

УДК 57.082.52:57.086.2/3

## МИКРОСКОПИЯ ЛАТЕРАЛЬНЫХ СИЛ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

М. Н. Стародубцева<sup>1</sup>, Н. И. Егоренков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> УО «Гомельский государственный медицинский университет», ул. Ланге, 5, Гомель

<sup>2</sup> УО «Гомельский государственный технический университет им. П.О. Сухого»,  
пр. Октября 48, Гомель

### Введение

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) в контактном режиме сканирования широко используется клеточной биологией для визуализации и количественной характеристики формы и размеров клеток, для изучения поверхностных структур клеток [1]. Преимуществом контактного режима сканирования на воздухе является высокое разрешение АСМ-изображений клеток (на два порядка выше, чем при сканировании в жидкой среде). Как один из методов АСМ в контактном режиме сканирования, микроскопия латеральных сил позволяет также анализировать микро-, мезо- и нанонеоднородность механических свойств твердых поверхностей. Поэтому микроскопия латеральных сил применяется для изучения поверхностей с неоднородным составом или структурой, а также для контрастирования изображений структур с сильно изменяющимся рельефом. Поверхность клеток представляет собой именно такой объект исследования.

Целью работы являлось исследование топографии мезомеханических свойств поверхностного слоя клеток с помощью микроскопии латеральных сил.

### Материалы и методы

В работе использовались клетки крови (нейтрофилы, эритроциты и др.). Нейтрофилы выделялись из периферической крови здоровых доноров. Суспензия клеток наносилась на обезжиренную стеклянную поверхность, инкубировалась в течение 5–180 мин, при этом не допуская полного высушивания образцов. После этого клетки фиксировались 1 %-м глутаровым альдегидом в течение 30 мин, отмывались буферным раствором и дистиллированной водой и высушивались при комнатной температуре. В качестве активирующих нейтрофилы агентов использовались пероксинитрит (ONOO-) и частички латекса. Для изучения структурно-механических свойств эритроцитов кровь здоровых доноров наносилась прямо на обезжиренную поверхность стеклянной пластинки и высушивалась при комнатной температуре. АСМ-исследования проводились на атомно-силовом микроскопе НТ-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь), размещенном в ЦНИЛ Гомельского государственного медицинского университета, в контактном режиме сканирования с использованием игл типа CSC38 («Mikromasch»). Регистрировались топография, карта вертикальных отклонений острия АСМ-зонда и карта латеральных сил поверхности клеток.

### Результаты и обсуждение

**Фагоцитоз нейтрофилами частиц латекса.** Одной из реакций, характеризующих функциональную активность нейтрофилов, является фагоцитоз ими инородных частиц (в данном случае – частиц латекса). Латексные частицы активируют нейтрофил и иницируют структурные перестройки элементов цитоскелета, содержащих белок актин. В

процессе активации нейтрофила происходит полимеризация актина с образованием ламеллиподия (тонкого движущегося края клетки в процессе ее взаимодействия с субстратом-подложкой) и филоподий (нитеподобных структур, вырастающих из ламеллиподия в направлении к инородному объекту и окружающих этот объект с образованием фаголизосомы, осуществляющей дальнейшее разрушение инородного объекта с помощью специальных ферментов).

На изображениях нейтрофилов, активированных латексом, при использовании опции «топография» практически нельзя отличить частички латекса от гранул нейтрофила и других особенностей структуры поверхности клетки (рис. 1, а, в). В то же время карты латеральных сил дают четкое представление о различной природе структур на изучаемом участке (рис. 1, б, г). Латексные частички характеризуются значительно меньшим сопротивлением механическому воздействию. В сравнении с поверхностным слоем клетки, фиксированной глutarовым альдегидом, они более мягкие и на картах латеральных сил контрастно выделяются вследствие интенсивно темной окраски (рис. 1, б, г). Таким образом, использование карт латеральных сил позволяет изучить не только процесс захвата клеткой частиц латекса, но и продвижение или растворение их в фаголизосомах в поверхностном слое.

