

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОМЕХАНИЧЕСКОГО СЕНСОРА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

М.Ю. Скоркина<sup>1</sup>, М.З. Федорова<sup>1</sup>, А.В. Муравьев<sup>2</sup>, Е.А. Сладкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет;

<sup>2</sup>Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского

---

Методом атомно-силовой микроскопии в режимах полуконтактной и силовой спектроскопии изучали топографию клеточной поверхности и упругоэластические свойства лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом. Установлено, что снижение жесткости лимфоцитов у больных хроническим лимфобластным лейкозом на 51.4% ( $p < 0.05$ ) сопровождается пространственными перестройками клеточной поверхности, в частности увеличением на ней числа глобулярных выступов и углублений на 247 и 122% соответственно ( $p < 0.05$ ) по сравнению с нормальными лимфоцитами.

---

**Ключевые слова:** лимфоциты, топография поверхности, модуль Юнга, атомно-силовая микроскопия

Внедрение в биологические исследования технологий АСМ-сканирования в качестве наномеханического сенсора открывает возможности для изучения морфофункциональных свойств клеток крови без нарушения их морфологической целостности [10,14]. Оценка структурных особенностей клеточной поверхности и локального модуля упругости представляет интерес с точки зрения исследования динамики механических свойств клеток при клеточной миграции [8], в процессе дифференцировки и пролиферации при метастазировании опухолевых популяций клеток [9]. Преимуществами атомно-силовой микроскопии (АСМ) по сравнению с традиционными способами исследования являются трехмерная визуализация топографии [13], интеграция морфологических изображений клеточной поверхности с ее механическими свойствами, такими как эластичность в 2D-разрешении, сила клеточно-поверхностного или клеточно-клеточного взаимодействия [18], получение информации об упругоэластических [4] и адгезивных свойствах клеток [1].

Целью исследования явилось изучение топографии клеточной поверхности и упругоэластических свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом (ХЛЛ) с использованием технологий АСМ-сканирования.

**Адрес для корреспонденции:** skorkina@bsu.edu.ru. Скоркина М Ю

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

**Выделение лимфоцитов.** Эксперименты выполнены на периферической крови 100 здоровых доноров 25-45 лет и 50 больных ХЛЛ 17-32 лет. Лейкоциты получали путем центрифугирования цельной стабилизированной ЭДТА крови при 1500 об/мин в течение 10 мин. Удаляли верхний слой плазмы. Собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами, и лейкоцитарное кольцо. Примесь эритроцитов разрушали 0.83% раствором хлорида аммония. Клетки 2 раза отмывали изотоничным буферным раствором (раствор Дульбекко, рН 7.4).

**Изучение топографии поверхности лимфоцитов.** Топографию поверхности клеток крови изучали с использованием АСМ "ИНТЕГРА Вита" (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа "Olympus IX-71"). Суспензию лимфоцитов наносили на чистые обезжиренные стеклянные подложки, которые помещали во влажную камеру [3] для сохранения их жизнеспособности. Проводили сканирование 25 клеток из каждой опытной и контрольной пробы в полуконтактном режиме с частотой развертки 0.6-0.8 Гц, используя кантилевер серии NSG03, с жесткостью 1.1 Н/м и радиусом закругления 10 нм. На полученных сканах с помощью программного обеспечения "Nova" ("НТ-МДТ", Зеленоград, 2009 г.) строили кривые профиля участков поверхности размером 3.5×3.5 мкм, на которых измеряли морфологические образования



поверхности — подсчитывали количество и измеряли высоту глобулярных выступов.

**Эластография лимфоцитов.** С помощью метода эластографии измеряли модуль Юнга, количественно характеризующий жесткость поверхности. В основе этого метода лежит измерение степени деформации поверхности образца при его взаимодействии с вершиной зонда АСМ. Для расчета модуля Юнга силовые кривые подвода, полученные в эксперименте, преобразовывали из системы координат  $D$ - $z$  в систему  $F$ - $\Delta h$ , где  $D$  — ток рассогласования фотодиода,  $z$  — расстояние, на которое перемещается кантилевер пьезосканером АСМ при подводе к поверхности. Силу прижатия зонда к образцу находили, исходя из закона Гука

$$F = k \cdot x \quad (1),$$

где  $k$  — жесткость зонда,  $x$  — глубина проникновения зонда в образец.

