как не хватало разрешения пьезодвигателя по z-координате. Размер клетки, представленной на рис. 4, а, составляет 9.6 мкм в ширину и 4 мкм в высоту. Атомно-силовая микроскопия позволила визуализировать существенные различия в поверхностной морфологии клеток до и после воздействия H_2O_2 . Обнаружено, что клетки после воздействия H_2O_2 уменьшаются в размерах (~ 6 мкм) и становятся более плоскими (рис. 4, б). Высота клеток после воздействия H_2O_2 составляла 0.7–1,2 мкм. На поверхности клеток видны локальные выпячивания наружной мембраны, а также визуализируется формирование апоптических телец.

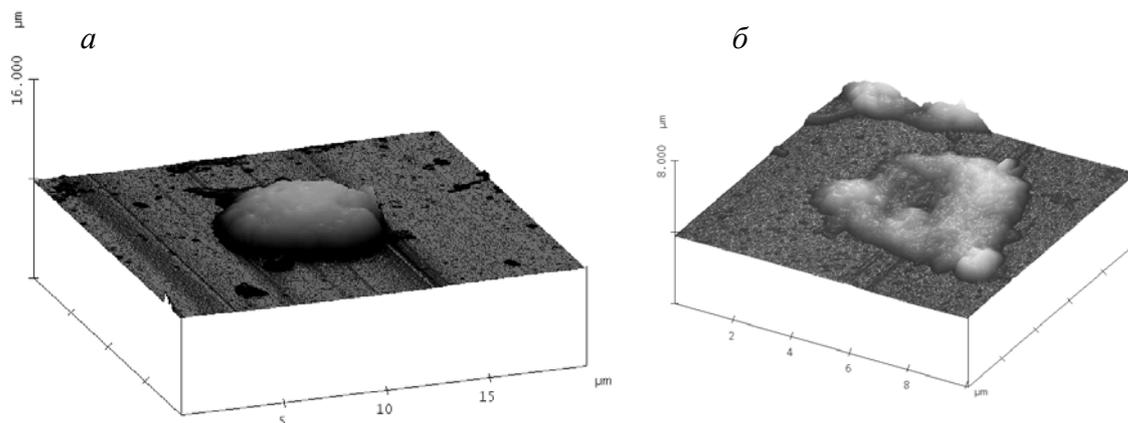


Рис. 4. АСМ-изображение контрольного лимфоцита (а) и лимфоцита (б) после воздействия H_2O_2

Морфологически апоптоз проявляется в конденсации хроматина, реорганизации цитоскелета, уменьшении объема клетки, блеббинге и фрагментации ядра клетки. Происходит фрагментация клетки с образованием апоптических телец, которые быстро фагоцитируются не только макрофагами и нейтрофилами, но и другими соседними клетками, не являющимися "профессиональными" фагоцитами.

Практически все определения апоптоза основаны на морфологических и некоторых биохимических критериях. Неразрушающий характер исследований, высокое пространственное разрешение, возможность проведения экспериментов в жидких средах делают метод АСМ особенно перспективным для изучения динамики процесса апоптоза, для визуализации формирования «апоптотических телец» и определения упруго-эластических свойств мембраны в результате этого процесса [2].

Более детальный АСМ-анализ гибели не только различных (β -клетки и лимфоциты), но и одинаковых клеток (β -клеток) показывает, что иногда довольно трудно определить тип клеточной гибели. Даже одна и та же клеточная линия при воздействии одного и того же индуктора апоптоза может быть визуализирована с различными морфологическими проявлениями гибели клетки.

Литература

1. Zheng M., Aslund F., Storz G // Science. Vol. 279. 1998. 1718.
2. Parot P., Dufrene Y., Hinterdorfer P. et al. // J. Mol. Recognit. Vol. 20. 2007. 418.