

23. Mathur, A. B. Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells / A. B. Mathur, G. A. Truskey, W. M. Reichert // *Biophysical Journal*. — 2000. — Vol. 78. — P. 1725–1735.

24. Costa, K. D. Analysis of indentation: implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy / K. D. Costa, F.C.P. Yin // *Journal of Biomechanical Engineering*. — 1999. — Vol. 121. — P. 462–471.

25. Quantitative analyses of topography and elasticity of living and fixed astrocytes / Y. Yamane [et al.] //

Journal of Electron Microscopy (Tokyo). — 2000. — Vol. 49, № 3. — P. 463–471.

26. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy / A. B. Mathur [et al.] // *Journal of Biomechanics*. — 2001. — Vol. 34. — P. 1545–1553.

27. You, H. X. Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects / H. X. You, L. Yu // *Methods Cell Sci*. — 1999. — Vol. 21, № 1. — P. 1–17.

Поступила 15.05.2007

УДК 576.3/7:616-076

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков

Гомельский государственный медицинский университет

С помощью методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучены поверхностные слои лимфоцитов периферической крови человека, адгезированных на стеклянной подложке и фиксированных 1% глутаровым альдегидом. Выявлены качественные и количественные различия в тонкой структурной организации мембраны и подмембранных областей малых и средних лимфоцитов. Для оценки количественных различий структур был использован фрактальный анализ АСМ изображений.

Ключевые слова: лимфоциты, атомно-силовая микроскопия, фрактальный анализ.

ANALYSIS OF PECULIARITIES OF HUMAN LYMPHOCYTE SURFACE STRUCTURE BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

I. A. Nikitina, M. N. Starodubtseva, T. G. Kuznetsova, N. I. Yegorenkov

Gomel State Medical University

Surface layers of peripheral blood lymphocytes which were adhered on glass plate and fixed with 1% glutaraldehyde were examined with atomic force microscopy methods. Qualitative and quantitative differences in fine structural organization of membrane and underlying layers of small and middle lymphocytes were revealed. Fractal analysis was used for quantitative evaluation of the structure differences.

Key words: lymphocytes, atomic force microscopy method, fractal analysis.

Введение

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет изучать структуру и механические свойства мембран и подмембранных слоев клеток с высоким пространственным разрешением (нанометровым разрешением). Ранее нами были с успехом применены методы АСМ к изучению особенностей изменения мембранных структур эритро-

цитов человека при действии активных форм азота [1]. Целью данной работы являлось выявление АСМ методами особенностей структуры мембран и подмембранных слоев различных типов лимфоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы

Выделение лимфоцитов. Лимфоциты выделялись из периферической крови здоро-

вых людей путем центрифугирования в градиенте плотности фикол-верографина [2]. Кровь разбавляли равным объемом буфера и аккуратно наслаивали на градиент плотности фиколл-верографина и центрифугировали. При этом эритроциты и гранулоциты осаждались на дно пробирки. Лимфоциты, локализованные в интерфазном кольце, собирали и трижды отмывали в натрий-фосфатном буфере (рН = 7,0). Содержание лимфоцитов в полученной фракции составляло не менее 96%.

Атомная силовая микроскопия (АСМ) поверхности лимфоцитов и анализ АСМ данных. При подготовке препаратов для проведения АСМ исследований лимфоциты помещали на предметное стекло для адгезии в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки подвергали химической фиксации с помощью 1% глутарового альдегида (10 мин). Препарат лимфоцитов отмывали один раз в буферном растворе (рН = 7,4) и два раза — в дистиллированной воде.

Предварительный анализ данных проводился с помощью световой микроскопии (Olympus $\times 800$) и аппаратно-программного комплекса «Хромосома 1». Препараты лимфоцитов окрашивались по Романовскому-Гимза.

АСМ исследования проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашины», Беларусь) в статическом режиме сканирования с использованием иглы типа CSC38 («МикроМаш», Россия). Записывали топографию, карты вертикальных отклонений консоли АСМ при сканировании поверхностей и карты латеральных сил участков поверхности клеток. Карта латеральных сил поверхности лимфоцитов отражает неоднородность механических свойств поверхности и подповерхностных областей клеток. Она выявляет структурные особенности этих областей более контрастно в сравнении с топографией.