Модуль Юнга системы образец—игла рассчитывали по формуле [6]:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E \Delta h \frac{3}{2} \quad (2),$$

где  $F$  — сила, действующая на образец,  $R$  — радиус закругления зонда,  $\Delta h$  — глубина проникновения зонда в поверхность образца,  $E$  — модуль Юнга.

Для работы с клетками крови использовали модифицированные АСМ-зонды в виде полусфер с радиусом закругления 2.5 мкм [5].

Достоверность различий определяли с использованием  $t$  критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На кривых профиля поверхности лимфоцитов здоровых доноров и больных ХЛЛ идентифицировали морфологические образования в виде глобулярных выступов и углублений (рис. 1). Конфигурация поверхности лимфоцитов больных ХЛЛ имела ярко выраженный рифленый характер по сравнению с лимфоцитами здоровых доноров. Для нее характерно увеличение числа глобулярных образований на 247% ( $p < 0.05$ ) и снижение их высоты на 42.6% ( $p < 0.05$ , таблица). Число углублений в мембране лимфоцитов больных ХЛЛ увеличилось на 122% ( $p < 0.05$ ), их диаметр и глубина уменьшались на 67.4 и 46.3% соответственно ( $p < 0.05$ ) по сравнению с габаритными размерами углублений на поверхности клеток у здоровых доноров.

В ходе эластографии с поверхности лимфоцитов снимали силовые кривые, которые использовали для вычисления силы взаимодействия зонда и образца. Полученные кривые преобразовывали из системы координат “ток рассогласования (DFL, нА) — высота (мкм)” (рис. 2, а) в систему координат “сила (DFL, нН) — высота (мкм)” (рис. 2, б). Процедуру преобразования осуществляли, используя скрипт DFL\_to\_Force программного обеспечения “Nova” (“НТ-МДТ”, Зеленоград 2009 г.). На преобразованных силовых кривых (рис. 2, б) находили значения  $DX$  (нм),  $DY$  (нН),  $Y$  (нН), по которым рассчитывали глубину проникновения зонда в образец [12]:

