

УДК 57.082.52:57.086.2/3

М. Н. СТАРОДУБЦЕВА¹, Т. Г. КУЗНЕЦОВА¹,
Н. И. ЕГОРЕНКОВ²

СПОСОБЫ ПОДГОТОВКИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

¹УО «Гомельский государственный медицинский университет»,

²УО «Гомельский государственный технический университет им. П. О. Сухого»

(Поступила в редакцию 20.06.2008)

Методами атомно-силовой микроскопии проанализированы форма и структура поверхности эритроцитов, препарированных двумя разными способами, один из которых включает химическую фиксацию клеток в суспензии, нанесение клеток на стеклянную подложку и их обезвоживание, другой — нанесение цельной крови на стеклянную подложку без химической фиксации и обезвоживание клеток. Выявлены различия формы и геометрических размеров эритроцитов, препарированных разными способами. Показано преимущество использования фиксации клеток для изучения прижизненных форм и структуры мембранного скелета эритроцитов. Для эритроцитов мазка крови зафиксировано наличие пор в плазмалемме, разрушение целостности клеток и реорганизация структуры клеточной поверхности (в диапазоне температур 45–55 °С). Для изучения физико-химических свойств плазмолеммы и мембранного скелета целесообразно использовать нефиксированные клетки.

Введение

Методы атомно-силовой микроскопии (АСМ) находят все более широкое применение в биологической и медицинской науке. Эритроциты оказались удобной моделью для АСМ-исследований различных клеточных характеристик и практически первыми клетками, которые начали изучать этими методами.

С помощью АСМ изучено изменение формы эритроцитов при варьировании кислотности и ионной силы среды, при взаимодействии с эритроцитами вирусов. Установлены особенности изменения структуры мембраны эритроцита при его адгезии к слою поли-L-лизина, при изменении формы клетки, при действии некоторых окислителей [1–5]. При использовании АСМ были обнаружены поры в мембранах эритроцитов [6], асимметричное распределение различных по составу и размерам липидных доменов во внешнем и внутреннем слоях мембран теней эритроцитов крыс как результат перекисного окисления

липидов [7]. Изучена пространственная организация мембранного скелета теной эритроцитов как в растворе, так и на воздухе и его перестройка при изменении уровня Ca^{2+} [8–10]. Обнаружено увеличение жесткости мембраны эритроцитов при врожденном сфероцитозе, талассемии и дефиците глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназы [2]. Описаны изменения поверхности эритроцитов при их нахождении в мазке крови [11].

Важным этапом АСМ эритроцитов является способ подготовки клеток. Широко применяются три основных способа: нанесение цельной крови на предметное стекло с последующим обезвоживанием клеток (эритроциты мазка крови) [6; 12]; химическая фиксация клеток в суспензии с последующим нанесением их на предметное стекло и обезвоживанием клеток (фиксированные эритроциты) [4; 13]; прикрепление живых клеток с помощью поли-L-лизина ко дну кюветы, наполняемой жидкой средой, с последующим слабым фиксированием клеток глутаровым альдегидом для предотвращения их разрушения острием АСМ-зонда при сканировании (живые клетки в жидкой среде) [2].

Целью работы являлось выявление круга исследовательских задач АСМ эритроцитов, для которых наиболее приемлемыми будут способы их препарирования либо с использованием химической фиксации в суспензии, либо мазка крови.

Материалы и методы

Эритроциты крови здоровых добровольцев, информированных о возможных рисках при процедурах взятия крови, для АСМ подготавливали двумя способами. Согласно первому способу, сначала проводили фиксацию эритроцитов в буферном растворе 0,5–2%-ного глутарового альдегида, трехкратную отмывку и нанесение клеток на обезжиренные предметные стекла размером $1 \times 1 \text{ см}^2$, после чего высушивали образцы на воздухе. По второму способу, цельную кровь наносили на подготовленные обезжиренные предметные стекла размером $1 \times 1 \text{ см}^2$ и высушивали образец на воздухе. Исследования поверхности эритроцита проводили с помощью атомно-силового микроскопа NT-206 (ОДО «Микротест-машины», Республика Беларусь). Был выбран статический режим сканирования (стандартные зонды CSC38 (MikroMasch)). Результаты статистического анализа представлены в виде границ доверительного интервала с доверительной вероятностью 0,95, в скобках указано число независимых измерений (n).

