



# АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Е.Горшкова, к.э.н., С.Плескова, д.б.н., Э.Михеева / e.n.gorshkova@gmail.com

**М**еханические и топографические свойства поверхности биологических объектов (морфология, микротвердость, латеральные размеры) во многом характеризуют функциональное состояние живых систем. Подробно изучать характеристики биологических объектов, рассматривать их реакцию на различные воздействия помогает в совокупности с другими методами высокоразрешающая атомно-силовая микроскопия (АСМ) [1]. Использование АСМ, как правило, не требует сложной подготовки образцов, а иногда позволяет исследовать с нанометровым разрешением "живой" биологический препарат в разных средах.

С помощью АСМ возможно исследование проводящих и непроводящих веществ. Основное требование к ним – наличие структуры с достаточной степенью жесткости (объект не должен изменяться при механическом воздействии зонда). Большинство биологических объектов обладает этими свойствами и поэтому с помощью данного метода удастся "увидеть" достаточно большое количество отдельных клеток и даже молекул [2]. Ярким примером может служить изучение эндотелиальных и эпителиальных клеток [3], ДНК [4], молекул коллагена [5].

Проведенные исследования направлены на изучение клеток крови – важнейшей физиологической и иммунологической составляющей внутренней среды человека. По их функциональному состоянию можно судить о патологических процессах в организме, что эффективно используется в лабораторной и медицинской практике.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе исследовались свойства поверхности нейтрофилов и эритроцитов в нативном состоянии и под воздействием наноразмерных флуоресцентных частиц. Использовалась кровь здоровых доноров. Форменные элементы крови выделялись центрифугированием (40 мин, 1500 об/мин). Все измерения проводились на установке SOLVER BIO (NT-MDT, Зеленоград) (рис.1).

Установка входит в состав лаборатории АСМ научно-образовательного центра "Физика твердотельных наноструктур" ННГУ им.Лобачевского (Н.Новгород). Она включает оптический

инвертированный микроскоп и установленную на нем измерительную АСМ-головку. Исследование топографии поверхности и упругих свойств клеток производились *in vitro* и в фиксированном состоянии в полуконтактном и контактном режимах.

## ТОПОГРАФИЯ ПОВЕРХНОСТИ ФИКСИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Исследование зафиксированных образцов кроме удобства хранения и транспортировки имеет и другие преимущества. Например, зафиксировав клетки



