

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КЛЕТОК РС12 ДО И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВНЕШНЕГО ИНДУКТОРА АПОПТОЗА – ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Л.В.Кухаренко¹, Г.К.Ильич¹, В.Г.Лещенко¹, Р.И.Гронская², А.А. Кухаренко³

¹Белорусский государственный медицинский университет, пр-т.Дзержинского,83, 220116, Минск,Беларусь, e-mail: kukharenko@msmi.minsk.by

²Институт физиологии, ул.Академическая,28, 220072, Минск, Беларусь

³Белорусский государственный университет

Введение

Методы СЗМ позволяют достигать уникальных научных результатов при изучении структуры и свойств различных биологических материалов. В работе исследовалась морфология поверхности клеток феохромоцитомной линии РС12 до и после воздействия внешнего индуктора апоптоза - пероксида водорода (H_2O_2) при разных методиках фиксирования клеток и на разных подложках методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) (DimensionTM 3000 и Nanoscope IIIa, Solver-P47).

Клетки крысиной феохромоцитомы РС12 являются нейронной клеточной моделью для изучения процессов клеточного роста, метаболизма, апоптоза [1,2]. Изучение и расшифровка механизмов апоптоза (программированной смерти клеток) являются одним из наиболее актуальных направлений современной биофизики. Посредством апоптоза организм избавляется от «ненужных» в функциональном отношении на данный момент клеток, или потенциально опасных клеток. Путем апоптоза устраняются трансформированные клетки, например, при вирусной инфекции или повреждении ДНК в случае облучения.

Особое место среди разнообразных регуляторов активности клеток занимают активные формы кислорода (АФК), обладающие высокой биологической активностью. Показано, что АФК, и, в частности H_2O_2 , как наиболее стабильной АФК могут инициировать внутриклеточные программы приводящие к гибели клеток. В отличие от радикалов и ионов H_2O_2 – это устойчивая в растворах молекула. Следует отметить, что из всех АФК только H_2O_2 может реагировать с веществами не только радикальным, но и безрадикальным путем. Действие перекиси водорода на клетки во многом определяется типом клетки, местом приложения (мишенью) действия агента и концентрацией агента. Специфичность действия цитотоксических доз H_2O_2 на клетки заключается в том, что в высоких концентрациях H_2O_2 инициирует гибель клеток посредством их разрушения (некроз), а в малых концентрациях - индуцирует апоптотический путь гибели клеток посредством изменения внутриклеточных сигнальных процессов [3]. Для апоптотической клетки характерно наличие специфических морфологических признаков. Неразрушающий характер исследований, высокое пространственное разрешение и возможность проведения экспериментов в жидких средах делают метод АСМ особенно перспективным для изучения морфологии поверхности клеток РС12 до и после воздействия внешнего индуктора апоптоза - пероксида водорода.

Методы исследования

В работе использовались клетки феохромоцитомной линии РС12, которые культивировали на среде RPMI-1640 с добавлением 10 – 15% лошадиной сыворотки и

5% телячьей сыворотки. Клетки выращивали в CO_2 –инкубаторе при температуре 37°C . В первой серии экспериментов исследовались клетки, выращенные на подложках из слюды и стекла, фиксированные в 4% растворе формалина и высушенные на воздухе. Одна группа клеток была контрольной, другая подвергалась воздействию 0.5 mM раствора H_2O_2 в течение 20 мин. Во второй серии экспериментов исследовались клетки PC12, выращенные на подложках из слюды и стекла и высушенные на воздухе без фиксации в растворе формалина. Как и в первом случае, одна группа клеток была контрольной, другая - подвергалась воздействию 0.5 mM раствора H_2O_2 в течение 20 мин.

Исследования морфологии поверхности клеток PC12 до и после воздействия H_2O_2 проводились на атомно-силовых микроскопах DimensionTM 3000 и Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa-Barbara, USA), а также Solver-P47 (Нанотехнология-МДТ, Зеленоград, Россия) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием стандартных кремниевых кантилеверов ($k=29\text{-}57 \text{ н/м}$, Nanosensors GmbH).