Результаты исследования и их обсуждение

Геометрические параметры эритроцитов в образцах, приготовленных разными способами. Анализ АСМ-изображений эритроцитов в образцах, полученных разными способами, показывает, что они характеризуются разными значениями геометрических и структурных параметров (рис. 1). Так, эритроциты мазка крови имеют диаметр больше, а высоту меньше, чем фиксированные в суспензии эритроциты (рис. 1, В и Г). Эритроциты мазка крови представляют собой скорее плоские, чем двояковогнутые диски, которые характерны для эритроцитов, фиксированных в суспензии (рис. 1, А и Б).

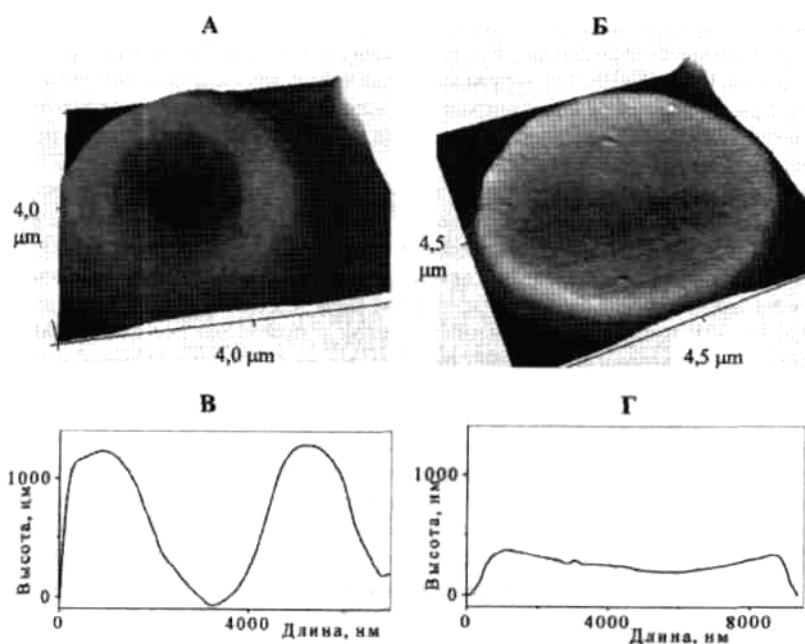


Рис. 1. АСМ-изображение (А и Б) и профиль типичного эритроцита (В и Г) мазка крови (А и В) и типичного эритроцита, фиксированного глутаровым альдегидом (Б и Г)

Эритроциты мазка крови несут в себе информацию о процессах существенной перестройки, происходящей в клетках при их взаимодействии с субстратом (подложкой) и одновременном высыхании. На поверхности таких эритроцитов наблюдаются отверстия, окаймлённые вытекшим наружу содержимым эритроцита (рис. 2). Регистрируются также частично разрушенные клетки. На рис. 3 представлено изображение эритроцита с разрывом плазмолеммы и частично вытекшим из этого разрыва содержимым эритроцита.

Метод препарирования эритроцитов, включающий их фиксацию глутаровым альдегидом, обеспечивает хорошую и продолжительную сохранность клеток при АСМ-анализе. Это подтверждается тем, что, с одной стороны, процент трансформированных форм эритроцитов для разных доноров не выходил за рамки гематологических норм, а с другой стороны, хорошо выявлялись индивидуальные различия клеток. Фиксация клеток широко используется для анализа их морфологии методами световой и электронной микроскопии. АСМ-анализ, включая профилометрию отдельных эритроцитов, позволяет сделать количественную оценку различных геометрических параметров дискоцитов, в частности, рассчитывать такие важные показатели, как объем клеток и радиус кривизны центрального углубления. Подобные расчеты затруднены или вообще невозможны при использовании методов световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Как показали наши исследования, средний диаметр дискоцитов, рассчитанный по профилограммам, варьирует у разных доноров. Для молодых здоровых доноров диаметр клеток составил $6,02 \pm 0,18$ мкм ($n = 47$). При этом максимальная высота эритроцитов не превышает $2,43$ мкм ($h = 1,98 \pm 0,08$ мкм ($n = 44$)). Диаметр эритроцитов для той же группы доноров, измеренный на СЭМ-микрофотографиях, равнялся $6,13 \pm 0,27$ мкм ($n = 68$). Эти значения близки к величинам, оцененным по АСМ-изображениям. Следует заметить, что значения диаметров, полученные как при использовании СЭМ, так и АСМ, отличаются от показателей, принимаемых за норму (согласно гематологическим стандартам, дискоциты, имеющие диаметр менее $6,9$ мкм, относятся к микроцитам).

