

**М. Ю. Скоркина, М. З. Фёдорова, А. В. Муравьёв**

### **Цитоархитектоника лимфоцитов здоровых доноров в условиях активации и блокады $\beta$ -адренорецепторов**

Методом полуконтактной АСМ изучена цитоархитектоника лимфоцитов и измерен модуль упругости клеточной поверхности в условиях активации и блокады  $\beta$ -адренорецепторов *in vitro*. Установлено увеличение жесткости клеточной поверхности лимфоцитов под влиянием адреналиновой нагрузки и появление большого числа глобулярных выступов со сниженной высотой.

**Ключевые слова:** лимфоциты, цитоархитектоника, модуль упругости, атомно-силовая спектроскопия,  $\beta$ -адренорецепторы.

**M. Ju. Skorkina, M. Z. Fiodorova, A. V. Muraviov**

### **Cytoarchitecture of Healthy Donors' Lymphocytes in Conditions of Activation and Blockade of $\beta$ -Adrenoreceptors**

With the help of the semicontact atomic-power microscopy method it is studied cytoarchitecture of lymphocytes and the module of elasticity cellular surface in the conditions of activation and blockade  $\beta$ -adrenoreceptors *in vitro* is measured. Is determined the increase in rigidity cellular surface of lymphocytes under the influence of adrenalinic loading and great number occurrence of globular outsets with decreased height.

**Keywords:** lymphocytes, cytoarchitecture, the elasticity module, atomic-power spectroscopy,  $\beta$ -adrenoreceptors.

#### **Введение**

Изучение цитоархитектоники клеток крови имеет большой практический интерес, поскольку определяет их функциональную активность, изменяющуюся в ходе жизненного цикла [2]. Несмотря на широкий спектр исследований, посвященных морфологии клеточной поверхности методами растровой электронной микроскопии [4, 6, 7], использование атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяет получать информацию о рельефе и упруго-эластических свойствах клеток [13]. К настоящему моменту изучена морфология лейкоцитов человека и животных [1, 11], проведен количественный анализ упругих свойств ядерных и безъядерных нативных эритроцитов, выявлена инверсия эластических свойств клеток при воздействии фиксаторов [10], построены карты локальной упругости эритроцитов лягушек, которые позволяют идентифицировать структурные трансформации поверхности в условиях активации и блокады адренорецепторов [9]. Согласно данным РЭМ, характерной чертой топографии лимфоцитов является наличие ворсинчатой структуры, которая изменяется при розеткообразовании, бласттрансформации, культивировании суспензии [2, 4]. Однако данные от-

носительно особенностей тонкой ультраструктурной организации поверхности лимфоцитов и изменения их жесткости при воздействии физиологически активных веществ отсутствуют. Целью выполненного исследования явилось изучение цитоархитектоники лимфоцитов в условиях активации и блокады адренорецепторов.

#### **Материалы и методы исследования**

Эксперименты выполнены на периферической крови 50 здоровых доноров в возрасте от 25 до 45 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 дважды отмывали изотоничным буферным раствором (раствор Дульбекко, pH=7,4). Активацию  $\beta$ -адренорецепторов осуществляли путем инкубации 30 мкл суспензии лимфоцитов в 150 мкл среды RPMI, содержащей  $10^{-9}$  ммоль/л адреналина, в течение 15 мин при температуре 37°C. Блокаду  $\beta$ -адренорецепторов осуществляли путем инкубации 30 мкл суспензии лимфоцитов в 150

мкл среды RPMI, содержащей  $10^{-9}$  ммоль/л обзидана, в течение 15 мин при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . По окончании времени инкубации изучали цитоархитектонику клеток крови с использованием атомно-силового микроскопа (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 [8] для сохранения их жизнеспособности. Проводили сканирование 25 клеток из каждой опытной и контрольной пробы в полуконтактном режиме с частотой развертки 0,6–0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG03, с

жесткостью 1,1Н/м и радиусом закругления 10 нм. На полученных сканах с помощью программного обеспечения “Nova” (Зеленоград, 2009) строили кривые профиля участков поверхности размером  $3,5 \times 3,5$  мкм (рис. 1), на которых измеряли глубину и ширину кластеров, образовавшихся под влиянием адреналина и обзидана. Кроме того, подсчитывали количество и измеряли высоту глобулярных выступов на поверхности лимфоцитов в контроле и после экспозиционных нагрузок. В качестве контроля использовали клетки, помещенные в аутологичную плазму без нагрузок.