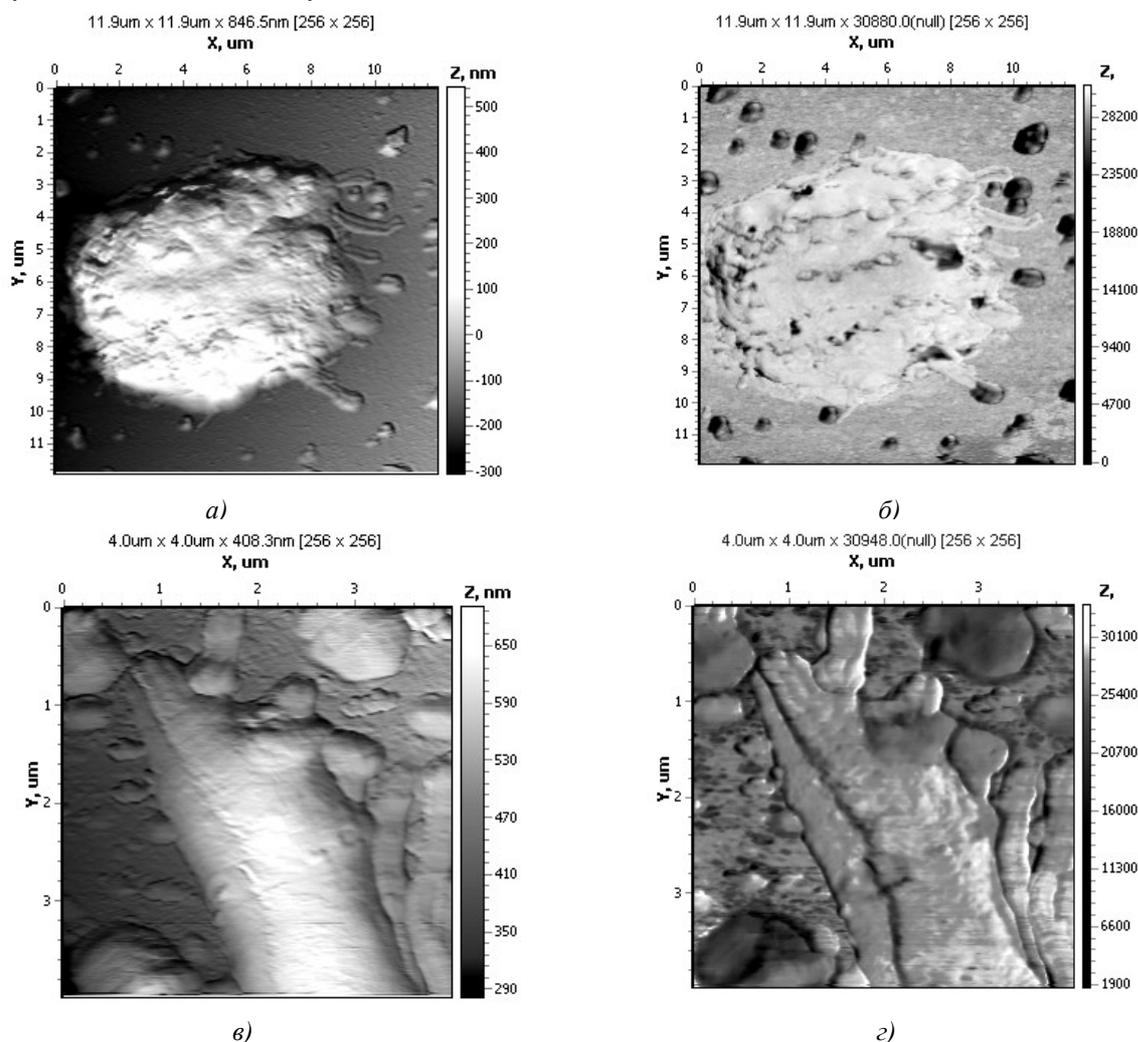


Рис. 1. Топография (а, в) и карты латеральных сил (б, г) нейтрофилов человека, активированных латексом