Мы предполагаем, что зарегистрированное нами уменьшение диаметра эритроцитов связано с методом препарирования образцов. При использовании общепринятых методик исследования мазков крови, суспензия живых клеток наносится на стекло, и лишь затем мазок фиксируется, окрашивается и высушивается. Таким образом создается возможность для адгезионного взаимодействия эритроцитов с поверхностью стекла и изменения их формы под действием силы тяжести, что влечет за собой «распластывание-растекание» клеток на подложке и, следовательно, некоторое увеличение их диаметра. Согласно же нашей методике, сначала проводится фиксация эритроцитов в су-

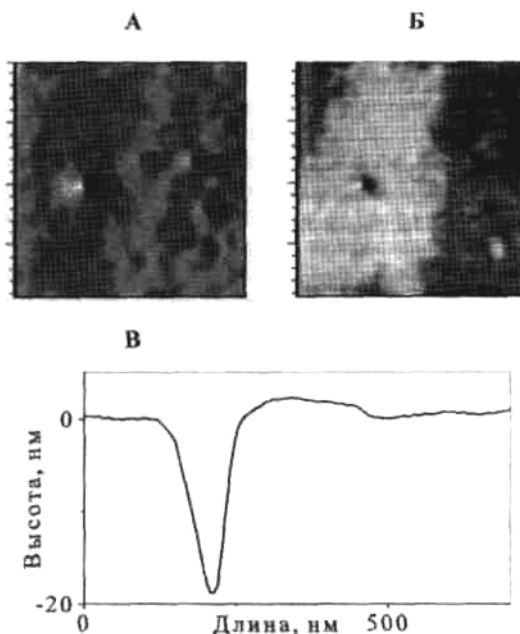


Рис. 2. Карта вертикальных отклонений острия АСМ-зонда (А), карта латеральных сил (Б) и профиль поверхности (В) участка эритроцита, который содержит пору, образовавшуюся в результате обезвоживания клетки

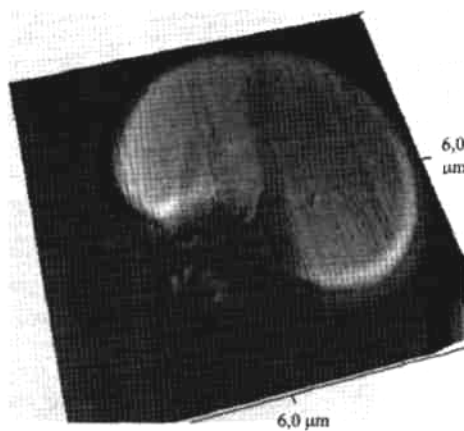


Рис. 3. АСМ-изображение частично разрушенного эритроцита мазка крови

пензии, что приводит к стабилизации их формы, а далее уже фиксированные клетки наносятся на подложку.

В работе Камруззахан с соавторами [14] диаметр дискоцитов, оцененный с помощью АСМ-профилометрии, изменялся от 6 до 9 мкм, что превышает полученные нами величины. Однако в исследовании этих авторов фиксация клеток следовала после их нанесения на подложку.

Важным показателем, отражающим геометрические параметры дискоцита, является площадь его поперечного сечения, проходящего через диаметр клетки. Этот показатель в случае предварительно фиксированных клеток составил в наших экспериментах $8,38 \pm 0,46 \text{ мкм}^2$ ($n = 54$).

