

УДК 576.3/.7:616-076

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТИМОЦИТОВ КРЫС

И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук

Гомельский государственный медицинский университет, Ланге, 4, Гомель, Беларусь

E-mail: nikkitina@gmail.com

Показаны преимущества использования методов атомно-силовой микроскопии для изучения клеток иммунной системы. Установлено, что воздействие на тимоциты крысы вызывающего окислительный стресс пероксинитрита приводит к существенным изменениям поверхностных структур и морфологии клетки: укорачиваются или исчезают филоподии, увеличивается насыщенность поверхности выраженными структурными элементами, уменьшается высота адгезированной клетки при увеличении ее диаметра. При воздействии пероксинитрита в концентрации 100 мкмоль/л на поверхности клеток возникают кратероподобные структуры и инвагинации, часть содержимого выбрасывается в виде гранул размером 150–400 нм.

Введение

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет отображать трехмерные клеточные структуры с высоким разрешением, проводить исследования в воздушной и жидкой среде, оценивать механические свойства клеток и проводить мониторинг динамики клеточных процессов в режиме реального времени [1].

Т-лимфоциты относятся к важнейшему звену иммунной системы. Их незрелые предшественники называются тимоцитами, поскольку проходят стадию созревания в центральном органе иммунной системы – тимусе. После созревания лимфоциты мигрируют в периферические органы иммунной системы. Нарушение функциональной активности тимуса, возникающее в результате воздействия ряда факторов, приводит к развитию вторичных иммунодефицитных состояний [2].

Известно, что функциональная активность иммунокомпетентных клеток тесно связана с особенностями их морфоструктуры. Морфофизиологические параметры клеток иммунной системы не отличаются постоянством и зависят от разнообразных факторов. Так, поверхностные структуры лимфоцитов существенно изменяются при связывании с антигенами, а также при межклеточном взаимодействии Т-, В-лимфоцитов и макрофагов [3].

К настоящему времени установлено, что из всех структур клетки цитоплазматическая мембрана является наиболее чувствительной к повреждающему воздействию. Ей отводится ключевая роль в процессе функционирования отдельных клеточных оргanelл и клетки в целом. Дезорганизация клеточных мембран вследствие внешнего воздействия может приводить к нарушению внутриклеточных процессов синтеза макромолекул, нарушению созревания клеток и выходу в кровь неполноценных клеток, неспособных выполнять свои функции.

Исследование поверхностных структур тимоцитов методами АСМ позволяет глубже проникнуть в механизмы трансформации лимфоцитов и разработать новые подходы к функциональной диагностике состояния иммунной системы организма.

Пероксинитрит (ONOO⁻) – один из продуктов метаболизма оксида азота. Это высокотоксичное соединение способно вызывать разрывы в цепи ДНК путем нитрозили-

рования гуанина, а также инициировать перекисное окисление липидов мембран клеток с последующим ингибированием ионных каналов [4]. Известно, что воздействие ONOO– в малых концентрациях вызывает апоптоз, а при более высоких концентрациях – некроз [5]. Токсические эффекты пероксинитрита усиливаются при ацидозе, способствующем образованию ONOOH, поставляющего гидроксильные радикалы.

Целью данной работы явилось выявление особенностей поверхностной структуры тимоцитов в норме и в условиях окислительного стресса, индуцированного воздействием различных концентраций пероксинитрита.

Методика эксперимента

При проведении исследований биологических объектов, в частности клеток, методами АСМ возникает ряд проблем, связанных с процедурой приготовления препаратов.

Во-первых, для получения устойчивых изображений необходимо правильно иммобилизовать клетки. В частности, при исследовании лимфоцитов возникают сложности, связанные с их относительно большими вертикальными размерами. В связи с этим отметим, что при подготовке препарата важным методическим аспектом является правильный выбор времени инкубации клеток. Чем продолжительнее срок инкубации, тем более распластанными по подложке оказываются клетки и тем проще их исследовать, но вместе с тем происходит потеря особенностей строения поверхностной структуры [6].

Во-вторых, при сканировании клетки легко деформируются и разрушаются, поэтому для увеличения их жесткости применяется фиксация, например глутаровым альдегидом. Но необходимо учесть, что умеренная деформация поверхности клетки позволяет выявить особенности структуры цитоскелета и подлежащих внутриклеточных органелл.