**Анализ внутриклеточных структур.** Механические свойства структурных элементов клетки являются неодинаковыми. При использовании прижизненной химической фиксации формы клетки глутаровым альдегидом фиксируется существующая форма цитоскелета, а именно примембранные актиновые структуры. Эти структуры в основном и определяют механические свойства клетки как целого образования. В итоге, как показывают многочисленные эксперименты, различать внутриклеточные структуры, подобные ядрам, как правило, не удается. Однако существуют условия, при которых структура примембранного актинового скелета нарушается, например при воздействии пероксинитрита, продукта реакции монооксида азота с супероксид анион-радикалом, производимыми нейтрофилами при их активации. Пероксинитрит не только ингибирует полимеризацию актина, но и способствует его деполимеризации. Кроме того, пероксинитрит запускает программу гибели клетки, во время выполнения которой происходит также набухание ядер. В этом случае ядра нейтрофилов могут контактировать с плазматической мембраной. На трехмерном АСМ-изображении (рис. 2, *а*) представлен активированный пероксинитритом нейтрофил. На топографии центрального участка нейтрофила хорошо видна гладкая область, отличная от остальной (гранулированной) поверхности клетки (рис. 2, *б*). Карта латеральных сил этого участка показывает различие в механических силах гладкой области (темная область в центре) и окружающих ее гранулярных структур (рис. 2, *в*). Анализ топографии, карты латеральных сил и расположения рассматриваемого элемента структуры клетки позволяет предположить, что это ядро клетки.

