

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФИЗИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Столбовская О.В.¹, Хайруллин Р.М.¹, Костишко Б.Б.², Пчелинцева Е.С.²

THE ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF MORPHOLOGICAL AND BIOPHYSICAL FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN DIFFERENT TYPES OF DIABETES MELLITUS

STOLBOVSKAYA O.V., KHAYRULLIN R.M., KOSTISHKO B.B., PCHELINTSEVA E.S.

¹Кафедра анатомии человека (зав. кафедрой – профессор Р.М. Хайруллин) медицинского факультета; ²лаборатория материаловедения (зав. лабораторией – к.ф.-м.н. Д.В. Козлов) «Научно-исследовательского института им. С.П. Капицы» ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ, г. Ульяновск.

Атомно-силовая микроскопия (далее - АСМ), как один из ведущих прикладных нано-технологических методов исследования клеточных мембран, активно используется в ключевых областях биомедицины. Изучение биофизических свойств мембран и морфологических параметров лимфоцитов с помощью АСМ может дать существенную информацию о закономерностях структурных изменений их цитоплазматической мембраны в процессе развития сахарного диабета, развития нарушений метаболизма, микроциркуляции и иммунитета. Целью настоящего исследования явилось изучение ряда морфологических и биофизических особенностей лимфоцитов крови пациентов с сахарным диабетом с помощью АСМ. Материалом исследования явились лимфоидные клетки препаратов крови пациентов с инсулин-зависимым (ИЗСД) и инсулиннезависимым типом сахарного диабета (ИНСД) и практически здоровых добровольцев. Для анализа состояния мембраны лимфоцитов использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). Сканирование клеточной поверхности мембраны лимфоцитов крови проводили с использованием кремниевых зондов серии PNP-DB-20 (NT-MDT) с жёсткостью 0,06 Н/м, радиусом закругления 10 нм. АСМ-изображения клеток анализировали с помощью программы Nova. На основании анализа АСМ-изображения определяли морфологические параметры лимфоцитов: диаметр, высоту, площадь, объём; а также биофизические параметры: модуль Юнга, силу адгезии, шероховатость лимфоцитов крови. Результаты исследования показали, что при сахарном диабете происходит значительное повышение жёсткости

мембран лимфоцитов крови по сравнению с аналогичными показателями лимфоцитов крови здоровых людей. Адгезивные свойства и рельеф поверхности лимфоцитов при разных типах сахарного диабета различаются. У пациентов с ИЗСД значения силы адгезии и шероховатости клеток выше, чем у пациентов с ИНСД. Морфометрические параметры лимфоцитов крови пациентов с ИЗСД также превышают аналогичные параметры пациентов с ИНСД. Выявленные с использованием АСМ морфологические и биофизические особенности лимфоцитов крови пациентов с разными типами сахарного диабета могут иметь патогенетическое значение в развитии иммунологических нарушений, возникающих при этом заболевании.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, клеточная мембрана, лимфоциты, сахарный диабет

The atomic force microscopy (hereinafter - AFM) is one of the leading applications of Nanotechnological research methods of cell membranes widely used in key areas of biomedicine. The study of the biophysical properties of the membrane and morphological parameters of lymphocytes by AFM can provide essential information about the patterns of structural change of the cytoplasmic membrane in the development of diabetes, disorders of metabolism, microcirculation and immunity. The purpose of this study was to investigate a number of morphological and biophysical characteristics of blood lymphocytes of patients with diabetes mellitus by AFM. The material of the study was lymphoid cells of peripheral blood of patients with insulin-dependent (IDDM) and non-insulin dependent type of diabetes mellitus (NIDDM), and healthy volunteers. For analysis of the membrane of lymphocytes was used a scanning probe microscope Solver P47-PRO (NT-MDT, Russia). Scanning cell surface of the membrane of blood lymphocytes were performed using silicon probes series PNP-DB-20 (NT-MDT) with a hardness of 0.06 N/m, with the radius of curvature of 10 nm. AFM images of the cells were analyzed using the

computer program Nova. Based on analysis of AFM images were determined morphological parameters of blood lymphocytes: diameter, height, area, volume; and biophysical parameters: Young's modulus, strength, adhesion, roughness. The results showed that in Diabetes mellitus is a significant increase in membrane rigidity blood lymphocytes as compared to those of the blood lymphocytes of healthy people. The adhesion properties and surface topography of lymphocytes in different types of diabetes is differing. At patients with IDDM values of adhesion strength and roughness of cells is higher than in patients with NIDDM. The morphometric parameters of blood lymphocytes of patients with IDDM also exceed similar parameters in patients with NIDDM. Identified using AFM morphological and biophysical characteristics of peripheral blood lymphocytes of patients with different types of diabetes may have a pathogenic role in the development of immunologic disorders occurring in this disease.