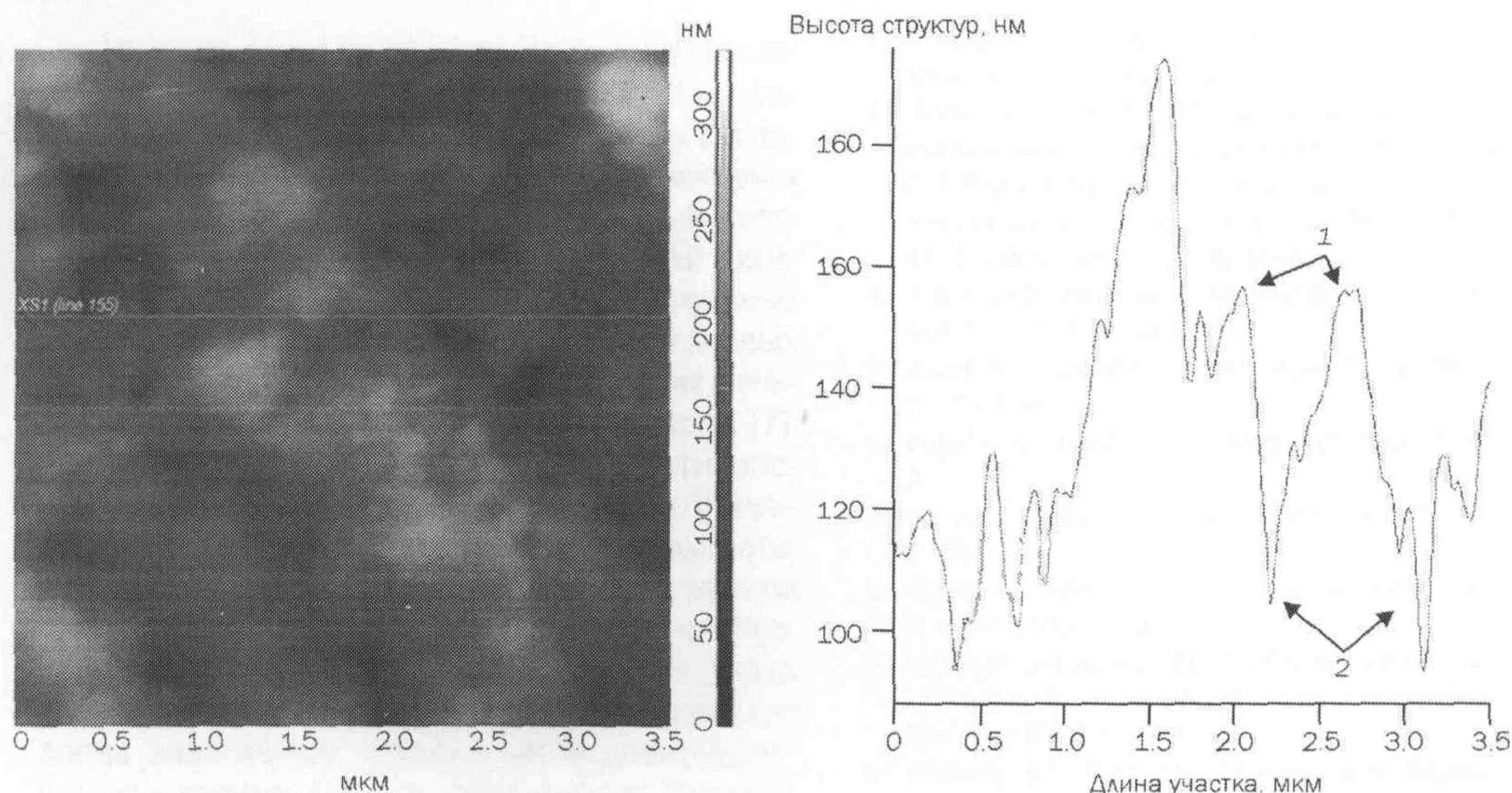
завывали из системы координат “ток рассогласования (DFL, нА) — высота (мкм)” (рис. 2, а) в систему координат “сила (DFL, нН) — высота (мкм)” (рис. 2, б). Процедуру преобразования осуществляли, используя скрипт DFL\_to\_Force программного обеспечения “Nova” (“НТ-МДТ”, Зеленоград 2009 г.). На преобразованных силовых кривых (рис. 2, б) находили значения  $DX$  (нм),  $DY$  (нН),  $Y$  (нН), по которым рассчитывали глубину проникновения зонда в образец [12]:

$$x = \frac{\Delta Z(\text{SetPoint} - \text{DFL}0)}{\Delta \text{DFL}} \quad (3),$$

где  $\Delta Z$  — преобразованное значение силовой кривой по  $DX$  (нм),  $\text{SetPoint}$  — функциональный параметр, который определяет величину входного сигнала цепи обратной связи при сканировании (нА),  $\text{DFL}0$  — преобразованное значение силовой кривой по  $Y$  (нА);  $\Delta \text{DFL}$  — преобразованное значение калибровки силовой кривой по  $DY$  (нН).

Согласно полученным данным, модуль Юнга лимфоцитов больных ХЛЛ снижался на 51.4% ( $p < 0.05$ ), глубина погружения кантилевера увеличивалась на 199% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с лимфоцитами здоровых доноров. Эти изменения указывают на увеличение способности клеточной поверхности сопротивляться упругим деформациям и на повышение их упругоэластических свойств.

По данным растровой электронной микроскопии, морфология лимфоцитов здоровых доноров и больных ХЛЛ характеризуется ворсинчатой структурой [2]. Уникальность АСМ по сравнению с растровой электронной микроскопией заключается в получении возможности исследовать микро- и наномеханические свойства клеточных структур, наблюдать перестройки в рельефе поверхности, а также пространственное распределение локального модуля упругости в пределах одной клетки [11]. Причем визуализация поверхности клеток крови с использованием АСМ позволяет идентифицировать и изучить мельчайшие структуры с высоким пространственным разрешением за счет мониторинга сил, возникающих между зондом и сканируемой поверхностью [15]. На современном этапе использование метода растровой электронной микроскопии для изучения морфологии нативных биологических объектов имеет ряд ограничений, связанных с изменением морфологии клеток и появлением артефактов из-за зондирования поверхности, тонко сфокусированным пучком электронов (электронным зондом), а также использованием фиксаторов и условий низкого или высокого вакуума [16].