Для количественной оценки структуры поверхности клеток и ее особенностей был проведен фрактальный анализ карт латеральных сил площадью ($0,5 \times 0,5 \text{ мкм}^2$), вырезанных из карт размером $1,5 \times 1,5 \text{ мкм}^2$, разрешением 256×256 пикселей. Размеры клеток и фрактальную размерность определяли с помощью программы «SurfaceXplore 1.3.11» (МикроТестМашины, Беларусь). Для расчета фрактальной размерности был

использован метод «площадь-периметр» с делением трехмерной поверхности на 200 слоев. Фрактальную размерность определяли на 2–6 картах каждой клетки, равномерно распределенных по ее поверхности.

Статистический анализ данных. Для статистического анализа данных использовался пакет «Statistica 6.0». Результаты измерений представлены в виде доверительного интервала с доверительной вероятностью 95%. Размер выборки обозначается n (количество изученных измерений, сделанных с помощью АСМ). Сравнения выборочных характеристик производили с использованием критерия Стьюдента для независимых групп.

Результаты и их обсуждение

Выбранный нами метод фиксации лимфоцитов глутаровым альдегидом на стеклянной поверхности, относительно непродолжительная адгезия и отсутствие в среде Ca^{2+} позволили сохранить форму клеток близкую к той, что наблюдается в суспензии клеток. Кроме того, при этом есть возможность изучать начальные этапы адгезии клеток на поверхности. АСМ является эффективным методом изучения мембраны и подмембранных структур лимфоцитов. К таким структурам, в первую очередь, относится цитоскелет. Лимфоциты характеризуются хорошо выраженным цитоскелетом: микротрубочками, промежуточными виментиновыми филаментами и микрофиламентами. Последние в покоящихся лимфоцитарных клетках сосредотачиваются непосредственно под плазмолеммой. Адгезия лимфоцитов в течение более 60 мин и присутствие в среде ионов Ca^{2+} приводит к сильному распластыванию клеток на поверхности, что, с одной стороны, позволяет четко выделить ядро и гранулы цитоплазмы, однако, с другой стороны, при этом теряются особенности поверхностных структур [3].

В зависимости от размеров лимфоциты разделяют на три основные группы: малые, средние и большие. В данной работе изучены особенности поверхностных слоев двух первых групп лимфоцитов, преимущественно встречающихся в периферической крови. В изученном образце крови донора фракция мелких лимфоцитов составила 90%, остальные 10% были представлены средними лимфоцитами, что соответствует данным литературы [4].

Использование атомно-силовой микроскопии позволило изучить морфологию лим-

фоцитов с высокой степенью разрешения и количественно оценить некоторые морфологические показатели. После адгезии лимфоциты изменяют свою форму с шарообразной на куполообразную с явно видимыми поверхностными и подповерхностными структурами, представленными в виде выступов размером 0,5–1,5 мкм (рисунки 1 а, б). У малых лимфоцитов заметны выросты (ламеллоподии) диаметром около 0,5 мкм, которые необходимы для миграции лимфоцитов через стенку венул. Данные структуры не характерны для средних лим-

фоцитов и могут считаться отличительной особенностью малых лимфоцитов.

По данным литературы, размер средних лимфоцитов в мазке крови составляет 8–9 мкм, а малых лимфоцитов — 6–7 мкм соответственно. Выбранные нами условия опыта с малым временем адгезии и использованием среды без ионов Ca^{2+} приводят к снижению линейных размеров исследуемых клеток крови. Размер средних лимфоцитов в условиях опыта составил $7,80 \pm 1,10$ мкм, а малых — $4,15 \pm 0,34$ мкм (таблица 1).

