

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 12868

(13) С1

(46) 2010.02.28

(51) МПК (2009)
G 01N 13/10

(54)

СПОСОБ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА НАТИВНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

(21) Номер заявки: а 20071252

(22) 2007.10.16

(43) 2009.06.30

(71) Заявитель: Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Кузнецова Татьяна Георгиевна; Стародубцева Мария Николаевна; Егоренков Николай Иванович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) NOWAKOWSKY R. et. al. Biochimica et Biophysica Acta, 2001.- V. 1514.- P. 170-176.

СТАРОДУБЦЕВА М.Н. и др. Актуальные проблемы медицины. Вып. 6. Сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции.- Гомель, 2005.- С. 6-8.

RU 2282902 C2, 2006.

US 5383354 A, 1995.

ВУ 3936 С1, 2001.

(57)

Способ исследования цитоскелета нативных эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии, включающий выделение эритроцитов из гепаринизированной крови центрифугированием, их отмывку фосфатным буфером и проведение атомно-силовой микроскопии при комнатной температуре, **отличающийся** тем, что после отмывки эритроциты наносят на предметное стекло в виде мазка, мазок высушивают при комнатной температуре, а атомно-силовую микроскопию проводят на атомно-силовом микроскопе NT-206 в контактном режиме сканирования с шагом не более 2 нм, при этом визуализируют изображения карт латеральных сил участков поверхности эритроцита, контрастируют их с помощью фильтров изображений и рассчитывают на картах фрактальные размерности D_f структур цитоскелета.

Изобретение относится к биологии, а именно - к клеточной биологии, и может быть использовано для оценки качественных и количественных характеристик архитектуры цитоскелета нативных эритроцитов.

Известны два основных способа, которые применяют для визуализации и структурного анализа клеточного цитоскелета - электронная микроскопия [1] и иммунофлуоресцентная микроскопия [2]. Оба являются стандартными, но имеют ряд недостатков.

При использовании электронной микроскопии клетки фиксируют глутаровым альдегидом, дегидратируют в этаноле и ацетоне, контрастируют четырехокисью осмия, пропитывают заливочными средами и изготавливают ультратонкие срезы, которые исследуют в трансмиссионном электронном микроскопе, либо, применяя замораживание-скальвание,

изготавливают углеродные реплики, которые исследуют в сканирующем электронном микроскопе. Недостатками этого способа является то, что клетки подвергают жесткой процедуре подготовки, исключая возможность изучения нативных клеток, а получаемая информация о цитоскелетных структурах является опосредованной.

В случае иммунофлуоресцентной микроскопии антитела к определенным цитоскелетным белкам связывают с флуоресцентными красителями, обрабатывают клетки этими антителами и исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа. Этот способ не позволяет достигать высоких разрешений изображений, а регистрируемые результаты зависят от проницаемости клеточной мембраны для флуоресцентных красителей.

Оба способа требуют дорогостоящих реактивов и оборудования.

Третий способ - атомно-силовая микроскопия (АСМ) - появился недавно и основан на сканировании поверхности закрепленным на чувствительной консоли зондом с радиусом кривизны острия порядка десятков нанометров, в ходе которого регистрируют отклонения острия зонда и силы взаимодействия различной природы, возникающие между острием зонда и исследуемой поверхностью. В зависимости от природы регистрируемых сигналов, в статическом режиме сканирования поверхность образца визуализируется тремя типами АСМ-изображений: топографией, картой латеральных сил (отражающей латеральные (боковые) отклонения зонда) и картой вертикальных отклонений зонда.

Этот метод сочетает простую и предельно щадящую процедуру подготовки клеток, возможность одновременной оценки топографических и механических параметров исследуемых объектов с высоким (нанометровым) разрешением.

Известны три способа АСМ-анализа цитоскелета эритроцитов.