Рис. 1. Кривая профиля поверхности лимфоцита в аутологичной плазме

2).

Используя метод эластографии, измеряли модуль Юнга, количественно характеризующий жесткость поверхности. В основе этого метода лежит измерение степени деформации поверхности образца при взаимодействии его с вершиной зонда АСМ [12]. Количественно модуль Юнга оценивали по экспериментальным силовым кривым, снятым с поверхности клеток при проведении процедуры силовой спектроскопии. Для расчета модуля Юнга использовали модель Герца, которая рассматривает взаимодействие жесткой полусферы АСМ-зонда и плоскости биологического образца [22]. Получаемые в эксперименте силовые кривые преобразовывали из системы координат D-z к системе F-Δh, где D – ток рассогласования фотодиода, z – расстояние, на которое перемещается кантилевер пьезосканером АСМ при подводе к поверхности [5], затем пере-

водили сигнал рассогласования фотодиода в силу взаимодействия зонда и образца по формуле [16]:

$$F = \frac{k_{tip}}{\alpha} D_{soft}$$

где  $k_{tip}$  – коэффициент жесткости АСМ-зонда,  $D_{soft}$  – ток рассогласования фотодиода, полученный на биологическом образце,  $\alpha$  – тангенс угла наклона на линейном участке силовой кривой.

Модуль Юнга системы образец-игла рассчитывали по формуле [17]:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} E \Delta h^{\frac{3}{2}}$$

где F – сила, действующая на образец, R – радиус закругления зонда, Δh – 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 [14].

Полученные экспериментальные данные статистически обработаны. Достоверность различий

определяли с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение**

На поверхности лимфоцитов в плазме выявлены глобулярные выступы и впадины в виде кластеров (рис. 2).

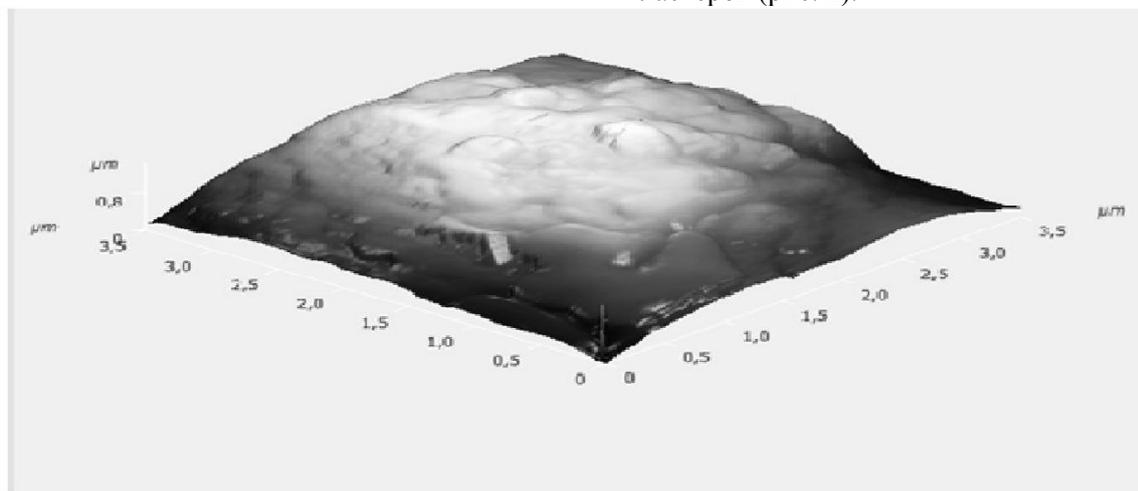


Рис. 2. 3D-скан участка лимфоцита в аутологичной плазме: 1 – глобулярные выступы; 2 – впадины

Размеры кластеров резко варьировали, в связи с чем они были разделены на 4 группы (табл. 1).

Таблица 1

**Цитоархитектоника лимфоцитов в условиях активации и блокады β-адренорецепторов**

Типы структур	Кластеры		Глобулярные выступы	
	глубина, нм	ширина, нм	высота, нм	количество, шт.
Контроль (плазма)				
1 группа	8,0±0,68	171,0±15,89	41,3±3,68	36±0,98
2 группа	15,9±1,25	296,0±7,21		
3 группа	22,3±1,32	184,0±11,51		
4 группа	43,5±1,05	290,0±10,0		
Адреналин				
1 группа	5,6±0,15*	63,7±1,1*	17,5±0,53*	46±1,1*
Обзидан				
1 группа	6,8±0,4	85,2±2,4*	75,7±8,8*	35±0,56
2 группа	17,4±1,8	123,7±1,5*		

\* – статистически достоверные различия между значениями в контроле и после адреналиновой / обзидановой нагрузок по критерию Стьюдента при  $p < 0,05$ .