Тонкая структура эритроцитов в образцах, приготовленных двумя разными способами. У эритроцитов в образцах, подготовленных для АСМ-исследования двумя обсуждаемыми здесь способами, наблюдается тонкая структура поверхности, наиболее четко фиксируемая на картах латеральных сил (карты боковых отклонений острия АСМ-зонда) (рис. 4). Тонкая структура эритроцитов имеет вид сетки, что соответствует сетке организации мембранного скелета эритроцита. Эта структура проявляется наиболее ярко у фиксированных эритроцитов (рис. 4, Б).

Согласно современным представлениям, мембранный скелет эритроцитов представляет собой двумерную решетку из структурных белков (актина и спектрина), связанную с плазматической мембраной через специальные интеграль-

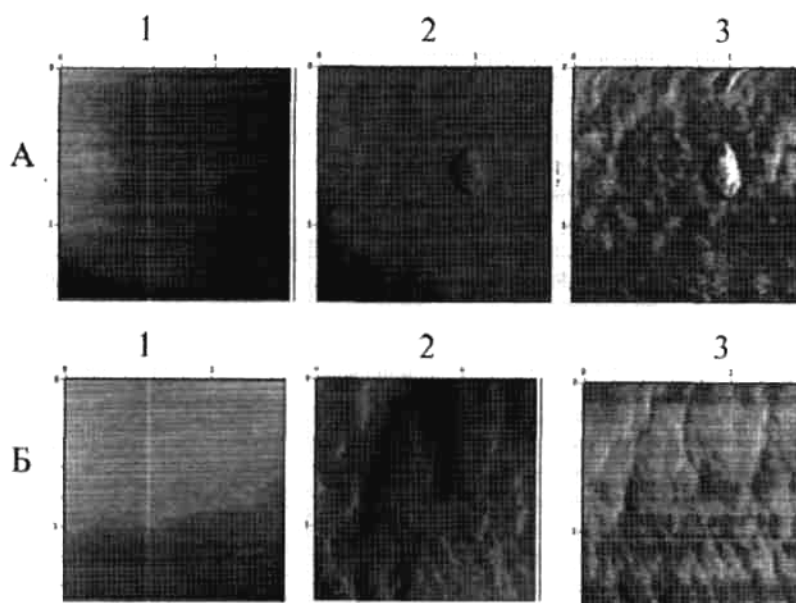


Рис. 4. Топография (1), карта вертикальных отклонений острия АСМ-зонда (2) и карта латеральных сил (3) для участка поверхности эритроцита мазка крови (А) и эритроцита, фиксированного глутаровым альдегидом (Б). Размеры участков сканирования $1,5 \times 1,5 \text{ мкм}^2$

ные 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 сетки 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 C и белка полосы 3 с помощью белка полосы 4.1 и анкирина соответственно [15–17].

Таким образом, базовым элементом сеточной структуры мембранного скелета эритроцитов является шестиугольная ячейка с узлом в центре шестиугольника. Следует отметить, что строго замостить сферу (а клетки часто имеют сферическую форму) невозможно (это следует из теоремы об индексе Эйлера–Пуанкаре). Однако выигрыш в экономии энергии, достигаемый при замощении реальной сферической поверхности большим количеством правильных шестиугольников с лихвой компенсирует неправильность заключительного многоугольника на ней как замкнутой поверхности. Замощение поверхности шестиугольными структурами широко распространено как в неживой (например, ячейки Бенара), так и в живой (например, сферический остов радиоларий) природе.

Структура мембранного скелета эритроцита может изменяться под действием факторов различной природы: при изменении величины pH, уровня АТФ и концентрации ионов Ca^{2+} , при окислительном и осмотическом шоках [8; 18–20]. Несмотря на интенсивные исследования в этой области, полная ясность в вопросе пространственной структуры цитоскелета в эритроцитах, и, особенно, ее реорганизации при действии факторов различной природы еще не достигнута.