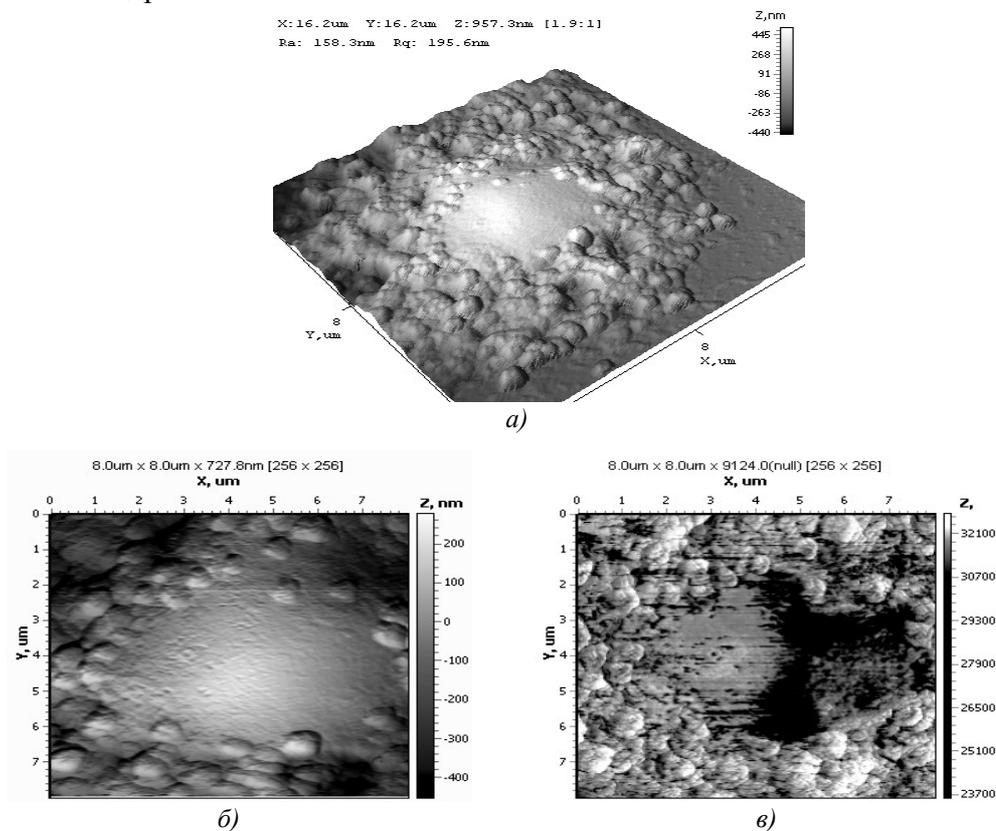


Рис. 2. Трехмерное АСМ-изображение активированного пероксинитритом нейтрофила (*а*), топография (*б*) и карта латеральных сил (*в*) центрального участка клетки

**Анализ структур цитоскелета.** Карты латеральных сил могут быть использованы также для анализа структуры филоподий. На рис. 3 представлены топография, карта вертикальных отклонений АСМ-консоли и карта латеральных сил участка поверхности образца, содержащего несколько растущих филоподий нейтрофила.

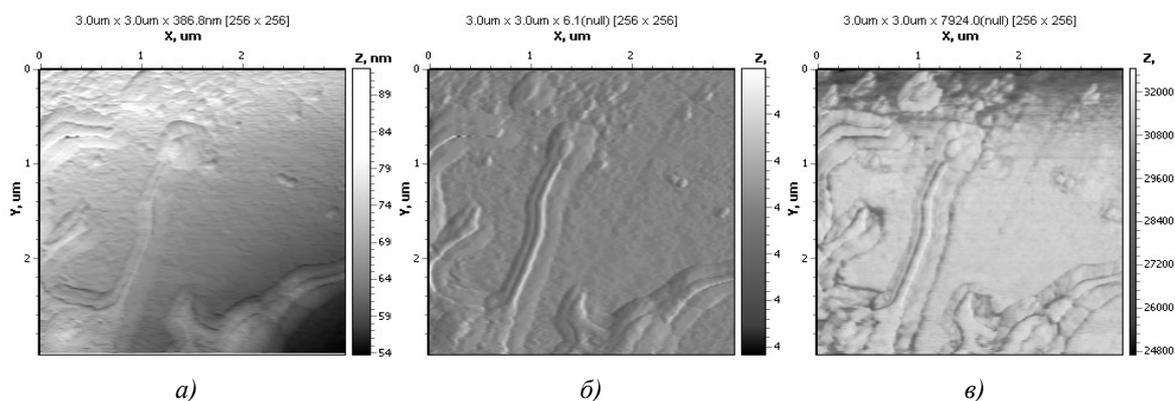


Рис. 3. Топография (а), карта вертикальных отклонений АСМ-консоли (б) и карта латеральных сил (в) участка стеклянной подложки с несколькими филоподиями активированного нейтрофила

На обеих картах хорошо просматривается внутренняя структура филоподий: центральный пучок актиновых волокон, оканчивающийся на быстро растущем конце центром роста, а на медленно растущем конце включающийся в структуру ламеллиподии (рис. 3). На рис. 4 представлены карты вертикальных отклонений АСМ-консоли и карты латеральных сил быстро растущего конца филоподии, записанные при разных временах задержки в системе обратной связи. При увеличении времени обратной связи наблюдается размывание изображения наноразмерной структуры для карт вертикальных отклонений АСМ-консоли, в то время как карты латеральных сил при варьировании этого временного параметра подвержены изменениям в меньшей степени. Следовательно, карты латеральных сил дают возможность различать тонкую структуру клетки более надежно. Карты латеральных сил отражают информацию о структуре не только актиновых структур филоподий нейтрофилов, но и актиновых структур других клеток, например мембранного скелета эритроцитов. Согласно современным представлениям, мембранный скелет эритроцитов представляет собой двумерную решетку из структурных белков (актина и спектрина), связанную с плазматической мембраной через специальные интегральные белки. Спектрин формирует антипараллельные двойные гетеродимеры. Длина спектриновых нитей приблизительно равна 70–100 нм. “Хвосты” нитей связаны с филаментами F-актина. В среднем один актиновый филамент связывает до шести спектриновых нитей. В итоге формируется гексагональная сеть, состоящая из равносторонних треугольников. Стабилизация актин-спектриновой сети происходит посредством таких белков, как белок полосы 4.1 и белок полосы 4.2, тропомиозин, аддуцин и миозин. Связь мембранного скелета с плазматической мембраной осуществляется посредством гликофорина С и белка полосы 3 с помощью белка полосы 4.1 и анкирина соответственно.