Рис.1. АСМ-установка SOLVER BIO

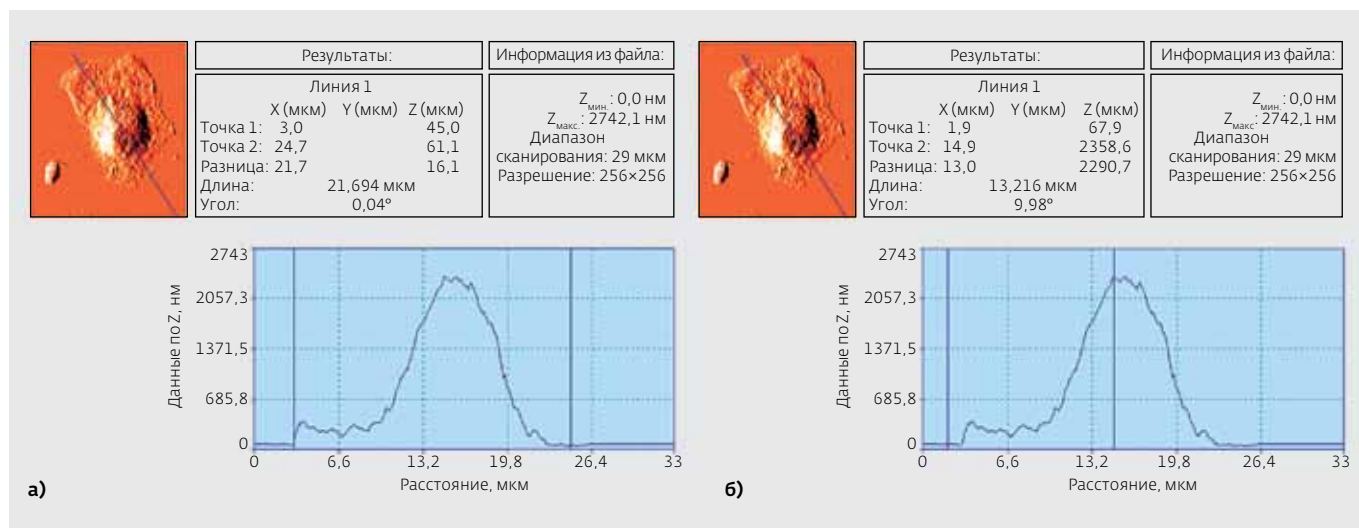


Рис.2. Нейтрофил, фиксированный глутаровым альдегидом: а – диаметр нейтрофила; б – высота нейтрофила

через определенное время после начала воздействия, можно сопоставить результаты, полученные от разных доноров или при различных условиях.

На базе лаборатории была создана сертифицированная методика измерений фиксированных нейтрофилов и лимфоцитов, в основе которой – их фиксация глутаровым альдегидом и последующие исследования на АСМ. Методика включает контактный режим измерения, как наиболее точно передающий топографические и размерные характеристики фиксированного биологического объекта. На АСМ-изображении четко визуализируются ядро и гранулы, причем существует возможность определения латеральных размеров нейтрофилов и их высоты (рис.2).

Активно разрабатываются флуоресцентные наноматериалы для биоимиджинга и исследуются механизмы их влияния на живые объекты. В экспериментах для этих целей применялись покрытые меркаптопропионой

кислотой квантовые точки CdSe/ZnS размером 12 нм производства ООО "НТИЦ "Нанотех-Дубна". Нейтрофильные гранулоциты инкубировались в их присутствии (30 мин, 37°С), а затем фиксировались. В результате образовывались атипичные псевдоподия, и визуализировалось полное или частичное разрушение клеток (рис.3).

Аналогичные исследования проводились с эритроцитами. На контрольных сканах наблюдались классические двояковогнутые диски с четко оформленными краями и впадинами диаметром  $7,7 \pm 0,72$  мкм. После воздействия квантовых точек морфология эритроцитов изменялась: клетки "набухали", их диаметр увеличивался до  $11,2 \pm 0,98$  мкм (рис.4). Таким образом, применив АСМ для изучения воздействия квантовых точек на нейтрофилы и эритроциты человека, удалось получить результаты, проиллюстрированные изображениями топографии клеток до и после воздействия этих точек.

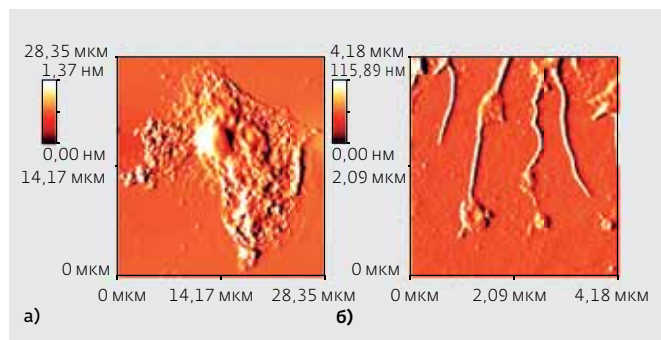


Рис.3. Нейтрофильный гранулоцит после взаимодействия с квантовыми точками: а – вся клетка, б – отдельные псевдоподии

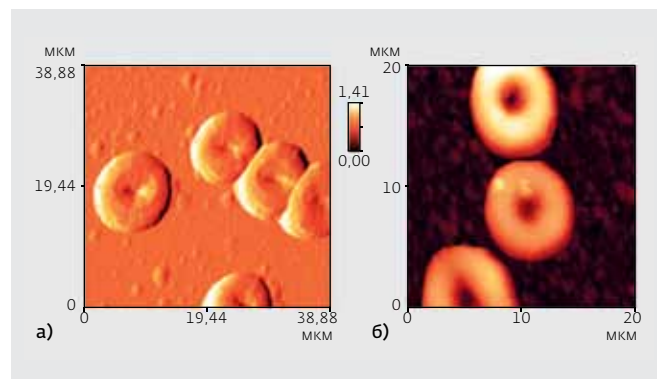


Рис.4. Эритроциты человека: а – до инкубации с квантовыми точками; б – после такой инкубации

