

УДК 576.3.314

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧИЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ
МИКРОСКОПИИ**

Ю.Ю. Гущина¹, С.Н. Плескова², М.Б. Звонкова³

*¹- Научно-образовательный центр “Физика твердотельных наноструктур”
Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского*

*²- Кафедра микробиологии и иммунологии Нижегородской государственной медицинской
академии*

*³- Кафедра физиологии человека и животных Нижегородского государственного
университета им. Н.И. Лобачевского*

Поступила в редакцию 26.07.2004

Проводилось изучение морфологических параметров клеток крови методом атомно-силовой микроскопии. Установлено, что размеры клеток в данном методе исследования существенно и достоверно изменяются в зависимости от способа фиксации. Обнаружено, что разрешение изображений фиксированных препаратов выше и в них лучше определяются детальная структура клеток, в частности наличие ядра и цитоплазматических гранул (особенно при фиксации метанолом). Однако нельзя полагаться на данные способы исследования при изучении размеров (диаметра и высоты) клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Применение метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) предоставило уникальную возможность исследовать биологические объекты, не используя сложных методов фиксации. Кроме того, можно изучать нативные клетки, не прибегая к фиксации. В настоящее время изменение морфологических параметров клеток крови человека проецируют на физиологические свойства, что наряду с функциональной характеристикой дает

полноценную информацию об их участии в поддержании гомеостаза [1, 2].

Не редко изменения в клетках крови, принимающих активное участие в защитных механизмах макроорганизма, могут свидетельствовать о перестройке клеточных структур и подпороговой активации. Для изучения таких изменений требуются методы, позволяющие адекватно оценить и появление новых клеточных структур (например, образование псевдоподий) и различия в

размерах клетки до и после активации. Поскольку для этих целей часто применяются различные способы фиксации, задачей настоящего исследования явилось сравнение морфологических характеристик клеток крови человека (нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов), фиксированных методами, наиболее часто применяемыми при подготовке биологических объектов к микроскопическим исследованиям с клетками, находящимися в их естественном физиологическом состоянии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки выделяли по методике [3]. Эритроциты лизировали холодным изотоническим раствором NH_4Cl (рН=7,4) (12 мин, 0°C), нейтрофильные гранулоциты и лимфоциты отмывали забуференным физиологическим раствором и взвешивали в растворе Хенкса (ГУП ИПВЭ, Москва). Выделенные клетки наносили на предметное стекло и инкубировали (24°C , 60 мин). За это время происходила спонтанная адгезия к стеклянной подложке.

Фиксация препаратов: Полученные клетки наносили на предметное стекло, инкубировали при 24°C , 30 мин, затем фиксировали либо метанолом 0,05 мл, 10 мин (Acros organics, USA), либо – 2,5% глутаровым альдегидом (Sigma, USA), после чего мазки тщательно отмывали.

Сканирование препаратов методом АСМ: Для исследования поверхности клеток использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver Bio NT-MDT (Зеленоград).

Сканирование поверхности фиксированных препаратов проводили в прерывисто-контактном режиме на воздухе. Использовались неконтактные кремниевые зонды серии NSG11 (NT-MDT) жесткостью 5,5 Н/м, резонансной частотой приблизительно 150 кГц, радиусом закругления 10 нм, высота зонда 10-20 мкм. Исследование фиксированных препаратов не представляло сложностей, было проведено сканирование в воздушной фазе не менее чем 30 образцов каждого типа клеток. Поскольку при сканировании живых клеток необходимо было добиться прочной адгезии к поверхности подложки (т.к. в представленном исследовании не были использованы препараты типа полилизина) исследования проводили в растворе Хенкса, т.к. он содержит Ca^{2+} , а адгезия является Са–зависимым механизмом. Исследовали в неконтактном режиме сканирования 15 – 20 нативных образцов каждого типа клеток. Использовались специально затупленные кремниевые зонды серии CSG11 (NT-MDT) жесткостью 0,03 Н/м, радиусом закругления примерно 50-60 нм, высота зонда 10-20 мкм. Обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения TermoMicroscopes SPMLab.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