Результаты

На рис.1 представлено трехмерное изображение клетки PC12 фиксированной на стекле в 4% растворе формалина и не подверженной воздействию H_2O_2 . Клетка характеризуется следующими размерами: ширина $\sim 9 \text{ мкм}$, высота $\sim 2.5 \text{ мкм}$. На рис.2 приведено трехмерное изображение клетки PC12 фиксированной на стекле в 4% растворе формалина после воздействия H_2O_2 . Размеры клетки претерпевают значительные изменения после воздействия H_2O_2 : ширина увеличивается до $\sim 10.5 \text{ мкм}$, а высота уменьшается до $\sim 1.8 \text{ мкм}$. Клетка становится более плоской, и на ее поверхности видны локальные выпячивания наружной мембраны. Можно предположить, что под ними находятся остатки фрагментированного ядра. После воздействия H_2O_2 клетка «расплывается», при этом наблюдается обратная корреляция между шириной и высотой клетки. Известно [3], что гибель клеток при воздействии H_2O_2 в цитотоксических дозах может происходить по одному из двух механизмов: некротическому и апоптическому. Для апоптической клетки характерно наличие специфических морфологических признаков. Клетка обычно уменьшается в размерах в результате дегидратации и соответственно конденсации цитоплазмы. Апоптоз характеризуется конденсацией хроматина и внутриклеточных органелл. Ядерные фрагменты вместе с содержимым цитоплазмы, включая органеллы, окружаются фрагментами плазматической мембраны. Можно предположить, что наблюдаемое на рис.2 изменение морфологии поверхности клеток PC12 после воздействия 0.5 mM раствора H_2O_2 в течение 20 мин. соответствует апоптическому механизму гибели клеток.

Клетки фиксированные в формалине высокие, имеют шероховатую поверхность, что затрудняет визуализацию индивидуальных клеток, т.к. не хватает разрешения пьезотрубки по z-координате. Вообще высокие и круглые клетки, имеющие несколько точек соприкосновения с подложкой, являются наиболее трудным объектом для АСМ исследований. Типичный размер окна сканирования для фиксированных на стекле клеток составлял $5 - 7 \text{ мкм}$. На АСМ изображениях поверхности мембраны наблюдаются гранулы, их размер составляет $\sim 100\text{-}220 \text{ нм}$ и высота $\sim 14 - 37 \text{ нм}$. Вероятно, гранулы представляют комплексы белковых молекул. После воздействия H_2O_2 , поверхность клетки становится более плоской и размер гранул уменьшается. Возможно, в данном случае были визуализированы отдельные белковые молекулы. Использование слюды с атомарно-гладкой поверхностью в качестве подложки,