Большую часть поверхности лимфоцитов (около 40 %) занимали мелкие кластеры 1 группы. Около 28 % приходилось на кластеры 2 группы и 22 и 11 % соответственно составляли структуры 3-й и 4-й групп. После адреналиновой нагрузки наблюдали сглаживание рельефа лимфоцитов. Уменьшалась глубина и ширина кластеров 1 группы соответственно на 43 и 168 % ( $p < 0,05$ ), исчезали структуры 2–4 групп.

Под влиянием обзидана глубина кластеров 1 и 2 групп существенно не изменилась, но при этом заметно уменьшилась их ширина, соответственно на 100,7 и 38,2 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с

контролем. Кластеров 3 и 4 групп после воздействия обзидана не выявлено.

В рельефе клеток были идентифицированы шероховатости в виде глобулярных выступов. Под влиянием адреналина количество глобул на участке поверхности возрастало (рис. 3 а), а их высота снижалась на 136% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При воздействии блокатора β-адренорецепторов обзидана высота глобул увеличивалась на 45 % ( $p < 0,05$ ), а их общее количество (рис. 3 б) на участке поверхности не изменялось по сравнению с контролем (см. табл. 1).

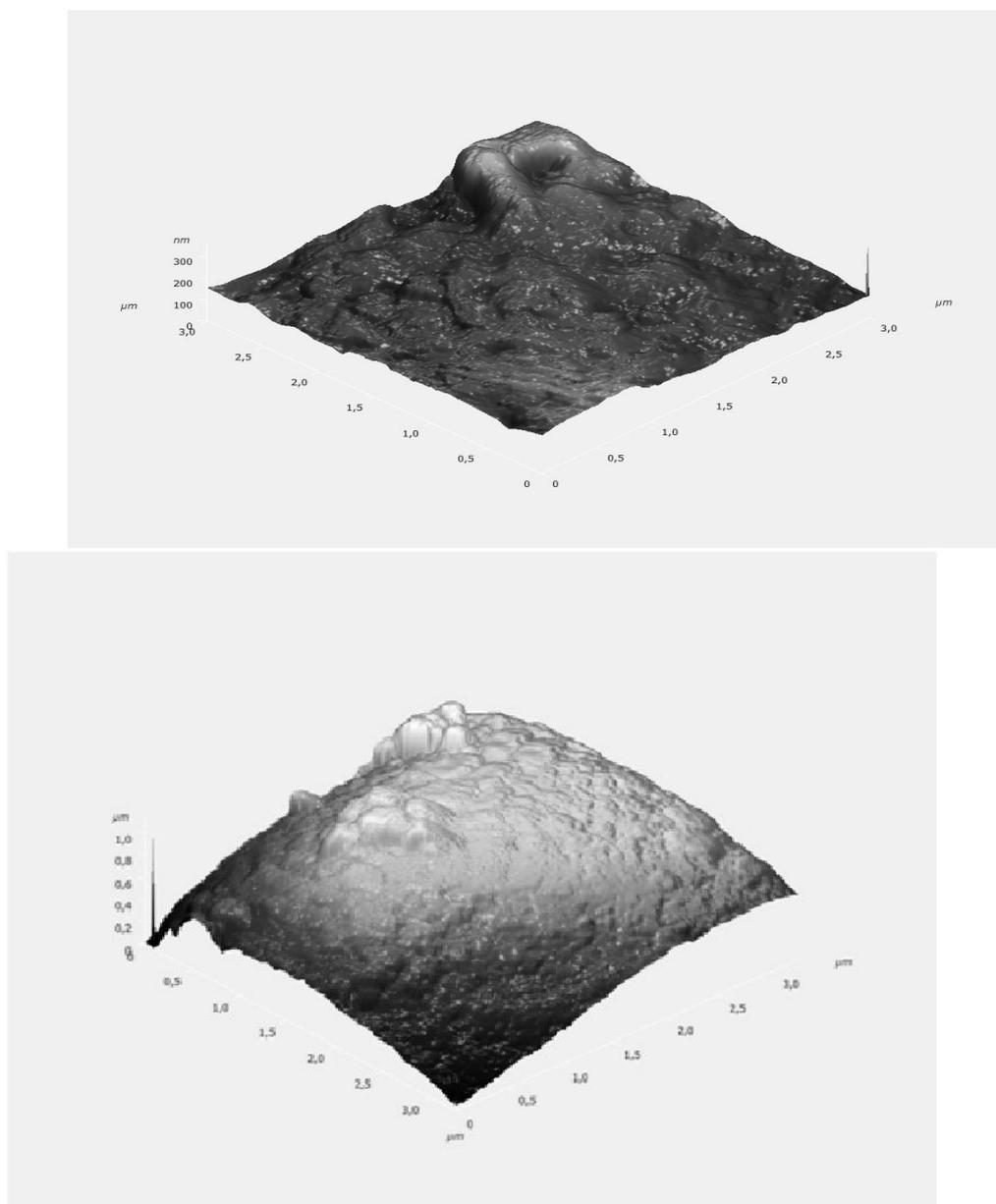


Рис. 3. 3D-скан участка мембраны лимфоцита: *a* – после адреналиновой нагрузки, *б* – после воздействия обзидана

Под влиянием адреналина возрастал модуль упругости (модуль Юнга) лимфоцитов на 36,4 % ( $p < 0,05$ ), при этом глубина погружения кантиле-

вера уменьшалась на 122 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 2). Обзидан существенно не изменял жесткость клеточной поверхности.

Таблица 2

*Модуль Юнга лимфоцитов в условиях активации и блокады  $\beta$ -адренорецепторов*

Параметры	Плазма	Адреналин	Обзидан
Модуль Юнга, $\mu Pa$	$3,5 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,4^*$	$2,8 \pm 0,3$
Глубина погружения кантилевера, нм	$345,2 \pm 37,6$	$155,1 \pm 23,5^*$	$468,5 \pm 54,6$