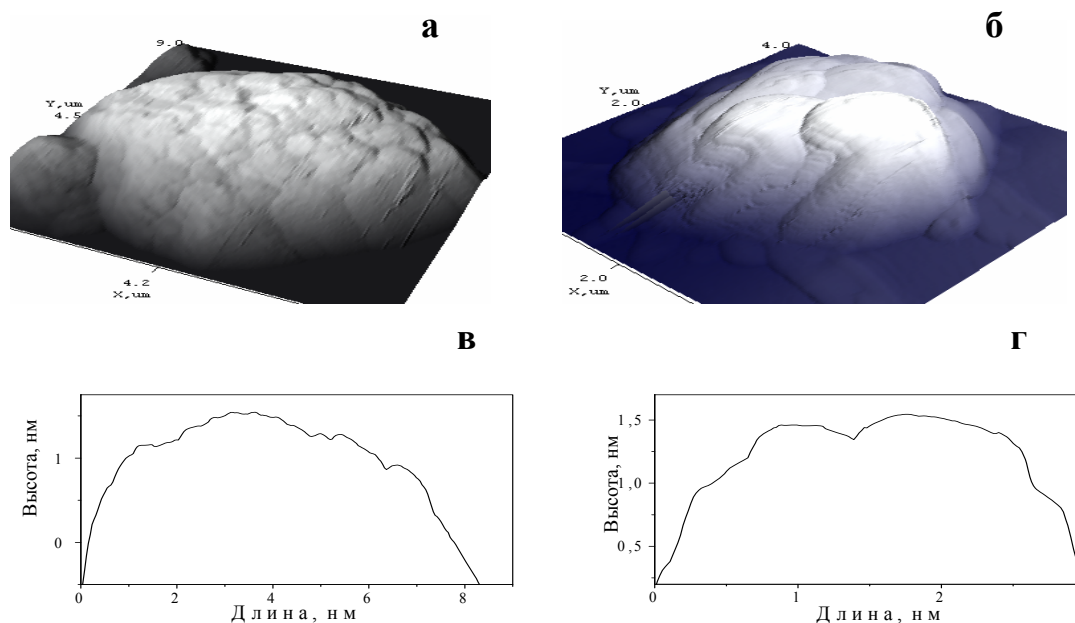
Таблица 1 — Геометрические размеры и фрактальные размерности средних и малых лимфоцитов, определенные с помощью атомно-силовой микроскопии

Показатель	Средние лимфоциты		Малые лимфоциты	
	диаметр, мкм	фрактальная размерность (D_F)	диаметр, мкм	фрактальная размерность (D_F)
Количество исследованных клеток	4		28	
Размер выборки (n)	8	50	107	154
Границы доверительного интервала ($P = 0,95$)	$7,80 \pm 1,10^*$	$2,73 \pm 0,09^{**}$	$4,15 \pm 0,35^*$	$2,85 \pm 0,04^{**}$

* — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$.

АСМ профилометрия позволяет отобразить особенности структуры рельефов различных типов лимфоцитов (рис. 1 в, г). Обнару-

жено, что поверхность средних лимфоцитов является более гладкой по сравнению с поверхностью малых лимфоцитов.



(а), (в) — средний лимфоцит. Размер изображения 9×9 мкм²
 (б), (г) — малый лимфоцит. Размер изображения 4×4 мкм²

Рисунок 1 — Топография (а, б) и профилометрия (в, г) лимфоцитов периферической крови человека

Возможности атомно-силовой микроскопии позволяют не только получать топографическое изображение лимфоцитов (рисунок 2а), но и карты вертикальных отклонений консоли и карты латеральных сил (рисунок 2б, в). Наибольший интерес представляет информация, полученная при анализе карт латеральных сил малых участков клеток ($0,5 \times 0,5 \text{ мкм}^2$). Карта латеральных сил отображает особенности структуры мембранных и подмембранных слоев, которые не проявляются на топографии, а также на карте

вертикальных отклонений АСМ консоли. По-видимому, это связано с физико-механическими взаимодействиями острия зонда АСМ с подмембранными структурами, в первую очередь с цитоскелетом. Как было отмечено выше, лимфоциты обладают хорошо выраженным цитоскелетом. Микротрубочки и микрофиламенты соединяют цитоскелетную сеть и взаимодействуют с определенными участками мембраны клеток [5], что проявляется в особенностях карт латеральных сил участков поверхности лимфоцитов.