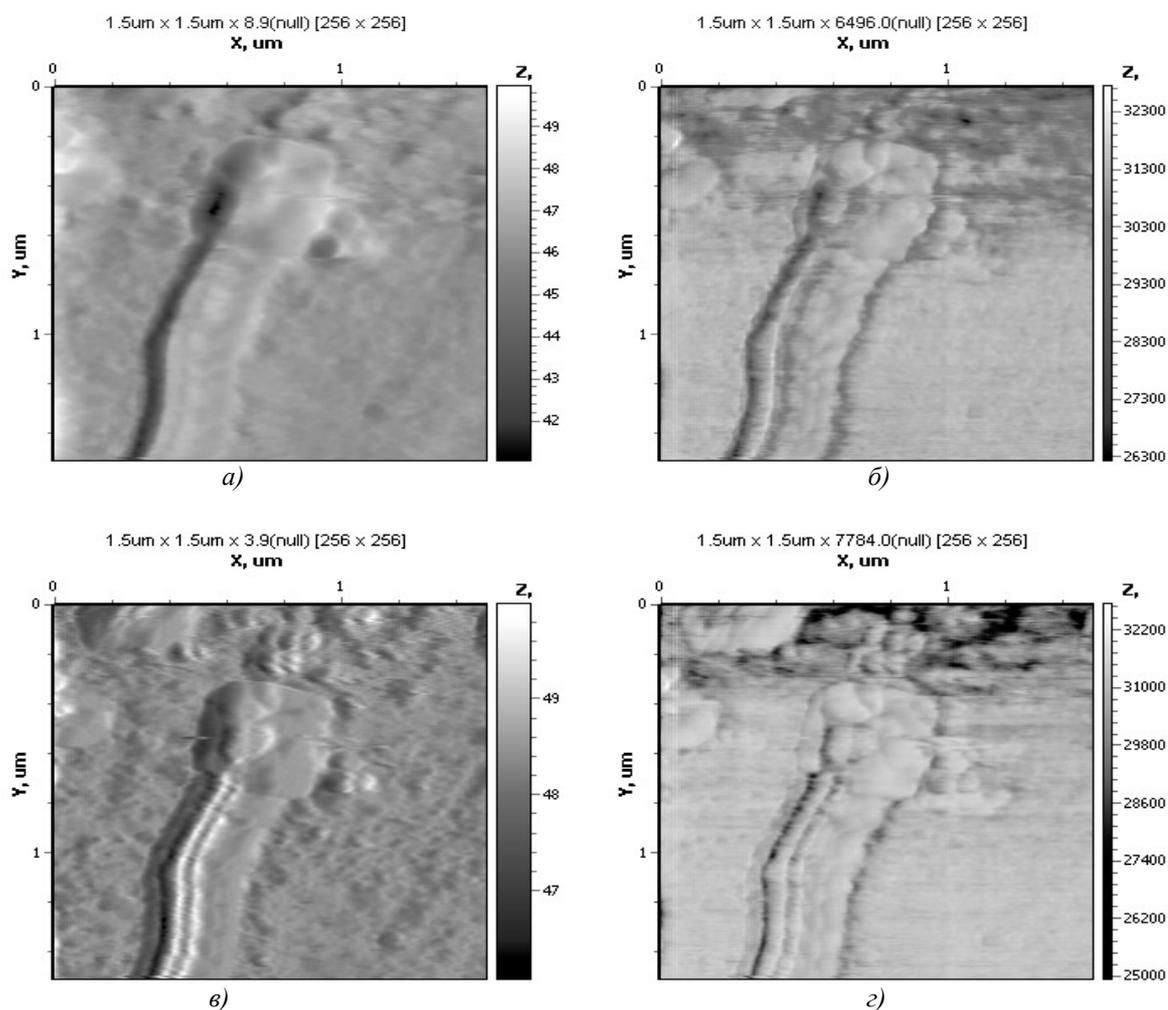


Рис. 4. Топографии (а, в) и карты латеральных сил (б, г) участков с филоподией нейтрофила, записанных при разных значениях времени задержки в системе обратной связи: 15 мкс (а, б) и 5 мкс (в, г)

На рис. 5 представлена зависимость среднего значения латеральных сил участков поверхности нефиксированных глутаровым альдегидом эритроцитов от температуры окружающей среды. Анализ зависимости показывает, что в эритроцитах из мазка крови происходит структурная перестройка мембраны в области температур  $45\text{--}55^\circ\text{C}$ . В этом диапазоне температур, как известно, наблюдается фазовый переход вещества мембраны эритроцитов, соответствующий структурной перестройке основного белка мембранного скелета эритроцитов – спектрина. Происходит денатурация спектрина ( $t_{1/2} = 50 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Денатурация спектрина лежит в основе морфологических изменений эритроцитов, а также изменений их деформируемости. Наши данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что тонкая структура поверхности