\* – статистически достоверные различия между значениями в контроле и после адреналиновой / обзидановой нагрузок по критерию Стьюдента при  $p < 0,05$ .

Модуль Юнга характеризует способность поверхности сопротивляться упругим деформациям, возникающим при заданной величине напря-

жений [15], следовательно, чем больше его значения, тем меньше упругие деформации и выше жесткость клеток [20]. Увеличение жесткости

лимфоцитов после адреналиновой нагрузки происходило одновременно с изменениями ее рельефа, в частности, исчезали кластеры и появлялись глобулярные выступы. В условиях блокады  $\beta$ -адренорецепторов количество глобулярных выступов не изменялось, но высота их возрастала, а жесткость клеток практически не отличалась от значений в контроле. Не исключено, что увеличение жесткости лимфоцитов после адреналиновой нагрузки связано с появлением большого количества глобулярных выступов со сниженной высотой, что может изменить функциональные свойства клеток. Согласно экспериментальным данным [3] катехоламины (адреналин, норадреналин и др.) в концентрации  $10^{-6}$  М стимулируют агрегацию эритроцитов и адгезию лейкоцитов. Природа установленного феномена состоит в триггерной функции  $\beta$ -

адренорецепторов, активированных адреналином, которые запускают механизм клеточной адгезии лейкоцитов к эндотелиальной стенке посредством молекул CD62 (L-селектин) на ранней стадии диапедеза и CD11a (интегрин) при экстравазии лейкоцитов [18]. Повышенная адгезия «жестких» клеток к сосудистой стенке в организме может спровоцировать длительные остановки кровотока, приводящие к нарушению микроциркуляции и ухудшению оксигенации тканей [19, 21].

Таким образом, под влиянием адреналина возрастает жесткость мембран, которая сопровождается изменениями в citoархитектонике клеток в виде увеличения количества глобулярных выступов и уменьшения разнородности кластеров на поверхности лимфоцитов.