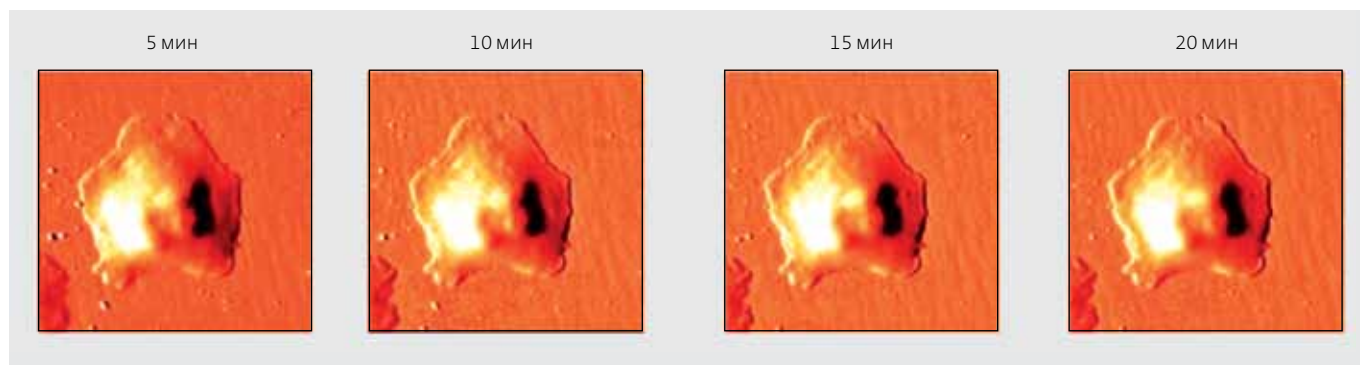


Рис.5. Нейтрофилы в физиологическом растворе на чашках Петри (АСМ-изображения в режиме реального времени)

### ТОПОГРАФИЯ ПОВЕРХНОСТИ И УПРУГИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЖИВЫХ КЛЕТОК

В исследовании живых клеток использовались нейтрофилы. Благодаря рецепторам (селектинам и интегринам) поверхности этих клеток обладают хорошей адгезионной способностью и поэтому подходят для изучения методом АСМ в условиях, максимально приближенных к естественным. Выделенные нейтрофилы инкубировались в чашках Петри (Coning, США) (22–24°C, 10–15 мин). В результате происходила спонтанная адгезия клеток к подложке.

Топография поверхности нативных клеток исследовалась в состоянии *in vitro* в полуконтактном режиме зондом DNP (Veeco, США) из нитрида кремния с золотым напылением. Кантилевер устанавливался на специальный держатель для работы в жидких средах и опускался в установленную на оптический микроскоп чашку Петри с клетками. Какие-либо значительные изменения в их морфологии в ходе контрольного сканирования (5–20 мин) не наблюдались (рис.5).

В качестве альтернативного "повреждающего" фактора использовались наночастицы, флуоресцирующие за счет комплексов редкоземельных