эритроцитов, наблюдаемая при АСМ-сканировании, обусловлена спектрин-актиновой сеткой, тесно примыкающей к эритроцитарной мембране [2, 3]. Изучение этой тонкой структуры можно эффективно проводить с помощью карт латеральных сил.

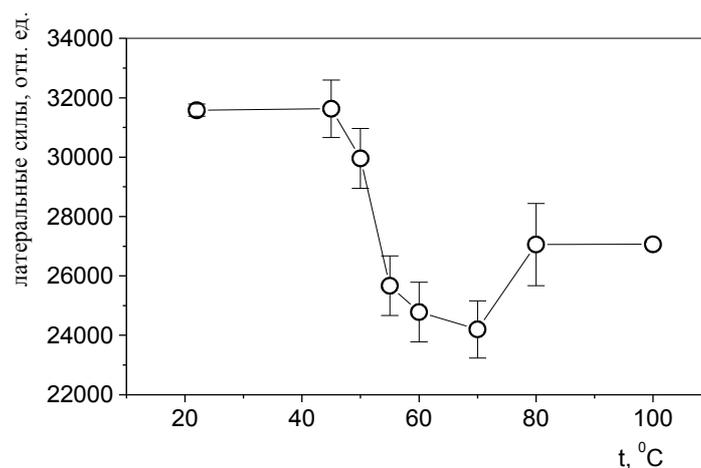


Рис. 5. Зависимость среднего значения латеральных сил участка поверхности эритроцита от его температуры

## Заключение

Использование микроскопии латеральных сил эффективно при изучении не только особенностей структуры и механических свойств клеток в целом, но и структурно-механических свойств субклеточных элементов, а также взаимодействий клеток с другими объектами.

Работа выполнена при частичной поддержке БРФФИ (грант Б07-043).

## Литература

1. Morris V.J., Kirby A.R., Gunning A.P. Atomic force microscopy for biologists // Imperial College Press, 1999. – 332 p.
2. Starodubtseva M. N., Kuznetsova T. G., Chizhik S. A., Yegorenkov N. I. // Micron. 2007. Vol. 38, № 8. P. 782–786.
3. Стародубцева М. Н., Кузнецова Т. Г., Черенкевич С. Н. // Бюл. эксперим. биолог. медицины. 2007. Т. 143, № 2. С. 222–230.