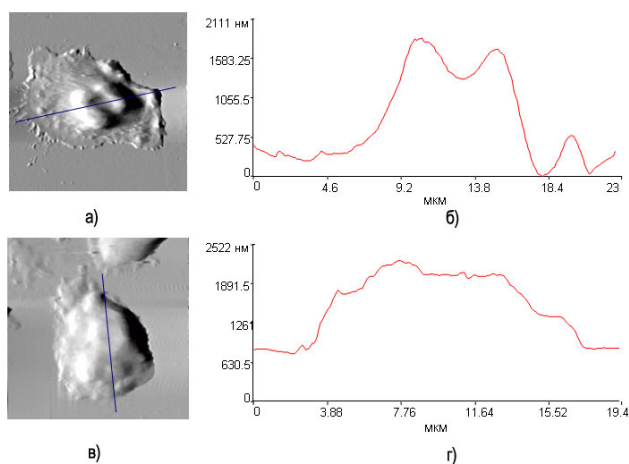


Рис. 1 а, в Изображение живого нейтрофильного гранулоцита в жидкой среде. **б, г** Профиль клетки.

На рисунках 1а – 1г представлены результаты сканирования нативных нейтрофилов. Они отражают полиморфизм фагоцитарных клеток крови. На препарате 1а определяются не только границы клеток и полиморфное ядро, но видны и гранулы цитоплазмы. Нейтрофил не имеет строгой округлой формы. Четко определяется сегментированное ядро. Особенно хорошо его видно на боковом сечении профиля клетки (рис. 1б), где малый выступ соответствует грануле цитоплазмы, а два больших выступа – ядру клетки. Однако при исследовании живых препаратов встречались не только такие изображения. С одинаковой частотой встречались изображения живых НГ соответствующих рис. 1в, где границы клетки выражены достаточно четко, но ядро определяется плохо, однако может быть выявлено по боковому сечению профиля клетки (рис. 1г). Клетка имеет форму близкую к округлой. Поскольку отмечается только адгезия клетки к поверхности подложки, но не ее распластывание, практически вся цитоплазма оказывается сконцентрированной

возле ядра, что приводит к снижению четкости изображения последнего и к тому, что гранулы цитоплазмы практически не идентифицируются. Клетка имеет шероховатую поверхность.

На рис. 2 представлены изображения нейтрофилов, фиксированных метанолом.

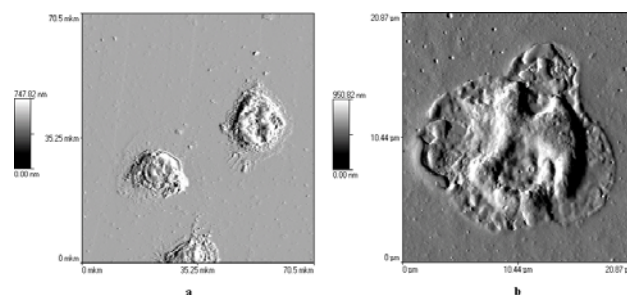


Рис. 2 а, б Изображение нейтрофильных гранулоцитов, фиксированных метанолом в воздушной фазе.

Границы клеток выражены отчетливо, всегда определяется сегментированное ядро и гранулы цитоплазмы. Однако клетка, фиксированная метанолом, практически лишается воды, полностью распластывается по поверхности подложки (от чего становится четко выраженной топография ее внутренней структуры) и это резко изменяет морфологические параметры клетки (табл.1).

Таблица I. Морфологические параметры нейтрофильных гранулоцитов, полученные методом сканирующей зондовой микроскопии

Параметры клеток	Нативные клетки (живые НГ)	Клетки, фиксированные метанолом	Клетки, фиксированные глutarовым альдегидом
Диаметр клеток (мкм)	14,55 ± 0,55*	16,72 ± 0,41*	18,25 ± 0,48*
Высота клеток (мкм)	2,133 ± 0,112**	0,664 ± 0,026**	1,031 ± 0,049**

Примечание.