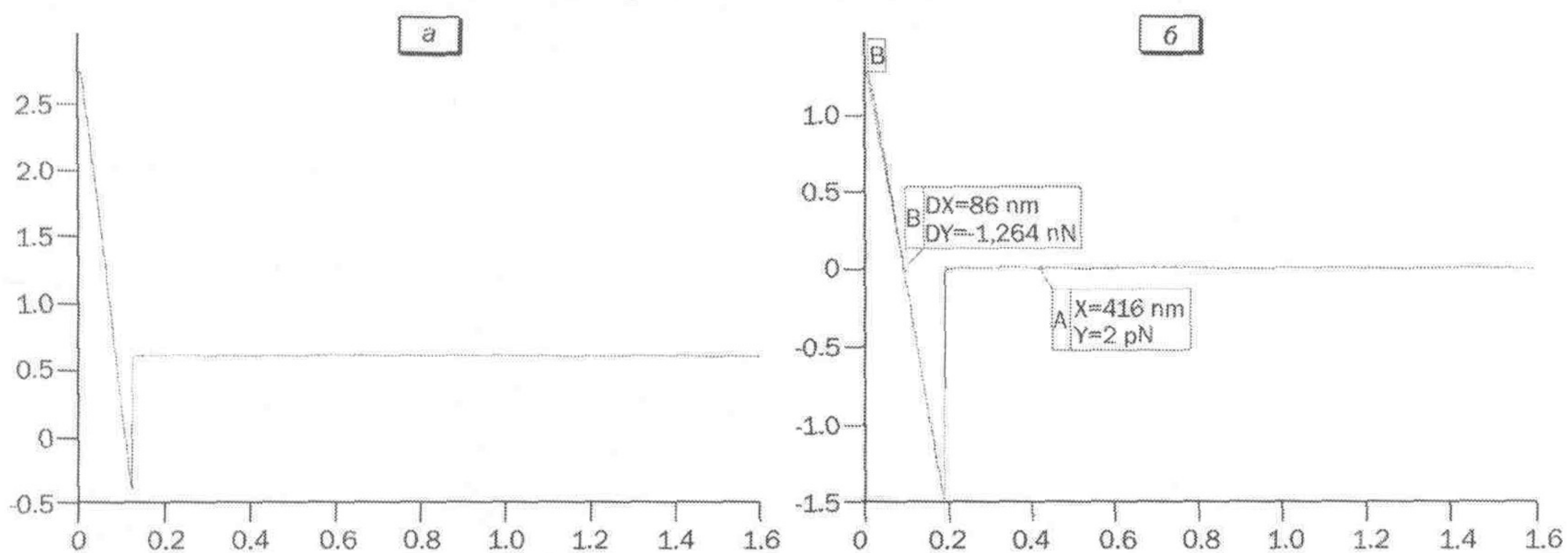


**Рис. 1.** АСМ-изображение (а) и вид профиля поверхности лимфоцита вдоль линии сканирования (б). 1 – глобулярные выступы, 2 – углубления.

Структурные особенности и механические свойства лимфоцитов здоровых доноров и больных ХЛЛ

Параметры структур и упругоэластических свойств поверхности		Здоровые доноры	Больные ХЛЛ
Глобулярные выступы	высота, нм	41.3±3.7	17.6±0.9*
	количество	36.0±0.9	125.0±1.1*
Углубления в мембране	диаметр, нм	221.8±24.0	149.4±12.9*
	глубина, нм	17.3±0.6	8.01±0.90*
	количество	18.0±1.1	40.0±2.3*
Жесткость	модуль Юнга, мкПа	3.5±0.2	1.80±0.01*
	глубина погружения кантилевера, нм	345.20±3.74	1035.20±7.32*

Примечание. \* $p < 0.05$  по сравнению со здоровыми донорами (критерий Стьюдента).