Key words: *atomic force microscopy, cell membrane, lymphocytes, diabetes mellitus*

Введение. При сахарном диабете происходят нарушения углеводного и липидного обмена, развиваются аутоиммунные реакции, которые в свою очередь являются факторами риска развития сосудистых осложнений [1, 2]. В условиях гипергликемии, повышения содержания липопротеидов в крови, окислительного стресса закономерно возникают структурные нарушения клеточной мембраны, которые проявляются, в том числе и в изменениях биофизических свойств лимфоцитов крови [3, 4, 5]. Наиболее важными из них являются изменения упруго-эластических свойств, жёсткости мембран, шероховатости, которые определяют способность лимфоцитов к адгезии, перемещению по сосудам и хомингу. Структурная дезорганизация цитоплазматической мембраны лимфоцитов при сахарном диабете может создавать предпосылки к нарушению их функциональной активности в процессе развития инсулинозависимого (ИЗСД) и инсулинезависимого диабета (ИНСД). АСМ как один из ведущих прикладных нано-технологических методов исследования клеточных мембран в последнее время активно используется в ключевых областях биомедицины. Несмотря на то, что этот вид неоптической микроскопии появился сравнительно недавно, разработан целый спектр методических приёмов к измерению поверхностных локальных свойств мембраны различных клеток [1, 2]. Изучение биофизических свойств мембран и морфологических параметров живых лимфоцитов с помощью АСМ может дать существенную информацию о закономерностях указанных выше изменений у пациентов с сахарным диабетом [6, 7, 8, 9].

Цель исследования - изучить морфологические и биофизические особенности живых лимфоцитов пациентов с сахарным диабетом с помощью атомно-силовой микроскопии.

Материал и методы исследования. Материалом для исследования послужили лимфоидные клетки препаратов крови пациентов с инсулинозависимым (ИЗСД) и инсулинезависимым сахарным диабетом (ИНСД). Исследованы препараты крови 20 пациентов отделения эндокринологии ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница № 1» Минздрава Ульяновской области. Пациенты с ИЗСД получали человеческий рекомбинантный инсулин в индивидуальной дозе по интенсифицированной схеме. В качестве контроля использовали лимфоциты препаратов крови 10 практически здоровых добровольцев. Кровь стерильно забирали из локтевой вены в пробирки с гепарином в процедурном кабинете отделения эндокринологии ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница № 1» Минздрава Ульяновской области. На все виды исследований были получены разрешения локальной этической комиссии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ. Все исследования проводились с соблюдением прав и свобод, определённых законодательством РФ, этическими нормами и принципами в соответствии с Декларацией Хельсинки (1964) со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на человеке, а также международным руководством для биомедицинских исследований с вовлечением человека (International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects) Совета международных организаций медицинских наук (CIOMS). Все процедуры исследований были обезличены в соответствии требованиями п. 3 ст. 6 действующего Федерального закона РФ 152-ФЗ «О персональных данных».

Лимфоциты крови выделяли в градиенте плотности фикола-верографина ($\rho=1,092 \text{ г/см}^3$). Полученную суспензию лимфоцитов объёмом 100 мкл культивировали в чашках Anumbra в растворе Хенкса при 37°C и 5% CO_2 в течение 20 минут для обеспечения спонтанной адгезии к пластиковой подложке. Затем производили смену среды Хенкса на питательную среду 199, содержащую 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина и инкубировали в ней клетки в течение 60 минут. Для анализа состояния мембраны лимфоцитов использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). На каждом препарате проводили сканирование 15 и более лимфоцитов в контактном режиме в водной среде (рис. 1-А). Сканирование мембраны клеточной поверхности лимфоцитов крови проводили с использованием

Таблица.

Значения морфометрических и биофизических параметров лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и пациентов с разными типами сахарного диабета (M±σ)

Наименование параметров	Лимфоциты контрольной группы	Лимфоциты пациентов с ИЗСД	Лимфоциты пациентов с ИНСД
Диаметр, μm	11,36 ± 0,34	11,66 ± 0,34#	9,57 ± 0,18*#
Высота, μm	2,54 ± 0,05	2,18 ± 0,06*	2,36 ± 0,06*
Площадь, μm^2	85,64 ± 3,49*	84,51 ± 3,18#	72,38 ± 2,85*#
Объём, μm^3	91,01 ± 5,42	87,64 ± 4,60	75,87 ± 5,77*
Коэффициент уплощённости, отн. ед.	35,70 ± 1,06*	36,63 ± 1,07#	30,06 ± 0,55*#
Модуль Юнга, МПа	0,15±0,01*	0,56±0,03*	0,53±0,04*
Адгезия, nN	4,75±0,02*	8,26 ± 2,13*#	3,43±0,22*#
Шероховатость (Ra), nm	365,45±11,25*	325,49±9,02*	317,31±10,19*