*F = 15,11 ($v_{\text{вну}} = 138,1$; $v_{\text{меж}} = 9,136$)

*p<0,001 – различия между группами статистически значимы

$**F = 99,26$ ($v_{\text{вну}} = 214,1$; $v_{\text{меж}} = 2,15$)

$*p < 0,001$ - различия между группами статистически значимы

Кроме того, следует отметить, что разрешение сканирующего зондового микроскопа при сканировании препаратов в воздушной среде оказывается выше (рис. 1, 2).

При получении изображения методом СЗМ общепризнанным методом фиксации является обработка глутаровым альдегидом [4, 5]. Изображения нейтрофилов, фиксированных глутаровым альдегидом, представлены на рис. 3.

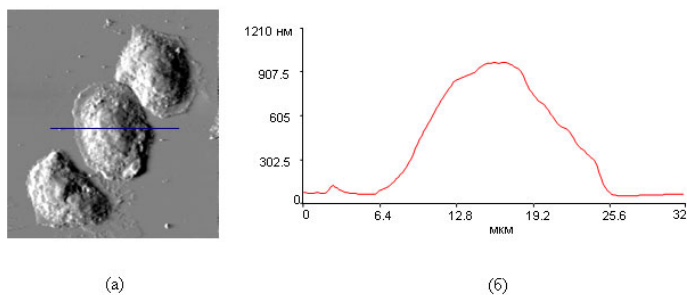


Рис. 3 а Нейтрофильные гранулоциты, фиксированные глутаровым альдегидом в воздушной фазе. **б.** Профиль клетки.

Мы не обнаружили каких либо преимуществ данного метода фиксации. Поскольку при обработке глутаровым альдегидом клетка сохраняет воду и не расплывается по подложке ее изображение идентично изображению нативных НГ, где четко определены границы клеток, однако ядро и гранулы не выявляются. Заметна только шероховатость клетки, которая практически не выявляется при фиксации метанолом. Однако размеры НГ при фиксации глутаровым альдегидом отличаются от нативных препаратов (табл.1).

В таблице 1 представлены замеры высоты нейтрофилов и поперечных размеров (диаметра) клеток. Исследование показало, что основные параметры клеток в нативных препаратах значительно и достоверно отличимы от фиксированных аналогов.

Несколько иные результаты, вытекающие из своеобразия клеток, получены нами при сканировании лимфоцитов крови. В зависимости от ядерно-цитоплазматического соотношения различают: узкоцитоплазматические, среднецитоплазматические и широкоцитоплазматические. В литературе широкоцитоплазматические лимфоциты часто называют «большими», тогда как узко и среднецитоплазматические обозначают как «малые» [6]. Однако в своем исследовании мы отступили от этой градации, поскольку отчетливо видели две формы нативных и фиксированных лимфоцитов, изображенных соответственно на рис. 4а – 4в и рис. 5а – 5в, ба – 6б, поэтому полученные изображения лимфоцитов мы разделили на 2 группы: большие БЛ (более 10 мкм) и малые МЛ (менее 10 мкм).

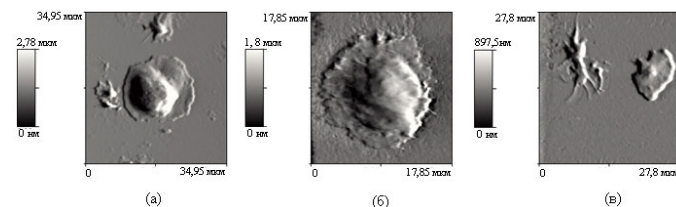


Рис. 4 а Изображение нативных лимфоцитов в жидкости. **б.** Большой лимфоцит. **в.** Малые лимфоциты. На рис. 4 а выделяются три лимфоцита (один БЛ и два МЛ), где сразу отмечаются основные отличия между БЛ и МЛ. На рис. 4а и 4б БЛ имеют одно крупное ядро, которое занимает практически весь объем клетки. Ядро