В наших экспериментах тимоциты выделялись из тимуса половозрелых белых крыс-самцов массой 200–230 г. При этом соблюдались все требования Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными (1975, пересмотр. 1993), Директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986), и других нормативных актов, принятых в международной практике обращения с лабораторными животными. Экспериментальные животные содержались на стандартном рационе. Животных умерщвляли путем декапитации. Извлекали тимус, отмывали его от крови физиологическим раствором и охлаждали в фосфатном буфере (рН 7,4). Извлеченный орган сначала разрезался на крупные части, а затем пинцетом выщипывались более мелкие фрагменты. Полученная взвесь ресуспензировалась, затем отфильтровывалась. Сконцентрированные путем центрифугирования тимоциты помещались в фосфатный буфер. Экспериментальный окислительный стресс вызывался обработкой суспензии тимоцитов пероксинитритом в концентрации 50 и 100 мкмоль/л. Для подготовки к АСМ-исследованиям тимоциты помещались на обезжиренное предметное стекло и инкубировались при комнатной температуре в течение 1 и 2 ч. Затем тимоциты фиксировали 1%-м глутаровым альдегидом (20 мин), однократно промывали в фосфатном буфере и трехкратно – в дистиллированной воде. При обработке глутаровым альдегидом клетки сохраняют воду и их АСМ-изображение идентично изображению нативного лимфоцита, в котором четко определены границы клетки, однако ядро и гранулы не выявляются [4].

АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе НТ-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Обработку данных, полученных на атомно-силовом микроскопе, осуществляли с помощью программы SurfaceExplorer (ОДО «Микротест-

машины», Беларусь). Для оценки поперечных размеров и общих особенностей структуры тимоцитов использовали матрицы сканирования порядка 9×9 мкм, а для исследования деталей поверхностных клеточных структур применяли матрицу сканирования размером $1,5 \times 1,5$ мкм. Статистическую оценку полученных результатов производили стандартными методами в программе Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Проведенные АСМ-исследования показали, что форма отдельных адгезированных интактных тимоцитов куполообразная, а их поверхность характеризуется относительно плавным рельефом, диаметр составляет $5,8 \pm 0,3$ мкм ($n = 42$) (рис. 1).

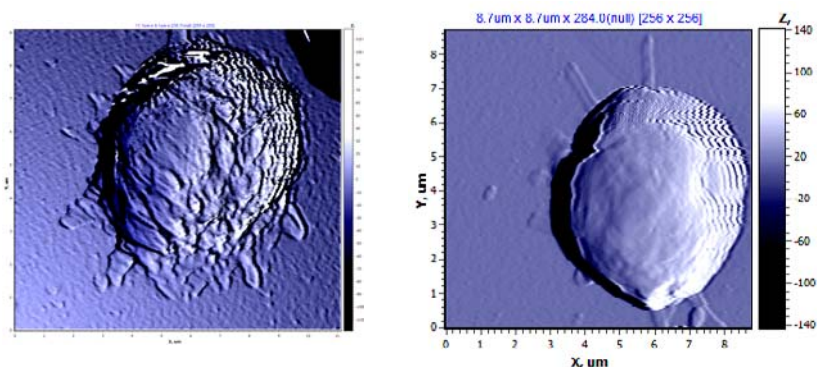


Рис. 1. Интактные тимоциты (карта вертикальных отклонений АСМ-консоли)

Т-лимфоциты обладают хорошо развитым цитоскелетом с интенсивно происходящими в нем процессами полимеризации и деполимеризации основного белка микрофиламентов – актина [7], непосредственно участвующего в образовании филоподий. Образование филоподий обуславливает функциональную способность клеток к активной миграции из капилляров в прилегающие ткани, что позволяет клеткам иммунной системы находиться в состоянии постоянной циркуляции между кровью, лимфой и лимфоидными органами [8].

Наши данные (рис. 2) подтверждают представления о том, что для интактных тимоцитов характерно наличие филоподий, которые образуются в результате постоянной перестройки цитоскелета. Эти процессы происходят при активации, адгезии и миграции клеток.

Филоподии тимоцитов, как правило, собраны в группы и, как свидетельствуют полученные данные (рис. 3), их размеры и количество зависят от времени адгезии. Так, при увеличении времени адгезии с одного часа до двух длина филоподий увеличивается с 1–2 нм до 3–3,5 нм, а их распределение по поверхности клеток становится более равномерным.