Согласно первому способу, выделенные центрифугированием эритроциты наносят на покровное стекло, покрытое лектином, с помощью механического и осмотического стресса получают открытые тени эритроцитов, которые фиксируют глутаровым альдегидом, промывают водой, высушивают при комнатной температуре, и проводят АСМ-исследование цитоскелетных структур на цитоплазматической стороне мембраны теней в воздушной среде в динамическом режиме. Анализ структурной организации цитоскелета проводят с использованием АСМ-изображений топографии. Для количественной оценки цитоскелета рассчитывают отношение площади, занятой элементами цитоскелета, к общей площади участка мембраны теней эритроцитов, измеряют длину и высоту актиновых филаментов с помощью кривых профилометрии [3].

Согласно второму способу, выделенные центрифугированием эритроциты наносят на покровное стекло, обработанное поли-L-лизином, получают с помощью механического и осмотического стресса открытые тени эритроцитов, которые фиксируют 1 % глутаровым альдегидом, исследуют цитоскелет теней в статическом режиме АСМ-сканирования в изотоническом буфере. Для количественной оценки структур цитоскелета анализируют АСМ-изображения топографии с применением стандартных фильтров изображений, измеряют длину и высоту актиновых филаментов с использованием кривых профилометрии. Плотность распределения цитоскелетной сети оценивают визуально [4].

Недостатками обоих известных АСМ-способов является то, что проводят структурный анализ цитоскелета эритроцитарных теней, а не нативных клеток; используемая процедура осмотического лизиса может заметно влиять на организацию мембраны и структуру цитоскелета; невозможно сопоставление общей морфологии эритроцитов с особенностями их цитоскелета.

Наиболее близким к предлагаемому является способ, согласно которому, выделенные центрифугированием эритроциты гепаринизированной крови закрепляют на стеклянной подложке, обработанной поли-L-лизином и 1 % водным раствором глутарового альдегида, фиксируют эритроциты 1 % буферным раствором глутарового альдегида, промывают фосфатным буфером, проводят АСМ-исследование нативных эритроцитов в фосфатном буфере при комнатной температуре, проводят количественные измерения длины цитоске-

летных филаментов на АСМ-изображениях топографии мембранной поверхности, визуально оценивают характер пространственного распределения цитоскелетных элементов на АСМ-изображениях топографии мембранной поверхности. [5] (прототип).

Недостатками прототипа является слабая выраженность (расплывчатость) структуры цитоскелета на АСМ-изображениях топографии, что не позволяет проводить подробный количественный анализ структуры цитоскелета эритроцитов, а также использование только качественной (визуальной) оценки сложности структурной организации эритроцитарного цитоскелета.

Задача, на решение которой направлено предполагаемое изобретение, заключается в повышении контрастности при визуализации цитоскелета нативных эритроцитов и расширении возможностей количественного анализа его структурной организации.

Задача решается за счет того, что способ исследования цитоскелета нативных эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии, включающий выделение эритроцитов из гепаринизированной крови центрифугированием, их отмывку фосфатным буфером и проведение атомно-силовой микроскопии при комнатной температуре, причем после отмывки эритроциты наносят на предметное стекло в виде мазка, мазок высушивают при комнатной температуре, атомно-силовую микроскопию проводят на атомно-силовом микроскопе NT-206 в контактном режиме сканирования с шагом не более 2 нм, при этом визуализируют изображения латеральных сил участков поверхности эритроцита, контрастируют их с помощью фильтров изображений и рассчитывают на картах фрактальные размерности D_F структур цитоскелета.

Пример.

На основании протокола научных исследований Гомельского государственного медицинского университета по теме "Цитоморфометрическая оценка адаптационных реакций клеточных систем на стрессорные факторы различной степени напряженности", данным способом были исследованы эритроциты крови 10 здоровых добровольцев. 3 капли гепаринизированной донорской крови добавляли в пробирку с 1 мл раствора 1 % глутарового альдегида на стандартном фосфатном буфере с рН 7,4 (время фиксации - 20 минут). Суспензию эритроцитов центрифугировали 3 мин при 1,5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а эритроцитарный осадок ресуспендировали в 1 млм фосфатного буфера и повторно центрифугировали. Процедуру промывания фосфатным буфером повторяли дважды. Затем эритроциты таким же способом дважды отмывали в дистиллированной воде. Полученный эритроцитарный осадок использовали для приготовления мазков на стеклянных подложках, изготовленных из предметных стекол. Мазки высушивали при комнатной температуре в течение 5-8 часов, в закрытых чашках Петри, чтобы избежать загрязнения.