выделяется очень отчетливо, не требуя применения бокового сечения профиля клетки (несмотря на то, что лимфоциты в сравнении с нейтрофилами несколько хуже распластывались по поверхности подложки). Кроме того, достаточно отчетливо определяются и гранулы лимфоцита. Клетки имеют форму близкую к округлой. В то время как МЛ (рис. 4а, 4в) имеют маленькое ядро, которое, как правило, располагалось не центрально, а на периферии. Несмотря на то, что единственное ядро имеет круглую форму, мембрана лимфоцита никогда не поддерживает этой формы. Мембрана МЛ образует разнообразные выросты (разной формы и размеров): чаще всего они длинные, иглообразные, реже широкие, напоминающие «языки». Скорее всего, такая морфология лимфоцитов и объясняет их подразделение на узко и среднецитоплазменные, поскольку, по-видимому, острые иглообразные выросты не прокрашиваются при использовании различных методов окраски для световой микроскопии.

При фиксации метанолом по аналогии с нейтрофилами клетка полностью обезвоживается, что обнажает все ее внутренние структуры. Такой способ фиксации подтверждает строго округлую форму ядра, концентрацию цитоплазмы вокруг него у БЛ и наличие гранул в цитоплазме (рис. 5а, 5б).

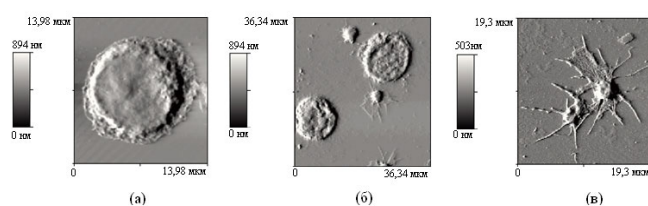


Рис. 5 Изображение лимфоцитов, фиксированных метанолом в воздушной среде. **а.** Большой лимфоцит. **б.** Большие и малые лимфоциты. **в.** Малые лимфоциты.

Из четырех МЛ представленных на рис. 5б, 5в только у одного наблюдалось центральное расположение ядра, тогда как у трех других ядро смещено от центра. Отчетливо видны и многочисленные острые выросты цитоплазмы, по всей вероятности они необходимы клетке для увеличения суммарной поверхности и расположения на них многочисленных рецепторов, которыми богаты эти клетки.

Аналогичная морфология, отличающая БЛ и МЛ, отмечается и при фиксации глутаровым альдегидом (рис. 6а, 6б).

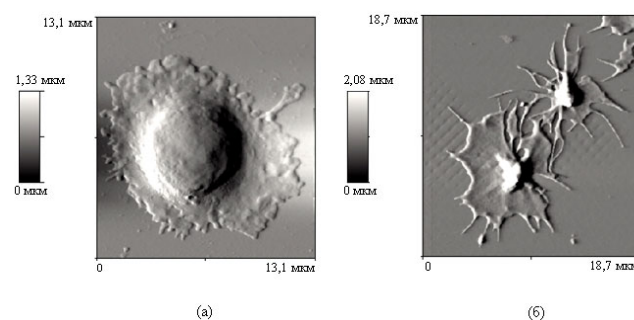


Рис. 6 Лимфоциты, фиксированные глутаровым альдегидом в воздушной среде. **а.** Большой лимфоцит. **б.** Малые лимфоциты.

На представленных образцах видно, что изображения лимфоцитов, фиксированных глутаровым альдегидом и метанолом больше сходны друг с другом, чем с изображением живых, не фиксированных клеток. Применение методов фиксации и сканирование в воздушной фазе увеличивает разрешение микроскопа.

Статистический анализ основных размеров лимфоцитов представлен в таблице 2.

Таблица II. Морфологические параметры лимфоцитов, полученные методом сканирующей зондовой микроскопии

Параметры клеток	Живые БЛ	БЛ (метанол)	БЛ (глутаровый альдегид)	Живые МЛ	МЛ (метанол)	МЛ (глутаровый альдегид)
Диаметр клеток (мкм)	15,22 ± 0,73 ¹	12,22 ± 0,32 ¹	16,06 ± 0,86 ¹	6,97 ± 0,29 ²	5,39 ± 0,41 ²	5,0 ± 0,37 ²
Высота клеток (мкм)	1,592 ± 0,151 ³	0,636 ± 0,036 ³	2,04 ± 0,117 ³	0,501 ± 0,035 ⁴	0,418 ± 0,038 ⁴	1,157 ± 0,095 ⁴

Примечание.