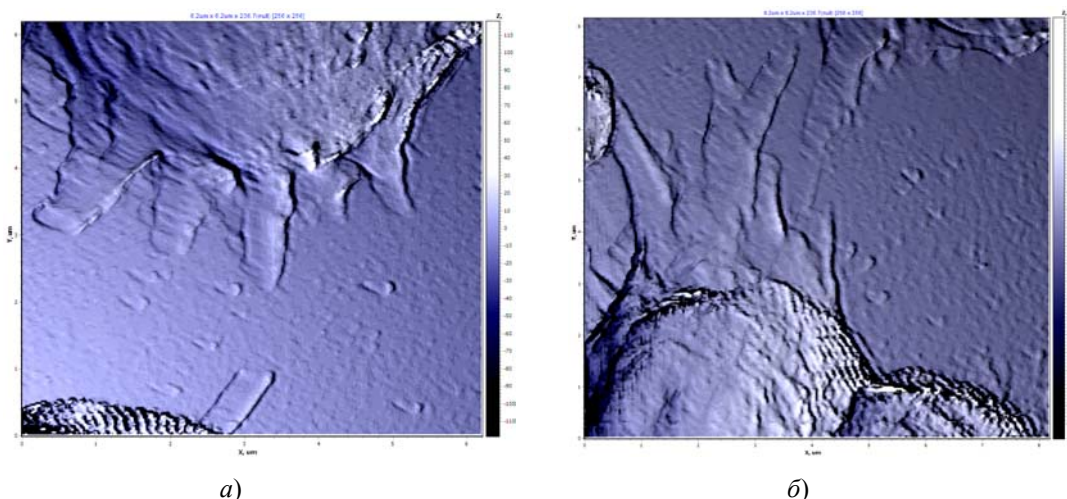


Рис. 2. Образование филоподий у тимоцитов (карта вертикальных отклонений АСМ-консоли)

Инкубация клеток с пероксинитритом оказывает сильное воздействие на процессы образования филоподий, происходит торможение полимеризации актина и усиление деполимеризации актиновых структур.

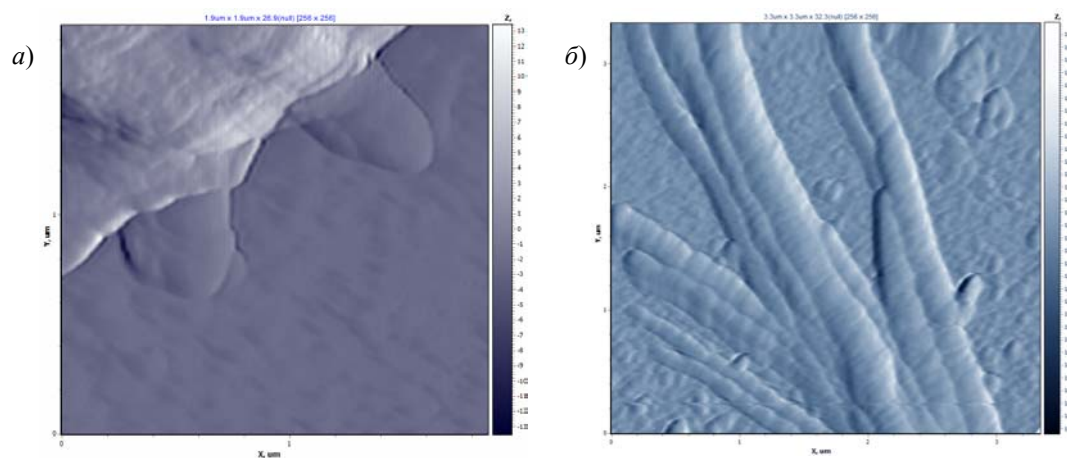


Рис. 3. Филоподии тимоцитов (карта вертикальных отклонений АСМ консоли).
a – время адгезии 60 мин, *б* – время адгезии 120 мин

При этом воздействии изменяется форма тимоцитов и, как показано на рис. 4, клетки становятся более плоскими, их диаметр увеличивается. Количество филоподий уменьшается приблизительно в два раза при воздействии пероксинитрита в 50 мкмоль/л (рис. 4, *a*), а при более высокой концентрации (100 мкмоль/л) филоподии полностью исчезают (рис. 4, *б*).

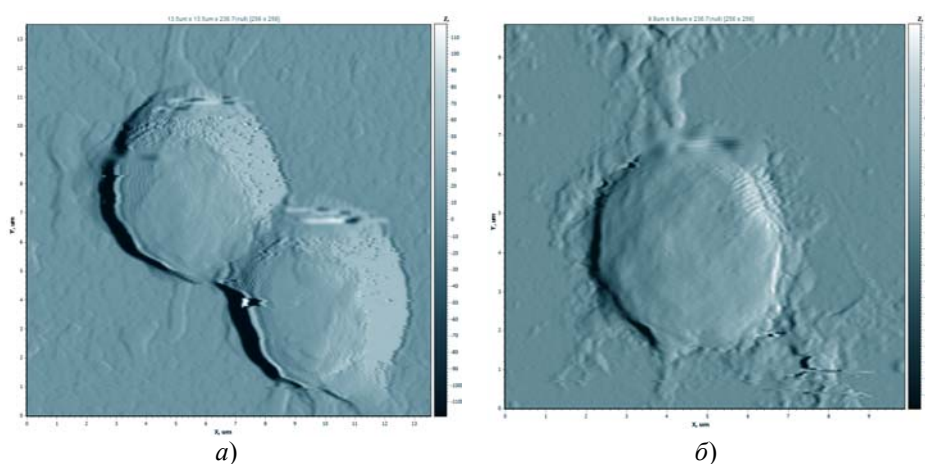


Рис. 4. Тимоциты после обработки пероксинитритом в концентрации 50 мкм (а) и в концентрации 100 мкм (карта вертикальных отклонений АСМ-консоли) – б