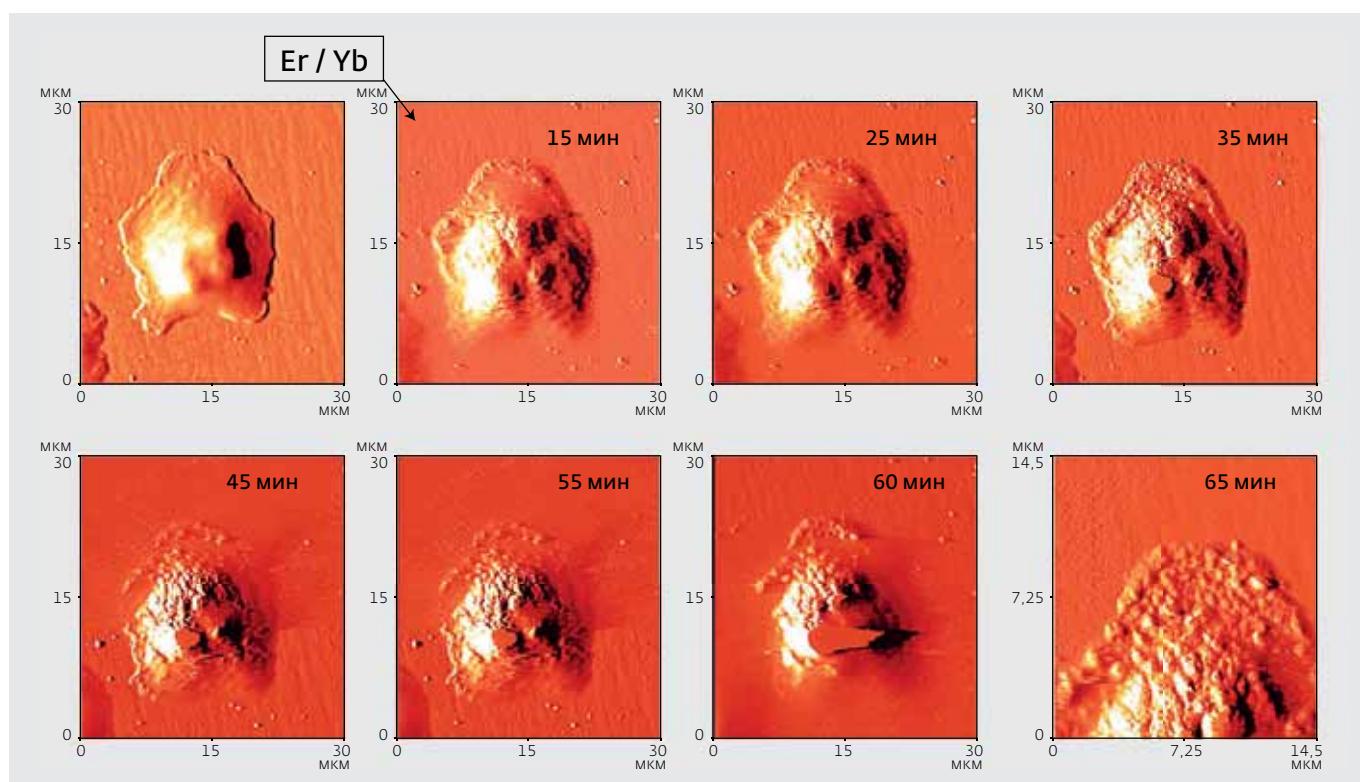


Рис.6. Нейтрофильные гранулоциты под влиянием наноразмерных флуорофоров на основе Er, Yb (АСМ-изображения в режиме реального времени)





элементов Yb, Eг и являющиеся перспективными маркерами для биологических целей. После инкубации с такими наночастицами (30 мин, 37°C) наблюдались проявления их негативного воздействия, выразившиеся в морфологических изменениях клеток (набухание, образование псевдоподий, разрушение и гибель) (рис.6).

Эти изменения можно было наблюдать в режиме реального времени и фиксировать интервал от начала исследований до определенного события, что относится к преимуществам рассматриваемой методики изучения живых клеток. Кроме того, имелась возможность исследовать упругие свойства мембран таких клеток до и после воздействия на них нанообъектов.