АСМ-исследование проводили на атомно-силовом микроскопе "NT-206" (МикроТест-машины Со., Беларусь), используя стандартные силиконовые иглы CSC38. Использовали контактный режим сканирования, регистрируя изображения топографии и карт латеральных сил. Для визуализации цитоскелета использовали изображения карт латеральных сил, т.е., боковых отклонений зонда. Для каждого донора исследовали не менее 5 эритроцитов, для каждой клетки исследовали участки мембранной поверхности размером 5×5 д.м² и $1,5 \times 1,5$ мкм² с шагом сканирования не более 2 нм. Для усиления контрастности исходные изображения обрабатывали с использованием сглаживающих и контрастирующих фильтров изображений, входящих в пакет программы обработки АСМ-изображений "SurfaceXplore", прилагаемый к атомно-силовому микроскопу "NT-206". Сглаживающие фильтры применяли для уменьшения погрешностей изображений, появляющихся в результате процесса сканирования образцов. Контрастирующий фильтр использовался для усиления контрастности изображения и получения отчетливых границ структурных особенностей образцов. Для подтверждения того, что выявленные структуры принадлежат цитоскелету, их сравнивали с изображениями, полученными с помощью других методов, а

ВУ 12868 С1 2010.02.28

также с известными параметрами теоретических моделей цитоскелета эритроцитов. Для количественной оценки сложности структуры цитоскелета рассчитывали фрактальную размерность карт латеральных сил участков поверхности эритроцитов (D_F) методом "периметр-площадь" (по 200 сечений для каждого изображения), с помощью модуля "Fractal", входящего в программный пакет "SurfaceXplore". Статистическая обработка данных была сделана с использованием стандартных процедур программы "Microsoft Excel".

Предлагаемый способ анализа цитоскелета эритроцитов не требует сложной процедуры подготовки образцов и дорогостоящих реактивов; он позволяет получать четкие изображения подмембранных цитоскелетных структур нативных эритроцитов; обеспечивает возможность тонкого количественного анализа цитоскелетной организации нативных клеток, следовательно, увеличивает возможности выявления различий при сравнительном исследовании клеточных популяций, в том числе и в экспериментах по воздействию на клетки различных повреждающих факторов; позволяет одновременно анализировать особенности цитоскелета, топографии мембранной поверхности и общей морфологии эритроцитов. Предлагаемый способ может быть также использован для исследования подмембранных структур других клеток, а также в материаловедении.

Используемая литература:

1. Braet F. Structure and dynamic of the fenestrae-associated cytoskeleton of rat liver sinusoidal endothelial cells/F. Braet, R.De Zanger., M.Baekeland, E.Grabbe, P.Smissen, E.Wisse//Hepatology.- 1995.- Vol. 21.- P. 180-189.
2. Webster R.E. Visualization of the same PtK2 cytoskeleton by both immunofluorescence and low power electron microscopy/R.E.Webster, M.Osborn, K, Weber//Exp.cell.res.- 1978.- Vol. 117.- P 47-61.
3. Lui, F. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy./F.Lui, H.Mizukami, Sh.Sarnaik, A.Ostafm//Journal of Structural Biology.- 2005.- Vol. 150.- P. 200-210.
4. Swihart, A. H. Atomic force microscopy of the erythrocyte mem brane skeleton./A.H. Swihart, J.M.Mikrut, J.B. Kertterson, R.C.Macdonold//Journal of Microscopy.- 2001.- Vol. 204(3).- P. 212-225.
5. Nowakowki, R. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy./R. Nowakowki, P. Luckham, P.Winlove/Biochimica et Biophysica Acta.- 2001.- Vol. 1514.- P. 170-176.