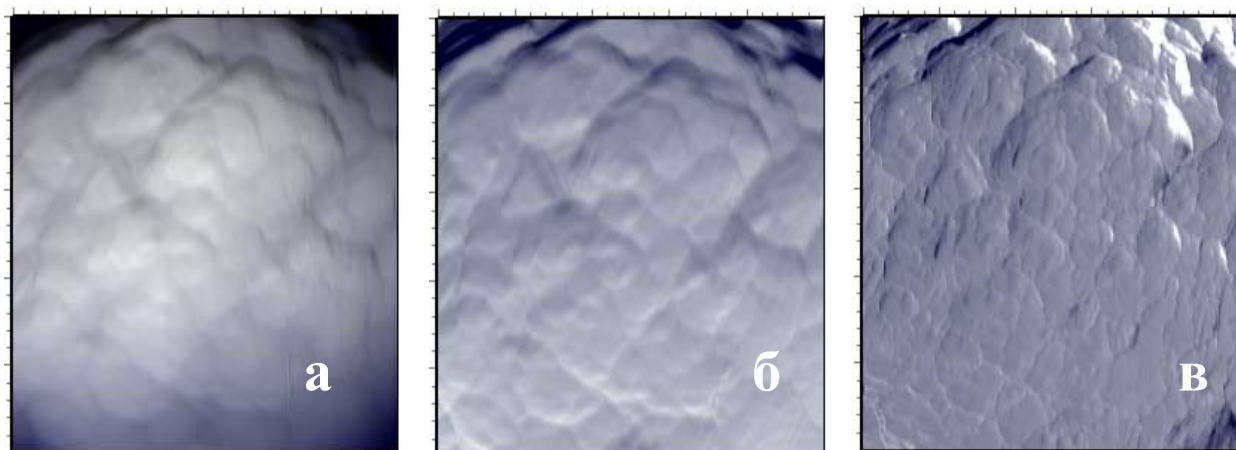


Рисунок 2 — Топография (а), карта вертикальных отклонений АСМ консоли (б) и карта латеральных сил (в) участка поверхности среднего лимфоцита. Размер изображения $5 \times 5 \text{ мкм}^2$

Микротрубочки располагаются в цитоплазме, удаленно от клеточной мембраны, в составе нескольких систем. Они обеспечивают поддержание формы и распределение компонентов клетки. С помощью атомно-силовой микроскопии их изучение весьма затруднено. Промежуточные филаменты представлены белковыми нитями, по диаметру уступающими микротрубочкам, но, как и микротрубочки, располагаются в цитоплазме. Микрофиламенты не только пучками или поодиночке лежат в цитоплазме, но и образуют зону сгущения под плазмолеммой — кортикальную сеть, характерную для большинства клеток. Основное ее функциональное назначение — предотвращение резкой деформации клетки при внешнем механическом воздействии. Основным белком микрофиламентов является актин. Находясь непосредственно под плазмолеммой сеть тонких белковых нитей, в отличие от микротрубочек и микрофиламентов, оказывает

на нее непосредственное влияние. Микрофиламенты не только располагаются непосредственно под плазмолеммой но и прикрепляются к ней при помощи интегральных белков. Кроме этого, микрофиламенты участвуют в процессах адгезии. По способности к адгезии лимфоциты уступают макрофагам и находятся примерно на одном уровне с эритроцитами [4]. Поэтому можно предположить, что именно микрофиламенты обусловили дополнительную исчерченность поверхности мембраны, отображенную на карте латеральных сил (рисунок 3).

Актиновые волокна непосредственно участвуют в образовании ламеллоподий. Их наличие обуславливает функциональную способность лейкоцитов к активной миграции и их выходу из капилляров в прилегающие ткани, что позволяет находиться в состоянии постоянной циркуляции между кровью, лимфой и лимфоидными органами [5].