Примечание: * - статистически значимые различия контрольной и опытной групп; # - статистически значимые различия опытных групп между собой

кремниевых зондов серии PNP-DB-20 (NT-MDT) с жёсткостью 0,06 Н/м, радиусом закругления 10 нм. Полученные изображения поверхности клеточной мембраны лимфоцитов обрабатывали с помощью программы Nova (NT-MDT, Россия). Определяли следующие морфометрические параметры клеток: диаметр (d , μm) и высоту (h , μm) в микрометрах, площадь в квадратных микрометрах (S , μm^2), объём клеток в кубических микрометрах (V , μm^3) при помощи соответствующих опций программы (рис. 1-Б, 1-Г).

Для изучения биофизических параметров клеточной мембраны лимфоцитов в норме и при сахарном диабете оценивали модуль изометрического сжатия мембраны (модуля Юнга), характеризующего способность клетки к деформациям, возникающим при взаимодействии мембраны с вершиной зонда АСМ, при этом считали, что чем больше его значения, тем меньше упругие деформации клетки. Модуль Юнга клеточной мембраны лимфоцитов измеряли в мегапаскалях (МПа). Для расчёта модуля Юнга использовали модель Герца [10]. Из полученных серий силовых кривых (рис. 1-В) рассчитывали модуль Юнга в соответствии с моделью Герца для полусферического зонда [10]. Кроме этого, на основании морфологических данных, также полученных методом АСМ, вычисляли площадь соприкосновения клетки с подложкой, объём и коэффициент уплощённости по формуле для шарового сегмента, который выражали в

относительных единицах [11].

Для характеристики шероховатости поверхности образцов использовали среднюю арифметическую шероховатость (Ra), измеряемую в нанометрах (nm, рис. 1-В). Сила адгезии зонда к мембране лимфоцитов определялась по участку силовой кривой отвода, соответствующему отрицательному изгибу кантилевера перед отрывом от поверхности клетки (рис. 1-Д). Силу адгезии мембраны лимфоцитов измеряли в наноньютонах (nN). Все полученные изображения сканированных поверхностей клеточных мембран обрабатывали в программе Nova 1.0.26.1443. Статистическую обработку производили с помощью программы «Statistica 8.0, StatSoft Inc. (США) Статистическую значимость различий оценивали на основе U-критерия Манна-Уитни, за значимые принимали различия на уровне значимости 95% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. В результате АСМ-сканирования получены следующие морфометрические данные характеризующие лимфоциты крови пациентов с сахарным диабетом. Лимфоциты крови здоровых доноров и пациентов с ИЗСД имеют диаметр более 11 мкм, а у пациентов с ИНСД диаметр лимфоцитов меньше на 16% (табл. 1, $p < 0,05$). Для лимфоцитов пациентов с ИНСД характерно статистически значимое уменьшение площади и объема поверхности на 15% и 17% соответственно по сравнению

с лимфоцитами здоровых доноров и пациентов с ИЗСД (табл. 1, $p < 0,05$). Показатель уплощенности лимфоцитов пациентов с ИНСД снижался на 15% по сравнению с лимфоцитами доноров и пациентов с ИЗСД (табл. 1, $p < 0,05$). Морфометрические параметры лимфоцитов крови пациентов с ИЗСД превышают аналогичные параметры у пациентов с ИНСД (табл. 1). В крови пациентов с ИНСД преобладали лимфоциты меньших размеров, поверхность которых была менее шероховатой за счет уменьшения высоты разнообразной формы глобулярных выпячиваний, что может быть результатом реорганизации цитоскелета клеток [9, 12].

У пациентов с ИЗСД и ИНСД в живых лимфоцитах крови доказано увеличение величины модуля Юнга (модуля упругости) в среднем на 73%, по сравнению со здоровыми добровольцами (табл. 1, $p < 0,05$). Для лимфоцитов крови при сахарном диабете характерно повышение жесткости и снижение упруго-эластических свойств не только для живых, но и фиксированных лимфоцитов [3, 6]. Повышение жесткости лимфоцитов, по данным литературы, может быть связано с изменениями структурных элементов цитоскелета и дегградации фосфолипидного остова клеточной мембраны, затрудняющими их выход в сосудистое русло [9, 12]. Несмотря на это, сходные изменения жесткости лимфоцитов при разных типах сахарного диабета не приводят к однотипным изменениям в морфометрических показателях клеток и биологических свойствах клеточной мембраны. При ИЗСД нативные лимфоциты более распластаны по подложке, чем лимфоциты пациентов с ИНСД, об этом свидетельствует более высокие значения силы адгезии и шероховатости клеток пациентов с ИЗСД (табл. 1).