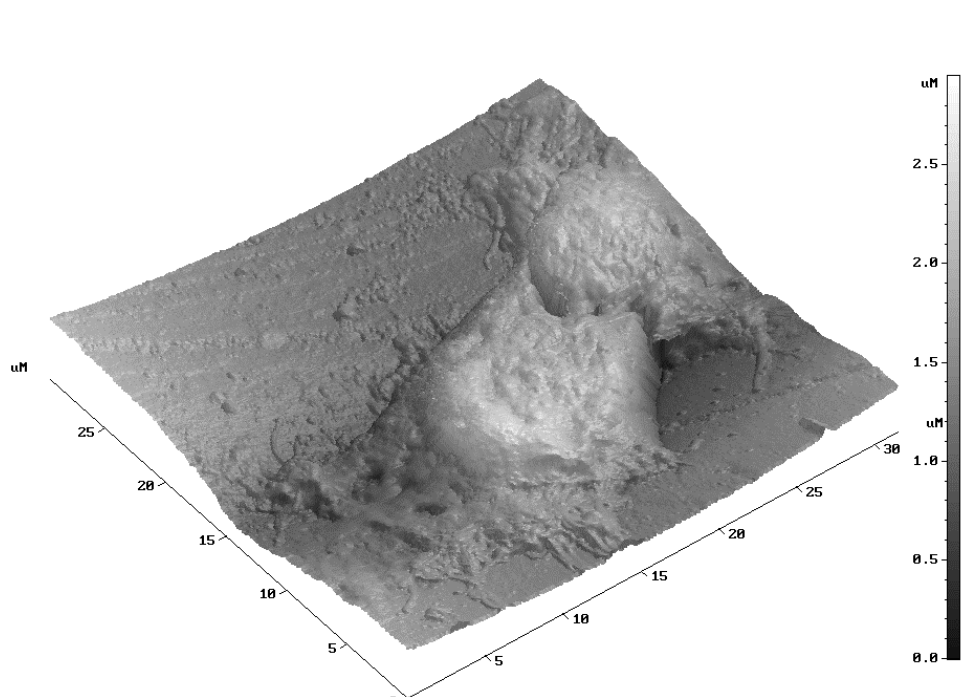


Рис.1. АСМ изображение клетки РС12 фиксированной на стекле до воздействия H_2O_2 . Режим прерывистого контакта. Размер окна сканирования $30 \times 30 \text{ мкм}^2$.

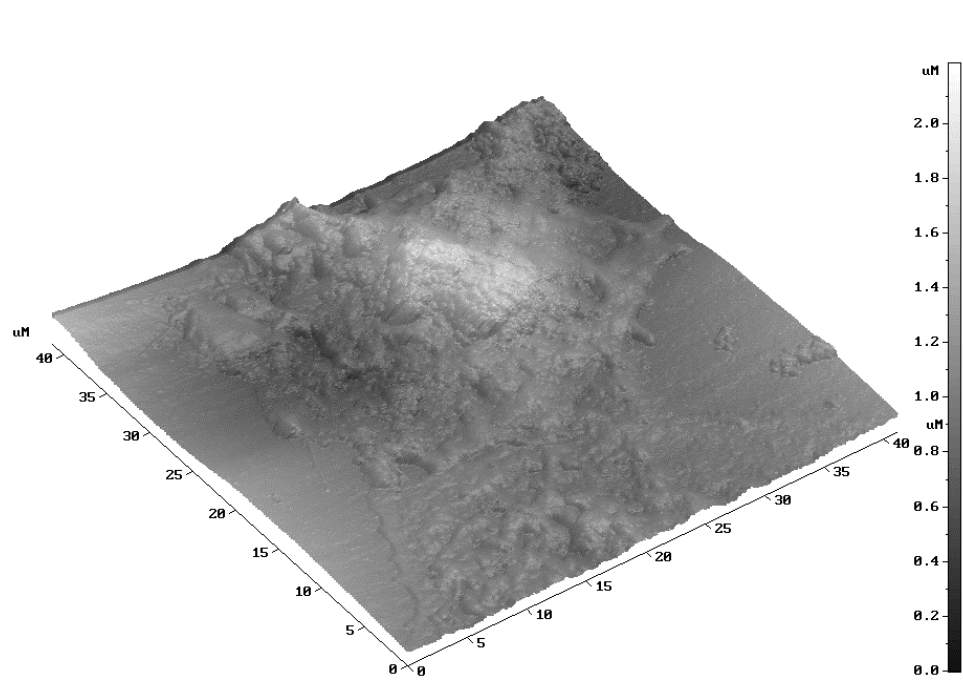


Рис.2. АСМ изображение клетки РС12 фиксированной на стекле после воздействия H_2O_2 . Режим прерывистого контакта. Размер окна сканирования $40 \times 40 \text{ мкм}^2$.

позволило увеличить окно сканирования и визуализировать индивидуальные контрольные клетки, фиксированные в формалине.