Недавно были предприняты первые попытки изучения структуры эритроцитарного цитоскелета АСМ-методами [8; 9]. В основном, исследовали цитоскелет теней эритроцитов, а не нативных клеток. Для получения теней эритроциты сначала подвергают осмотическому шоку, а затем, в зависимости от задачи, либо создают условия для образования замкнутых оболочек, либо препятствуют процессу «залечивания» разрывов мембраны. Для атомно-силовой микроскопии эритроциты обычно закрепляют на подложке с помощью поли-L-лизина, затем подвергают сдвиговому напряжению для того, чтобы на подложке остался кусок мембраны со связанным с ним мембранным скелетом. Структуру мембранного скелета участков мембраны изучают, записывая топографию этого участка. При этом актин-спектриновая сетка хорошо видна на фоне липидного бислоя. Недостаток метода заключается в том, что структура мембранного скелета на участках разрушенного эритроцита может отличаться от структуры скелета в цельной клетке вследствие либо структурных особенностей, либо изменений в процессе разрушения эритроцита.

Нами разработана методика анализа мембранного скелета нативных эритроцитов [21]. Методика основана на том, что карты латеральных сил, записываемые параллельно с топографией и картами вертикальных отклонений острия АСМ-зонда, несут в себе информацию о топологических особенностях поверхности, а также механических свойствах поверхностных структур и близ-

лежащих к поверхности слоев. Идея заключается в том, что мембранный скелет является сетчатым каркасом, который сохраняет прижизненную форму клеток при химической фиксации и на который в процессе дегидратации клеток «опирается» липидная мембрана. В итоге, благодаря отсутствию в эритроцитах органелл и сглаженности поверхности, геометрия поверхности высушенного фиксированного эритроцита повторяет особенности геометрии мембранного цитоскелета. Кроме того, сила взаимодействия (сопротивление перемещению) острия АСМ-зонда с поверхностью эритроцита над каким-либо элементом скелета (филаментами спектрина или актина) отличается от силы взаимодействия острия с поверхностью клетки в тех точках, где элементы цитоскелета отсутствуют. Это находит отражение на картах латеральных сил участков поверхности эритроцита (рис. 4, А (3) и 4, Б (3)). Поэтому для анализа структуры мембранного скелета нативных эритроцитов предлагается использовать карты латеральных сил поверхности клетки. Для контрастирования изображения структуры мембранного скелета эритроцитов можно использовать фильтры изображений, входящие, как правило, в комплект поставляемой вместе с прибором программы обработки АСМ-данных. Проведенные экспериментальные исследования подтверждают, что на карте латеральных сил поверхности эритроцита (рис. 4, Б (3)) отчетливо прорисовывается структура, напоминающая гексагональную сеть с узлами, в которых соединяются до 6 элементов.

Мы провели анализ параметров латеральных сил для эритроцитов после их обработки окисляющим агентом — пероксинитритом [21]. Пероксинитрит взаимодействует с белками мембранного скелета эритроцита, модифицируя его структуру. Было выявлено, что угол бокового отклонения острия АСМ-зонда уменьшается, если эритроциты до фиксации глутаровым альдегидом обработаны пероксинитритом. Фрактальный анализ карт латеральных сил при оценке фрактальной размерности по методу «площадь–периметр» показывает, что при этом имеет место сгущение актин-спектриновой сетки.

Таким образом, химическая фиксация оказывается необходимым элементом подготовки эритроцитов при исследовании структуры подмембранного цитоскелета и ее перестройки при предварительном (до фиксации) воздействии на клетки различных факторов.

Используя фиксацию эритроцитов глутаровым альдегидом, мы изучили форму и структуру поверхности эритроцитов у больных сахарным диабетом второго типа [22]. Выявлено, что для эритроцитов больных характерны анизцитоз и пойкилоцитоз, а кроме того, наблюдается неоднородность структуры мембранного скелета. Эти данные свидетельствуют о гетерогенности эритроцитарной популяции у больных сахарным диабетом второго типа, по-видимому, включающей в себя различающиеся по степени зрелости формы эритроцитов.

Нами проведено изучение тонкой структуры поверхности эритроцитов при изменении температуры образцов в широком диапазоне температур (от 20 до 120 °С). Эксперименты выполнены с использованием термоплатформы ТТ-01, входящей в комплект поставки прибора «НТ-206» (ОДО «Микротестмашины», Республика Беларусь). После достижения образцами определенной температу-

ры, они выдерживались для установления теплового равновесия при этой температуре в течение 10–15 мин. Изменения в тонкой структуре поверхности эритроцитов оценивали с помощью сопоставления средних значений угла бокового смещения острия АСМ-зонда (угол кручения АСМ-консоли, на которой расположено острие) для карт латеральных сил размером $1,5 \times 1,5 \text{ мкм}^2$.