**Рис. 2.** Силовые кривые лимфоцита больного ХЛЛ.

а – первоначальный вид силовой кривой в системе координат “ток рассогласования фотодиода (DFL, нА) – высота (мкм)”; б – преобразованная кривая с помощью скрипта DFL\_to\_Force программы “Nova” в системе координат “сила (DFL, нН) – высота (мкм)”. На силовой кривой указаны значения DX (нм), DY (нН), Y (нН), необходимые для вычисления глубины проникновения зонда в образец.

Выявленное в нашем исследовании снижение жесткости лимфоцитов больных ХЛЛ на фоне перестройки рельефа их поверхности согласуется с данными литературы, согласно которым снижение модуля упругости в лейкозных клетках крови тесно связано с организацией актиновых филаментов. Установлены существенные различия в организации F-актина в опухолевых лимфоцитах, которые в 2 раза тоньше и их меньше, чем в лимфоцитах здоровых доноров [7]. Уменьшение толщины и содержания актиноподобных структур в лимфоцитах больных ХЛЛ приводит к трансформации рельефа поверхности. Изменения в жесткости клеток являются важной компенсаторно-приспособительной реакцией, протекающей на фоне лимфоцитоза, характерного для данного типа заболевания [17], что позволяет более эластичным клеткам легче деформироваться в капиллярах и продвигаться по сосудам.

Таким образом, с использованием АСМ-инструментария установлено снижение жесткости лимфоцитов больных ХЛЛ и обилие морфологических образований на клеточной поверхности по сравнению с нормальными клетками. Изменение топографии опухолевых клеток в виде увеличения числа глобулярных выступов и углублений в мембране указывает на реорганизацию цитоскелетных структур и является компенсаторной реакцией, направленной на сохранение микрореологических свойств крови.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Боровик А.С., Гарасова О.С., Гольшакова А.В., Яминский И.В. // Успехи совр биол. 2000. Т. 120, № 2. С. 217-224.
2. Козинец Г.М., Симоварт Ю. Поверхностная архитектура клеток периферической крови. Таллин, 1984.
3. Патент 2398234 РФ, МПК G01N33/49 / Способ исследования нативных клеток // М.З.Федорова, С.Д.Чернявских, М.Ю.Скоркина и др. Заявитель и патентообладатель БелГУ. № 2009125268. Заявл. 01.07 2009. Опубл. 27.08.2010.
4. A-Hassan E., Heinz W.F., Antonik M.D. // Biophys. J. 1998. Vol. 74, N 3. P. 1564-1578.
5. Benoit M., Gaub H.E. // Cell Tissues Organs. 2002. Vol. 172. P. 174-189.
6. Capella B., Dietl G. // Surf. Sci. Rep. 1999. Vol. 34. P. 1-104.
7. Cai X., Xing X., Cai J. et al. // Micron. 2010. No. 41, N 3. P. 257-262.
8. Curtis A., Wilkonson C. // Biomaterials. 1997. Vol. 18, N 24. P. 1573-1583.
9. Debeir O., Adanaja I., Kiss R., Decaestecker C. // The motile system and health and disease. Transworld Research Netnork. 2008. P. 123-156.
10. Hansma H.G., Hoh J.H. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1994. Vol. 23. P. 115-1139
11. Hansma H.G. // Annu. Rev. Phys. Chem. 2001. Vol. 52. P. 71-92
12. Israelachvili J. // J. Vac. Sci. Technol. 1992. A10. P. 2961-2971.
13. Kamruzzaham A.S M., Keinberg F., Cordula M.S. et al. // Biol. Chem. 2004. Vol. 385. P. 995-960.
14. Kasas S., Thomson N.H., Smith B.L. et al. // Biochemistry. 1997. Vol. 36, N 3. P. 461-468.
15. Mozafari M R., Reed C.J., Rostorm C., Hasirci V. // J. Liposome Res. 2005. Vol. 15, N 1-2 P. 93-107.
16. Schilard P., Diaz C., Flores C. et al. // Current Research, Technology and Education. Topics in Applied Microbiology and Microbiology Biotechnology. 2010. P. 860-869
17. Shirren C.A., Volpel H., Meuer S.C. // Blood. 1995. Vol. 79. P. 138-143.
18. Simon A., Durrieu M.C. // Micron. 2006. Vol. 37, N 1. P. 1-13.

Получено 21.10.11