Во второй серии экспериментов исследовались клетки РС12, выращенные на подложках из слюды и стекла и высушенные на воздухе без фиксации в растворе формалина. Как и в первом случае, одна группа клеток была контрольной, другая - подвергалась воздействию 0.5 mM раствора H_2O_2 в течение 20 мин. На рис.3а представлено АСМ изображение контрольных клеток РС12 на слюде. При высыхании клеток на твердой подложке без фиксации в формалине заметно уменьшение их высоты. Клетки имеют круглую форму, и размер их составляет 9-10 мкм. Результаты

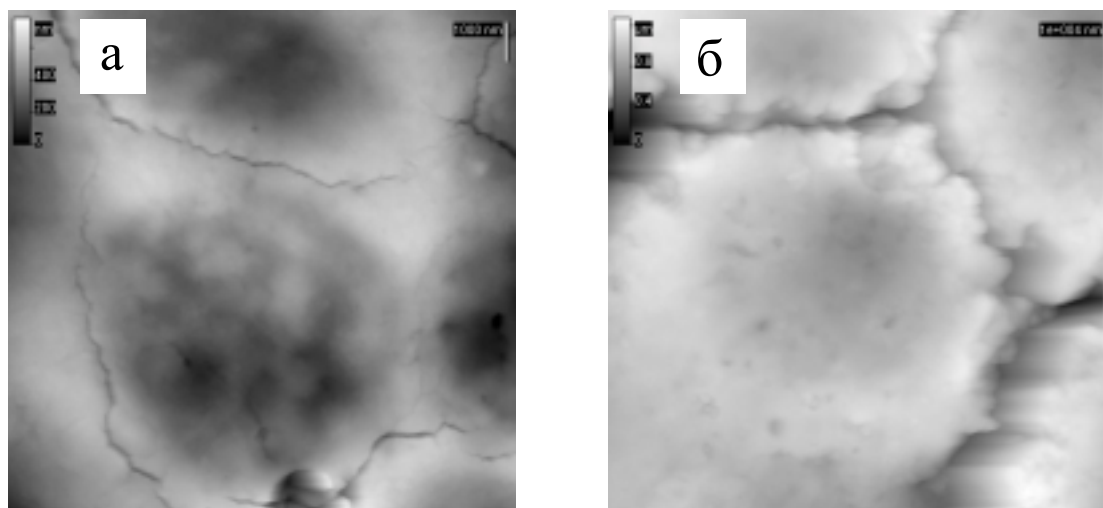


Рис. 3. АСМ изображение клеток РС12 (а) - до воздействия H_2O_2 , (б) - после воздействия H_2O_2 . Клетки на подложке из слюды высушены на воздухе без фиксации в 4% растворе формалина. Окно сканирования 13×13 мкм². Режим прерывистого контакта.

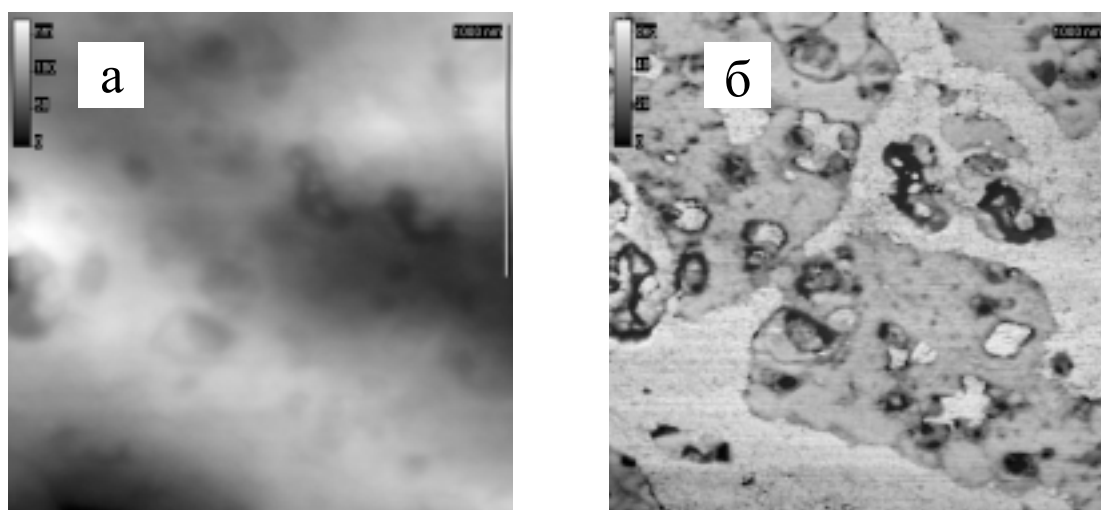


Рис. 4. (а) - АСМ изображение участка поверхности мембраны клетки РС12 после воздействия H_2O_2 . Клетки на подложке из слюды высушены на воздухе без фиксации в 4% растворе формалина. Окно сканирования 2×2 мкм². Режим прерывистого контакта.