На рис. 5 представлена зависимость среднего значения

угла бокового смещения острия АСМ-зонда для карт латеральных сил участков поверхности нефиксированных и фиксированных глутаровым альдегидом эритроцитов от температуры испытаний. Анализ зависимости показывает, что в эритроцитах мазка крови происходит структурная перестройка мембраны в области температур 45–55 °С. В этом диапазоне температур, как известно, наблюдается фазовый переход вещества мембраны эритроцитов, соответствующий структурной перестройке основного белка мембранного скелета эритроцитов — спектрина. Согласно Черницкому [23], в этом диапазоне температур происходит денатурация спектрина ($t_{1/2} = 50 \pm 1 \text{ °С}$), которая лежит в основе морфологических изменений эритроцитов, а также изменений их деформируемости. Известно [23], что при нагревании клеток в интервале температур от 43 до 54 °С происходит трансформация дискоцитов в сфероциты. Деформируемость эритроцитов, измеренная по их фильтруемости, после инкубации клеток в течение 20 мин при температурах, превышающих 45 °С, уменьшается, а при температуре 50 °С практически исчезает. Кроме того, при температурах выше 49 °С происходит уменьшение экстрагируемости из эритроцитов спектрина и увеличение вязкости суспензии клеток [23].

Наши данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что тонкая структура поверхности эритроцитов, наблюдаемая при АСМ-сканировании, обусловлена элементами спектрин-актиновой сетки, тесно соприкасающейся с эритроцитарной мембраной. Для фиксированных эритроцитов существенного различия в параметрах латеральных сил при изменении температуры не выявлено (рис. 5), что указывает на химическое сшивание макромолекул при фиксации клетки глутаровым альдегидом. Параметры латеральных сил различны у эритроцитов мазков крови и фиксированных эритроцитов. Угол бокового смещения острия АСМ-зонда для фиксированных эритроцитов в среднем меньше, чем для эритроцитов в мазке крови (рис. 5).

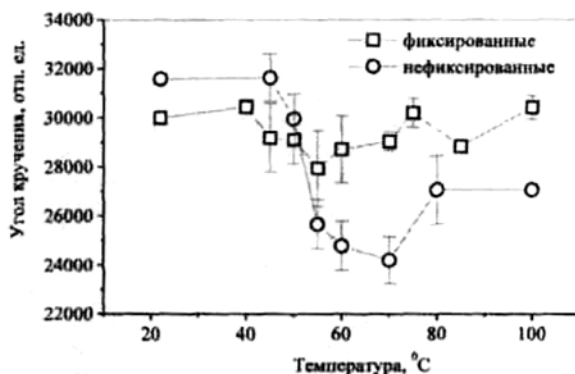


Рис. 5. Зависимость угла боковых отклонений острия АСМ-зонда от температуры испытаний для фиксированных и нефиксированных клеток

Заключение

Разработаны две методики препарирования эритроцитов для АСМ-исследований. Одна из них включает фиксацию эритроцитов в буферном растворе 0,5–2%-ного глутарового альдегида, трехкратную отмывку, нанесение клеток на обезжиренные предметные стекла размером 1×1 см² и высушивание их на воздухе. Другая методика включает нанесение цельной крови на подготовленные предметные стекла размером 1×1 см² и высушивание образца на воздухе. Выбор метода препарирования эритроцитов для АСМ определяется конкретными задачами исследования. Нефиксированные эритроциты мазка крови лучше использовать для исследования процессов реорганизации структуры и разрушения клеток при высыхании и температурных перестройках структуры поверхностного слоя эритроцитов, а фиксированные глутаровым альдегидом эритроциты — для исследования формы и тонкой структуры поверхности эритроцитов при различных патологических процессах.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б07-043).