### Библиографический список

1. Гуцина, Ю. Ю. Исследования различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии [Текст] / Ю. Ю. Гуцина, С. К. Плескова, М. В. Звонкова // Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования. – 2005. – №1. – С. 48–53.
2. Демин, С. Ю. Основные типы и жизненные формы периферических и ФГА-стимулированных лимфоцитов человека, выявляемые *in vitro* [Текст] / С. Ю. Демин // Цитология. – 2003. – Т.45, № 11. – С.1149–1159.
3. Замышляева, М. В. Патогенетические механизмы и сигнальные пути изменений агрегаций эритроцитов и адгезии лейкоцитов при нарушениях сосудистого тонуса и воспалении [Текст] : автореф. дисс. ... к. м. н. / М. В. Замышляева. – Москва, 2007. – 24 с.
4. Козинец, Г. М. Поверхностная архитектура клеток периферической крови [Текст] / Г. М. Козинец, Ю. Симоварт. – Таллин : Валгус, 1984. – 116 с.
5. Лебедев, Д. В. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа [Текст] / Д. В. Лебедев, А. П. Чукланов, А. А. Бухараев, О. С. Дружинина // Письма в ЖТФ. – 2009. – Т. 35. Вып. 8. – С. 54-61.
6. Новицкий, В. В. Особенности поверхностной архитектуры лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких [Текст] / В. В. Новицкий // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 10. – С. 3–6.
7. Новодержкина, Ю. К. Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии [Текст] / Ю. К. Новодержкина, З. Г. Шишканова, Г. И. Козинец. – М. : Триада-Фарм, 2004. – 152 с.
8. Пат.2398234 Российская Федерация, МПК G01N33/49 Способ исследования нативных клеток [Текст] / Федорова М. З., Чернявских С. Д., Скоркина М. Ю., Сладкова Е. А., Забиняков Н. А. Заявитель и патентообладатель БелГУ. – № 2009125268, заявл. 01.07.2009; опубл. 27.08.2010.
9. Скоркина, М. Ю. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силового микроскопа [Текст] / М. Ю. Скоркина, С. Д. Чернявских, М. З. Федорова, Е. А. Сладкова, Н. А. Забиняков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т.150, №2. – С. 273–275.
10. Скоркина, М. Ю. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов [Текст] / М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, С. Д. Чернявских, Е. А. Сладкова, Н. А. Забиняков // Цитология. – 2011. – Т.53, № 1. – С. 17–21.
11. Федорова, М. З. Использование атомно-силового микроскопа для оценки морфометрических показателей клеток крови [Текст] / М. З. Федорова [и др.] // Биофизика. – 2008. – Т.53, №6. – С. 555–558.
12. Alonso, J.L. Felling the forces: atomic force microscopy in cell biology [Text] / J.L. Alonso, W.H. Goldman // Life Sci. – 2003. – V. 72. – P. 2553-2560.
13. A-Hassan, E. Microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy / E. A-Hassan, N.P. D'Costa, S. Nageswaran, C.N. Schoenberger, J.H. Hoh [Text] // Biophys. J. – 1998. – V. 74 (3). – P. 1564-1578.
14. Benoit, M. Measuring cell adhesion force with the atomic force microscope at the molecular level [Text] / M. Benoit, H. E. Gaub // Cell tissues organs. – 2002. – V. 172. – P. 174-189.
15. But, H-J. Capillary forces between soft, elastic spheres [Text] / H-J. But, W. Jon, P. Barnes, A. Campo // Soft Matter. – 2010. – V. 6. – P.5930-5936.
16. Butt, H.E. Force measurements with the atomic force microscopy: technique, interpretation and applica-

tion [Text] / H.J. Butt, B. Capella // Surf. Sci. Rep. – 2005. – V. 59. – P. 1-152.

17. Capella, B. Force distance curves by atomic force microscopy [Text] / B. Capella, G. Dietlr // Surf. Sci. Rep. – 1999. – V. 34. – P. 1-104.

18. Coupade, C.  $\beta$ 2-Adrenergic receptor-dependent sexual dimorphism for murine leukocyte migration / C. Coupade, A.S. Brown, P.F. Dazin, J.D. Levine, P.G. Green [Text] // J Neuroimmunol. – 2007. – V.186 (1-2). – P. 54-62.

19. Dong, C. Mechanics of leukocyte deformation and adhesion to endothelium in shear flow / C. Dong, J. Cao, E.J. Struble [Text] // Ann. Biomad. Eng. – 1998. – V. 27 (3). – P. 298-312.

20. Pera, I. Using the atomic force microscope to study the interaction between two solid supported lipid bilayers and the influence of Synaptin I / I. Pera, R. Stark, M. Kappl., H. Butt, F. Benfenati [Text] // Biophysical J. – 2004. – V. 87. Issue 4. – P. 2446-2455.

21. Ritter, L.S. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes after stroke / L.S. Ritter, J.A. Orozco, P.M. Coull, P.F. McDonagh [Text] // Stroke. – 2000. – V. 31. – P. 1153-1161.

Takeuchi, M. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy [Text] / M. Takeuchi, H. Miyamoto, Y. Sako, H. Komizu, A. Kusumi // Biophys. J. -1998. – V. 74. – P. 2171-2183.