б) – фазовое изображение того же участка поверхности мембраны.

атомно-силовой микроскопии указывают на однородную морфологию поверхности клеток.

На рис.3б приведены изображения клеток PC12 на слюде после воздействия 0.5 mM раствора H_2O_2 в течение 20 мин. С применением АСМ выявлены существенные различия в поверхностной морфологии клеток до и после воздействия H_2O_2 . Клетки увеличиваются в размерах (10 – 12 мкм) и набухают. Уменьшение окна сканирования позволяет наблюдать изменения, произошедшие с цитоплазматической мембраной клетки (рис.4). Целостность мембраны нарушается, визуализируются полости размером от 30 до 370 нм. Визуализируемое разрушение мембранных структур, по-видимому, объясняется процессом перекисного окисления мембранных фосфолипидов.

Совершенно противоположная картина наблюдается, если в качестве подложки использовать стекло. На рис5а,б. приведены АСМ изображения клеток PC12, выращенных на стекле, до и после воздействия H_2O_2 . Контрольные клетки, выращенные на слюде и на стекле, практически имеют одинаковую морфологию поверхности. Однако морфология поверхности клеток на стекле после воздействия H_2O_2 существенно видоизменяется, по сравнению с такими же клетками на слюде. Клетки на стеклянных подложках после воздействия H_2O_2 уменьшаются в размерах (~ 8 мкм) и становятся более плоскими. На поверхности клеток видны локальные выпячивания наружной мембраны. По-видимому, под ними находятся остатки фрагментированного ядра. При малых окнах сканирования не наблюдается существенных нарушений целостности мембраны (рис.6). Можно предположить, что в данном случае наблюдается апоптотический механизм гибели клеток.

С применением АСМ выявлены существенные различия в морфологии клеток в контроле и подвергнутых воздействию H_2O_2 . Обнаружено, что морфология клеток, подвергнутых воздействию окислителей и высушенных на стекле, и клеток, высушенных на слюде, существенно различается.

Размер контрольных клеток на слюде, не фиксированных в формалине, составляет примерно 10 мкм. При уменьшении окна сканирования до 2 мкм визуализируется гранулярная структура поверхности клеточной мембраны. Размер гранул составляет от 30 до 120 нм. После воздействия H_2O_2 наблюдается увеличение