Литература

1. Hategan A. P., Law R., Kahn S., Discher D. E. // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85, № 4. P. 2746–2759.
2. Dulinska I., Targosz M., Strojny W., Lekka M., Czuba P., Balwierz W., Szymonski M. // *J. Biochem. Biophys. Method.* 2006. Vol. 66. P. 1–11.
3. Hategan A., Sengupta K., Kahn S., Sackmann E., Discher D. E. // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87. P. 3547–3560.
4. Betz Th., Bakowsky U., Müller M. R., Lehr C.-M., Bernhardt I. // *Bioelectrochemistry.* 2007. Vol. 70, № 1. P. 122–126.
5. Стародубцева М. Н., Кузнецова Т. Г., Кузнецова Т. А. // *Вестн НАН Беларуси. Сер. биол. наук.* 2006. № 3. С. 96–99.
6. Guha T., Bhattacharyya K., Bhar R., Ganesan V., Sen A., Brahmachary R. L. // *Current Science.* 2002. Vol. 83. P. 693–694.
7. Dia L., Liub W., Liue Yu, Wang Jin-Ye // *FEBS Letters.* 2006. Vol. 580. P. 685–690.
8. Liu F., Mizukami H., Sarnaik Sh., Ostafin A. // *J. Struct. Biol.* 2005. Vol. 150. P. 200–210.
9. Swihard A. H., Mikrut J. M., Ketterson J. B., Macdonald R. C. // *J. Microscopy.* 2001. Vol. 204, № 3. P. 212–225.
10. Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Ya., Komizu H., Kusumi A. // *Biophys. J.* 1998. Vol. 74. P. 2171–2183.
11. Zink A., Kada G., Hinterdorfer P., Peschel O., Heckl W. M., Nerlich A. G., Thalhammer S. // *Forensic Sci Int.* 2007. Vol. 170, № 1. P. 8–14.
12. Bhattacharyya, Guha T., Bhar B., Ganesan V., Khan N., Ramachary L. R. // *Anat. Record.* 2004. Vol. 279A. P. 671–675.
13. Gould S. A. C., Drake B., Prater C. B. et al. // *J. Vacuum Sci. Technol.* 1990. Vol. A 8. P. 369–373.
14. Kamruzzahan A. S., Kienberger F., Stroh C. M. et al. // *Biol. Chem.* 2004. Vol. 385. P. 955–960.
15. Cohen C. M., Tyler J. M., Branton D. // *Cell.* 1980. Vol. 21. P. 875–883.
16. Shen B. W., Josephs R., Steck T. L. // *J. Cell. Biol.* 1986. Vol. 102. P. 997–1006.
17. Takakuwa Y., Mohandas N. // *J. Clin. Investig.* 1988. Vol. 82. P. 394–400.
18. Takakuwa Y. // *Cur. Opin. Hematol.* 2001. Vol. 18, № 2. P. 80–84.
19. Traverso S. // *Fractals in biology and medicine.* Basel; Boston; Berlin, 2005. P. 269–275.
20. Gov N. S., Safran S. A. // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. P. 1859–1874.

21. Starodubtseva M. N., Kuznetsova T. G., Chizhik S. A., Yegorenkov N. I. // *Micron*. 2007. Vol. 38, № 8. P. 782–786.

22. Стародубцева М. Н., Кузнецова Т. Г., Егоренков Н. И., Черников С. Н. // *Бюл. экспер. биол. мед.* 2008. Т. 145, № 1. С. 106–110.

23. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск, 1981. – 216 с.

M. N. STARODUBTSEVA, T. G. KUZNETSOVA, N. I. YEGORENKOV

THE METHODS OF RED BLOOD CELLS PREPARATION FOR ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Summary

The shape and the surface structure of red blood cells prepared by two different methods have been analyzed by atomic force microscopy. The first method includes a chemical fixation of the cells in suspension, their allocation on glass surface and dehydration. The second one includes an allocation of whole blood on glass surface and cell dehydration. The difference in the shape and the geometrical sizes of red blood cells prepared by different methods was revealed. The advantage in application of cell fixation for studying life-time shape and membrane skeleton of red blood cells was shown. The «holes» in plasma membrane, the disruption in cell integrity, and reorganization of cellular surface structure (in the range of temperatures of 45–55 °C) were detected for red blood cells in blood smear. To use the cells without chemical fixation is advisable for studying physico-chemical properties of plasma membrane and membrane skeleton.