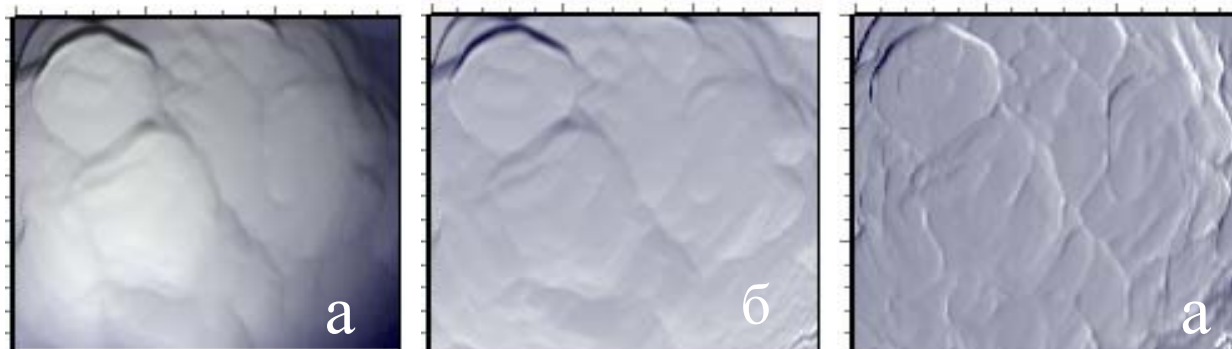


Рисунок 3 — Топография (а), карта вертикальных отклонений АСМ консоли (б) и карта латеральных сил (в) участка поверхности малого лимфоцита. Размер изображения $3 \times 3 \text{ мкм}^2$

Поверхность клеток крови невозможно с достаточной степенью точности описать, опираясь на понятия евклидовой геометрии. Для нее характерны образования неправильной формы, масштабная инвариантность, а также увеличение площади поверхности с ростом детализации. Данные свойства характерны для фракталов. Показателем, который может охарактеризовать сложность пространственной структуры подобных образований, является фрактальная размерность [6]. Она находит применение для характеристики различных биологических объектов — ветвления бронхиального дерева в легких, капилляров в теле, ветвей и корней деревьев, контуров раковых опухолей, строения ядерного хроматина, органелл клетки и др. Распространение принципов фрактальной геометрии на биологические объекты должно привести к существенному прогрессу в понимании комплексных функциональных свойств и морфологических особенностей клеток и тканей. Предполагается,

что фрактальная геометрия лежит в основе описания принципов организации живых организмов [7].

Анализ карт латеральных сил участков поверхности лимфоцитов, полученных посредством атомно-силовой микроскопии, показал, что для средних лимфоцитов фрактальная размерность составляет $2,73 \pm 0,09$, для малых — $2,85 \pm 0,04$ (таблица 1). Различие фрактальной размерности для средних и малых лимфоцитов статистически достоверно на доверительном уровне 95%. Более высокую фрактальную размерность поверхности малых лимфоцитов можно объяснить их более высоким функциональным потенциалом, способностью к распознаванию множества антигенов, в которой непосредственное участие принимают структуры клеточной мембраны. Для сравнения: средняя фрактальная размерность карт латеральных сил участков поверхности эритроцитов человека составляет $2,85 \pm 0,02$ ($n = 107$), что почти совпадает с фрактальной размерностью малых лимфоцитов.

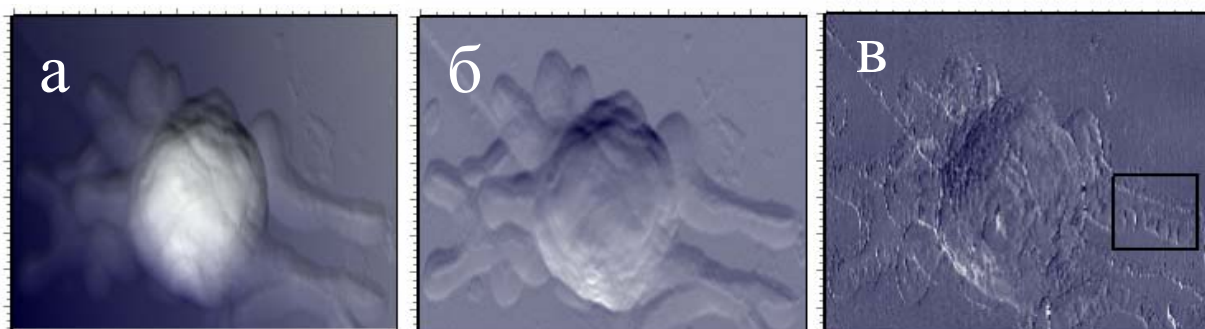


Рисунок 4 — Особенности структуры ламеллоподий лимфоцитов: (а) топография, (б) карта вертикальных отклонений АСМ консоли, (с) карта латеральных сил. Размер изображения $9,5 \times 9,5 \text{ мкм}^2$