Для оценки ригидности мембран использовался метод силовых кривых, в котором применялся режим спектроскопии АСМ. Метод основан на измерении смещения кривой на графике диапазона отклонения кантилевера в зависимости от упругости поверхности исследуемого образца. Ригидность мембран оценивалась по модулю Юнга, рассчитанному согласно теории Герца [6], в которой рассматривается взаимоотношение жесткой полусферы (зонда) и бесконечной плоскости (биологического образца, площадь которого по сравнению с зондом бесконечно велика). Исследование поверхности клеток проводилось в физиологическом растворе с использованием контактных зондов MSCT-Au (Veeco, США). В экспериментах показатели упругости мембраны нейтрофилов сравнивались до и после добавления флюорофора. Для этого проводилось обзорное сканирование поля размером 60×60 мкм и выбиралось несколько клеток. После 20 контрольных измерений одной из клеток в чашку Петри добавлялись исследуемые наночастицы. После инкубации (30 мин, 37°C) проводилось 20 измерений на клетке, не подвергавшейся при контрольных измерениях механическому воздействию зонда. Это делалось во избежание совместного влияния - наночастиц и механического воздействия. Ригидность мембраны нативных клеток составила 26,46±2,49 кПа. Затем на клетки воздействовали наночастицами, в результате чего модуль Юнга мембраны нейтрофилов снижался до 19,07±3,34 кПа (рис.7).

Итак, метод АСМ позволяет решать широкий спектр задач и может применяться в том числе в новом направлении биологических исследований - нанотоксикологии. Следует подчеркнуть, что полученные результаты подкреплены такими классическими и зарекомендовавшими себя методами, как цитохимический и спектрофотометрический.

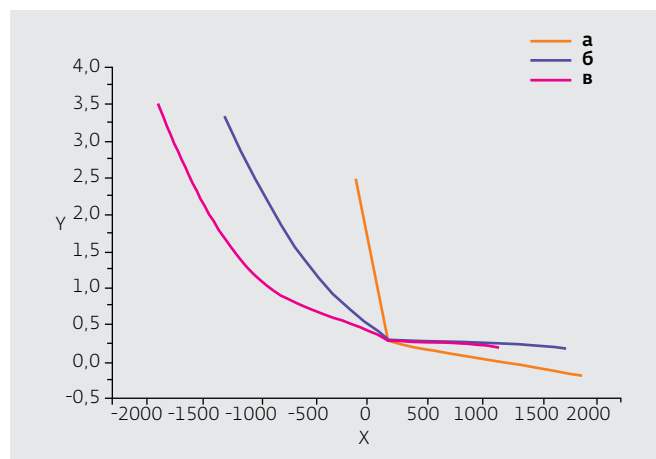


Рис.7. Силовые кривые при взаимодействии зонда с поверхностью: а – чашки Петри; б – нейтрофила без альтерирующего воздействия; в – нейтрофила после взаимодействия с флуоресцентными наночастицами

В целом важно отметить, что легкость пробоподготовки, наглядность и высокая точность делают АСМ незаменимой для современных биологических исследований.

### Литература

1. **Ohnishi S., Murata M., Hato M.** Correlation between Surface Morphology and Surface Forces of Protein A Adsorbed on Mica . – *Biophys. J.*, 1988, v.74, p.455-465.
2. **Touhami A., Othmane A., Ouerghi O., Ouada H.B., Fretigny C., Jaffrezic-Renault N.** Red blood cells imaging and antigen-antibody interaction measurement . – *Biomol. Eng.*, 2002, v.19(2-6), p.189-193.
3. **Grimellec C., Lesniewska E., Cachia C., Schreiber J.P., Fornel F., Goudonnet J.P.** Imaging of the Membrane Surface of MDCK Cells by Atomic Force Microscopy. – *Biophys. J.*, 1994, v.67, p.36-41.
4. **Lyubchenko Y, Shlyakhtenko L, Harrington R, Oden P., Lindsay S.** Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water. – *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, v.90, p.2137-2140.
5. **Гущина Ю.Ю., Плохов Р.А., Зевеке А.В.** Исследование влияния обводнения, pH и модуляторов протеогликанов на морфологию фибрилл и субволокон коллагена. – *Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского*, 2007, № 1, с.114-118.
6. **Hassan E.A., Heinz W.F., Antonik M.D., D'Costa N.P., Nageswaran S., Schoenenberger C.A., Hoh J.H.** Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. – *Biophysical Journal.*, 1998, v.74, p.1564-1578 .