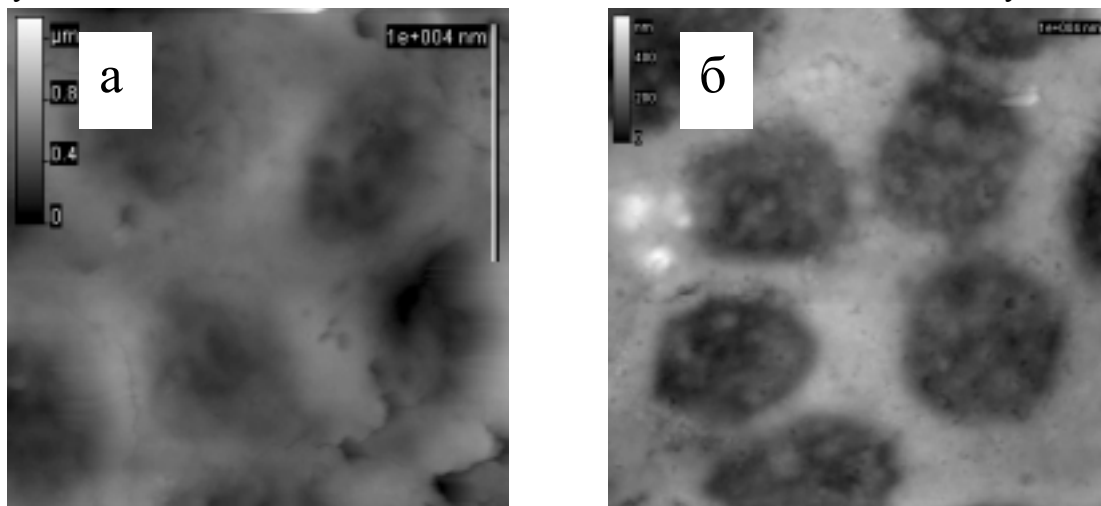


Рис. 5. АСМ изображение клеток PC12 (а) - до воздействия H_2O_2 , (б) - после воздействия H_2O_2 . Клетки на подложке из стекла высушены на воздухе без фиксации в 4% растворе формалина. Окно сканирования (а) - $21 \times 21 \text{ мкм}^2$, (б) - $25 \times 25 \text{ мкм}^2$. Режим прерывистого контакта.

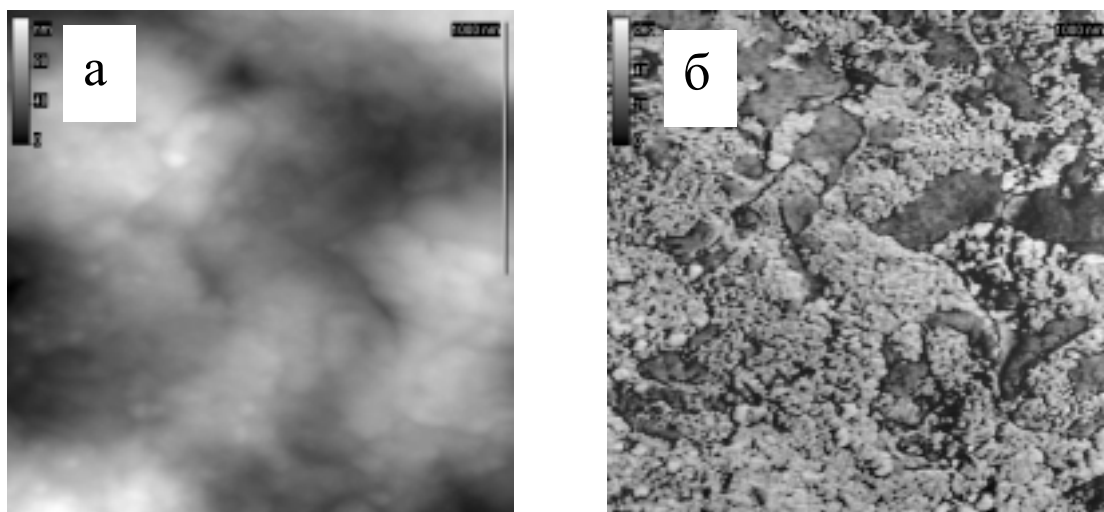


Рис. 6. (а) - АСМ изображение участка поверхности мембраны клетки РС12 до воздействия H_2O_2 . Клетки на подложке из слюды высушены на воздухе без фиксации в 4% растворе формалина. Окно сканирования $2 \times 2 \text{ мкм}^2$. Режим прерывистого контакта.

(б) – фазовое изображение того же участка поверхности мембраны.

размеров клеток на слюде. Целостность мембраны нарушается, визуализируются полости размером от 30 до 370 нм, что, по-видимому, объясняется процессами перекисного окисления мембранных фосфолипидов.

Клетки на стеклянных подложках после воздействия H_2O_2 уменьшаются в размерах ($\sim 8 \text{ мкм}$) и становятся более плоскими. На поверхности клеток видны локальные выпячивания наружной мембраны. Нарушений целостности мембраны не наблюдается. Можно предположить, что гибель клеток в данном случае обусловлена апоптозом.

Литература

1. J. Avery, D. Ellis et. al. // The Journal of Cell Biology 148 2 (2000) 317.
2. R. Bhatia, H. Lin, R. Lal // FASEB Journal 14 9 (2000) 1233.
3. M. Zheng, F. Aslund, G. Storz // Science 279 (1998) 1718.