¹ F = 7,644 ($v_{\text{вну}} = 14,3$; $v_{\text{меж}} = 1,08$) $p < 0,001$ – различия между группами статистически значимы

² F = 9,11 ($v_{\text{вну}} = 3,39$; $v_{\text{меж}} = 30,69$) $p < 0,001$ – различия между группами статистически значимы

³ F = 40,890 ($v_{\text{вну}} = 3,964$; $v_{\text{меж}} = 162,1$) $p < 0,001$ – различия между группами статистически значимы

⁴ F = 38,524 ($v_{\text{вну}} = 1,173$; $v_{\text{меж}} = 45,18$) $p < 0,001$ – различия между группами статистически значимы

Поскольку мы произвольно разделили клетки на БЛ и МЛ, основываясь на диаметре, то ожидали, что при статистической обработке результатов достоверные отличия будут наблюдаться только в высоте клеток, однако это оказалось не верным, поскольку и высота клеток и их диаметр значительно и достоверно искажались после фиксации препарата.

Из таблицы 1 следует, что любой метод фиксации искажает размеры клеток: если при фиксации метанолом это по большей части отражается на высоте клетки, то при фиксации глутаровым альдегидом на поперечных размерах клетки. В таблице 2 отмечено, что фиксация меняла как высоту лимфоцитов, так и их диаметр. Особенно удивляет значительное

увеличение высоты клеток после фиксации глутаровым альдегидом по сравнению с живыми клетками. В основном это явление мы связывали со способностью лимфоцитов к расплыванию по подложке: если фиксированные клетки не имели такой возможности, то живые лимфоциты за время наблюдения могли лучше расплываться по подложке.

В целом можно отметить, что хотя использование фиксированных препаратов имеет целый ряд преимуществ над нативными пробами, морфологические параметры при исследовании фиксированных препаратов оказываются искаженными. Среди основных преимуществ фиксированных препаратов выделяются: (1) возможность длительного хранения и повторного исследования образца через определенные промежутки времени; (2) возможность транспортировки; (3) высокое латеральное разрешение при исследовании препаратов. Поэтому для исследования различных процессов, протекающих в клетке и морфологических изменений, сопровождающих эти процессы удобнее использовать исследования нефиксированных препаратов в жидкой фазе, а для визуализации детальных подробностей этих изменений можно использовать методы фиксации, среди которых предпочтение, по-видимому, нужно отдавать фиксации метанолом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проводилось изучение морфологических параметров клеток крови методом

сканирующей зондовой микроскопии. Установлено, что размеры клеток в данном методе исследования существенно и достоверно изменяются в зависимости от способа фиксации.

Обнаружено, что разрешение изображений фиксированных препаратов выше и в них лучше определяются детальная структура клеток, в частности наличие ядра и цитоплазматических гранул (особенно при фиксации метанолом). Фиксация глутаровым альдегидом отражает морфологию сходную с живыми клетками, но диаметр и высота клеток вновь оказываются достоверно различимы с нативными препаратами. Нельзя полагаться на данные способы фиксации при изучении размеров (диаметра и высоты) клеток. Клеточный полиморфизм характерен как для нейтрофилов, так и для лимфоцитов крови.

Работа поддержана грантом Минобразования РФ и Американского фонда гражданских исследований и развития REC-NN-001-X2:06.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф, 1993. 192с.
2. Сапрыкин В.П., Кузнецов С.Л. // Морфология. 2001. т.120. №6. с. 37-41.
3. Подосинников И.В., Нилова Л.Г., Бабиченко И.В. // Лабораторное дело. 1981. №8. с. 68 .
4. Beckmann M., Kolb H.-A., Lang F. // Membrane Biology. 1994. V.140. p. 197.
5. Dufrêne Y.F. // Micron. 2001. V.32. p. 153.
6. Атлас клеток крови и костного мозга. (Под редакцией профессора Г.И.Козинца). М.: Триада-Х, 1998. 160с.