Более того, пероксинитрит вызывает образование на поверхности тимоцитов кратероподобных структур и инвагинаций, при этом наблюдается выброс части содержимого клеток в виде гранул размером 150–400 нм (рис. 5).

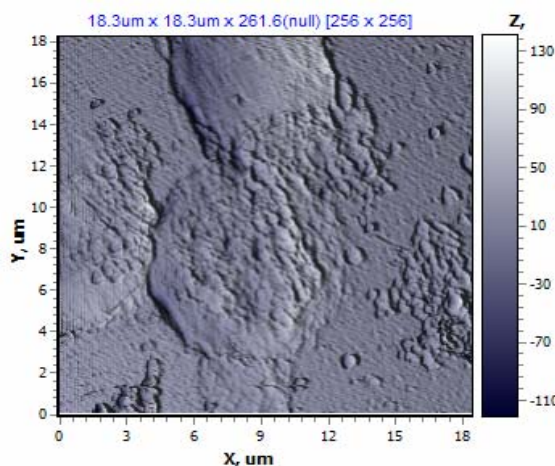


Рис. 5. Поверхность тимоцитов после обработки пероксинитритом (карта вертикальных отклонений АСМ-консоли)

Подсчет локальных максимумов на вертикальном профиле поверхности тимоцитов, полученном с помощью АСМ-анализа, показал, что при воздействии пероксинитрита в концентрации 50 и 100 мкмоль/л число выраженных структурных элементов на 1 мкм профиля увеличилось на карте вертикальных отклонений от $12,6 \pm 0,8$ у интактных тимоцитов соответственно до $17,7 \pm 0,9$ и $15,0 \pm 1,9$ ($n = 27$). Интересно отметить, что зависимость числа пиков профиля на карте вертикальных отклонений от концентрации пероксинитрита не имеет линейного характера.

Топографические изменения тимоцитов, обработанных пероксинитритом, более выражены. Так, если число структурных элементов на 1 мкм профиля поверхности интактных клеток составило $3,1 \pm 0,7$, то при обработке их пероксинитритом в концентрации 50 мкмоль/л оно возросло до $6,3 \pm 1,4$, а при воздействии 100 мкмоль/л – до $6,8 \pm 1,1$ ($n = 27$).

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что методы АСМ-анализа значительно расширяют возможности цитологических, гематологических и иммунологических исследований иммунокомпетентных клеток. АСМ позволяет выявить тонкие особенности структуры поверхности тимоцитов при действии окисляющего агента – пероксинитрита.

Работа частично выполнена при поддержке гранта БРФФИ (Б07-043).

Литература

1. Плескова С.Н., Звонкова М.Б., Гущина Ю.Ю. Использование метода сканирующей зондовой микроскопии для исследования морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов // *Морфология*. 2005. Т. 127, № 1. С. 60–62.
2. Ефремов Л.М. Строение и цитоархитектоника тимуса человека в подростковом и юношеском возрастных периодах // *Морфология*. 2002. Т. 122, № 6. С. 37–40.
3. Новицкий В.В. и др. Особенности поверхностной архитектоники лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007. № 10. С. 3–6.
4. Филиппова Н.А., Каминская Л.Ю., Михаленкова И.В. Продукты NO-синтазной активности и воспаление дыхательных путей: метаболизм, патофизиологическая роль при аллергических заболеваниях // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2006. № 8. С. 3–9.
5. Guidarelli A. et al. Reduced mitochondrial formation of H₂O₂ is responsible for resistance of dimethyl sulfoxide differentiated U937 cells to peroxynitrite // *The Intern. J. of Biochemistry & Cell Biology*. 2006. Vol. 38. Pp. 57–67.
6. Гущина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфометрических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // *Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования*. 2005. № 1. С. 48–53.
7. Samstag Y. et al. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation // *Leukocyte Biology*. 2003. Vol. 73. Pp. 30–48.
8. Клаус Дж. Лимфоциты: Методы. М.: Мир, 1990. 395 с.