На карте латеральных сил выделена область, показывающая структуры ламеллоподии, расположенные поперечно направлению роста ламеллоподии

Dewey T. G. и Datta M. M. [8] с помощью измерения флюоресценции энергии переноса определили фрактальную размерность агрегации белков на клеточных мембранах, как двумерных объектах. Данный подход позволил отдельно оценить фрактальную размерность различных трансмембранных систем переноса: бактериородопсина и кальций-зависимой АТФ-азы, составившую 1,6 и 1,8 соответственно. Авторы отмечают, что использование фрактальной размерности позволяет глубже заглянуть в структурные основы межбелковых взаимодействий в клеточных мембранах. Выявлено [9], что фрактальная размерность контуров, адгезированных на подложке Т-лимфоцитов (электронная фотография) здоровых людей, значительно отличается от таковой у больных острой формой лимфоидной лейкемии, что может служить надежным диагностическим признаком. Нами показано, что фрактальная размерность может с успехом использоваться для характеристики мембранных и подмембранных структур разных типов клеток, что найдет применение в количественной оценке развития патологии на клеточном уровне.

Заключение

Метод атомно-силовой микроскопии позволяет изучать морфологические особенности и тонкую структуру мембран лимфоцитов с высоким разрешением.

С использованием этого метода установлено, что топографическая организация мембранной поверхности различна у малых и средних лимфоцитов.

Подмембранный цитоскелет лимфоцитарных ламеллоподий отличается особен-

ностями пространственного распределения по сравнению с другими частями клетки.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Стародубцева, М. Н. Механические свойства мембран эритроцитов человека при действии пероксинитрита / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, С. Н. Черенкевич // Бюл. exper. биол. мед. — 2007. — Т. 143, № 2. — С. 222–230.
2. Клаус, Дж. Лимфоциты: методы / Под ред. Дж. Клауса; пер. с англ. — М.: Мир, 1990. — 395 с.
3. Гущина, Ю. Ю. Исследование различий морфометрических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии / Ю. Ю. Гущина, С. Н. Плескова, М. Б. Звонкова // Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования. — 2005. — № 1. — С. 48–53.
4. Абдулкадыров, К. М. Гематология: Новейший справочник / Под. общ. ред. К. М. Абдулкадырова. — М.: Эксмо, 2004. — 928 с.
5. Фултон, А. Цитоскелет: Архитектура и хогеография клетки / А. Фултон; пер. с англ. — М.: Мир, 1987. — 120 с.
6. Мандельброт, Б. Фрактальная геометрия природы / Б. Мандельброт; пер. с англ. А. Р. Логунова. — М.: Ин-т компьютерных исследований, 2002. — 656 с.
7. Weibel, E. R. Fractal geometry: a design principle for living organisms / E. R. Weibel // Am. J. Physiol. — 1991. — Vol. 261. — P. 361–369.
8. Dewey, T. G. Determination of the fractal dimension of membrane protein aggregates using fluorescence energy transfer / T. G. Dewey, M. M. Datta // Biophys. J. — 1989. — Vol. 56. — P. 415–420.
9. Losa, G. A. Fractal dimension of pericellular membranes in human lymphocytes and lymphoblastic leukaemia cells / G. A. Losa, G. Baumann, T. F. Nonnenmacher // Path. Res. Pract. — 1992. — Vol. 188. — P. 680–686.

Поступила 17.05.2007

УДК: 613.735:616-071

КОМПЛЕКСНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГОТОВНОСТИ СПОРТСМЕНОВ

Н. Б. Шевко

Гомельский государственный медицинский университет

Обзор посвящен проблемам медицинского тестирования функциональных возможностей квалифицированных спортсменов. В работе дано описание и охарактеризована значимость известных методов исследования, применяемых в практике спортивной медицины. Обосновано применение комплексного подхода в программе тестирования спортсменов.

Ключевые слова: функциональное состояние, тестирование, спортсмены.