Величина клеточной адгезии отражает динамику изменений цитоскелетной организации и адгезионных взаимодействий между клеткой и субстратом. При анализе адгезионных карт методом АСМ, снятых с силовых кривых установлено, что адгезия цитолеммы лимфоцитов пациентов с ИЗСД увеличивается на 42,5% по сравнению с показателями здоровых доноров ($p < 0,05$). При ИНСД показатели адгезии лимфоцитов крови снижаются на 28 и 58% соответственно с показателями здоровых доноров и пациентов с ИЗСД (табл. 1, $p < 0,05$).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при сахарном диабете происходит значительное повышение жесткости мембран лимфоцитов крови по сравнению с аналогичными показателями крови здоровых людей. Адгезивные свойства и рельеф поверхности лимфоцитов при разных типах сахарного диабета различаются. У пациентов с ИЗСД значения силы адгезии и шероховатости клеток выше, чем у

пациентов с ИНСД. Морфометрические параметры лимфоцитов крови пациентов с ИЗСД также превышают аналогичные параметры пациентов с ИНСД. Выявленные морфологические и биофизические особенности живых лимфоцитов крови пациентов с разными типами сахарного диабета с помощью атомно-силовой микроскопии могут иметь патогенетическое значение в развитии иммунологических нарушений, возникающих при этом заболевании.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Заводник И.Б., Дремза И.К., Лапшина Е.А. Сахарный диабет: метаболические эффекты и окислительный стресс // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28. – № 2. – С. 83-94.
2. Wu Y, Lu H, Cai J, He X, Hu Yi, Zhao H, Wang X. Membrane Surface Nanostructures and Adhesion Property of T-Lymphocytes Exploited by AFM. *Nanoscale Res Lett.* 2009;4: 942-947. DOI 10.1007/s11671-009-9340-8
3. Гущина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфометрических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования. – 2005. – № 1. – С. 48-53.
4. Deng Z, Lulevich V, Liu F-T, Liu G-Y. Applications of Atomic Force Microscopy in Biophysical of Cells. *J Phys Chem B.* 2011; 114(18):5971-5982.
5. Dimitrialis EK, Horkay F, Maresca J. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J.* 2002;82:2798-2810.
6. Столбовская О.В., Хайруллин Р.М., Куликова Т.К., Снежкина А.В., Садритдинова А.Ф. Исследование вязкоэластических свойств цитоплазматической мембраны лимфоцитов крови человека методом атомно-силовой микроскопии // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 4. – С. 1149-1152.
7. Kuznetsova T, Starodubtseva M, Yegorenkov N. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron.* 2007;38:824-833.
8. Hekele J, Goesselsberger CG, Gebeshuber IC. Nanodiagnosics performed on human red blood cells with atomic force microscopy. *Material Science and technology.* 2008;24(9):1162-1165.
9. Skorkina MYu, Chernyavskiy SD, Fedorova MZ, Zabinyakov NA, Sladkova EA. Evaluation of Morphometric Parameters of Native Blood Cells by Atomic Force Microscopy. *Bull of Exp Biol and Med.* 2010; 150(2):273-275.
10. Лебедев Д.В., Чукланов А.П., Бухараев А.А. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа // Письма в ЖТФ. –

2009. - Т. 35. - № 8. - С. 54-61

11. Зубарева Е.В., Федорова М.З., Надеждин С.В., Павлов Н.А. Оценка действия тепловой нагрузки на морфофункциональные характеристики лимфоцитов крови в опытах *in vivo* и *in vitro*// *Научные ведомости*. - 2011. - № 3, Вып. 14. - С. 155-162.

12. Yumazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 2005;96:379-386.

Авторская справка:

1. Столбовская Ольга Вениаминовна, к.б.н., доцент кафедры анатомии человека, 432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, тел. +7 (842) 232 65 65, e-mail: ov_stolbovskaya@mail.ru

2. Хайруллин Радик Магзинурович, д.м.н., профессор, зав. кафедрой анатомии человека, 432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, тел. +7 (842) 232 65 65, e-mail: prof.khayrullin@gmail.com

3. Костишко Борис Борисович, стажер-исследователь лаборатории материаловедения 432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, тел.: +7 (842) 267 50 54, e-mail: nanolabniti@gmail.com

4. Пчелинцева Екатерина Сергеевна, к.ф.м.н., старший научный сотрудник лаборатории материаловедения, 432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, тел.: +7 (842) 267 50 54, e-mail: nanolabniti@gmail.com