

УДК 577.15.158:612,42]:616-092.9

ПЕРОКСИНИТРИТ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЫ И СТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ ТИМОЦИТОВ

И.А. Никитина, аспирант; М.Н. Стародубцева, к.б.н., доцент;
А.И. Грицук, д.м.н., профессор

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

С помощью методов атомно-силовой микроскопии изучены изменения формы и структуры поверхности тимоцитов крыс, вызванные действием пероксинитрита. Выявлено, что пероксинитрит в концентрации (30 мкмоль/л и 300 мкмоль/л) вызывает уменьшение объема тимоцитов, а также изменение рельефа клетки (структура поверхности становится более крупнозернистой).

Ключевые слова: тимоциты, пероксинитрит, окислительный стресс, атомно-силовая микроскопия

Changes in shape and surface structure of rat thymocytes were studied by atomic force microscopy methods. Peroxynitrite in concentration of 30 μM and 300 μM causes decrease in cell volume as well as change in cell relief (cellular surface structure becomes more large-grained).

Key words: thymocytes, peroxynitrite, oxidative stress, atomic force microscopy

Введение

Окислительный стресс клеток – одна из основных причин развития патологических процессов, а риск его возникновения – та цена, которую аэробный организм платит за высокоэффективную биоэнергетику [1]. Морфология иммунокомпетентных клеток, связанная с их функциональной активностью, отличается динамичностью и зависит от разнообразных факторов. Механизм развития ответной реакции тимоцитов на воздействие извне связан с усилением образования ими супероксид-анион радикала (O_2^-) и монооксида азота (NO). При взаимодействии этих агентов происходит образование пероксинитрита (ONOO^-). Механизмы влияния пероксинитрита на морфологию тимоцитов, особенно на структуру их поверхности, малоизучены.

Целью данной работы явилось выявление с помощью методов атомно-силовой микроскопии особенностей морфологии тимоцитов в норме и в условиях окислительного стресса, индуцированного действием пероксинитрита.

Материалы и методы

Тимоциты выделяли из тимуса половозрелых белых крыс. После умерщвления животных извлекали тимус, отмывали его от крови физиологическим раствором и охлаждали в фосфатном буфере (рН 7,4). Извлеченный орган сначала разрезали на крупные части, а затем пинцетом выщипывали более мелкие фрагменты. Полученный материал суспендировали в фосфатном буфере, а затем полученную суспензию тимоцитов фильтровали. Концентрированные путем центрифугирования тимоциты помещали в фосфатный буфер. Экспериментальный окислительный стресс вызывали обработкой суспензии тимоцитов пероксинитритом в концентрации 30 и 300 мкмоль/л. Для подготовки к АСМ-исследованиям тимоциты помещали на обезжиренное предметное стекло и инкубировали при комнатной температуре в течение часа. Затем ти-

моциты фиксировали 1% глутаровым альдегидом (20 мин), однократно промывали в фосфатном буфере и трехкратно – в дистиллированной воде. При обработке глутаровым альдегидом клетки сохраняют воду, и их АСМ изображение идентично изображению нативного тимоцита, в котором четко очерчены границы.

АСМ исследования проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашина», Беларусь). Использовали два режима сканирования: топография (topography) и сканирование латеральных сил (torsion). Сканирование проводили на участках поверхности разных размеров. Использование матрицы сканирования 9×9 мкм позволяет оценить поперечные размеры и общие особенности структуры тимоцитов. Для изучения поверхностных структур отдельных клеток использовали матрицы сканирования 4×4 мкм и $1,5 \times 1,5$ мкм. Обработку данных, полученных на атомно-силовом микроскопе, осуществляли с помощью программы SurfaceXplorer («МикроТестМашина», Беларусь) и «плагина» для программы обработки изображений ImageJ.

Результаты и обсуждение

Анализ данных АСМ-сканирования тимоцитов крыс (рис. 1, а) показал, что их поверхность в норме гладкая. Явно выраженные структурные элементы на поверхности клеток встречаются редко. В периферической области клеток, адгезированных к стеклянной пластине, наблюдаются единичные пальцеобразные структуры – филоподии (рис. 1, а). Способность клеток к направленному передвижению обусловлена реорганизацией цитоскелетных структур, в основном процессами сборки и разборки структур филоподий. Эти процессы, как показано нами ранее, зависят от концентрации пероксинитрита в среде [4].

Обработка тимоцитов пероксинитритом приводит к изменению их морфологических параметров. Диаметр тимоцитов, обработанных пероксинитри-

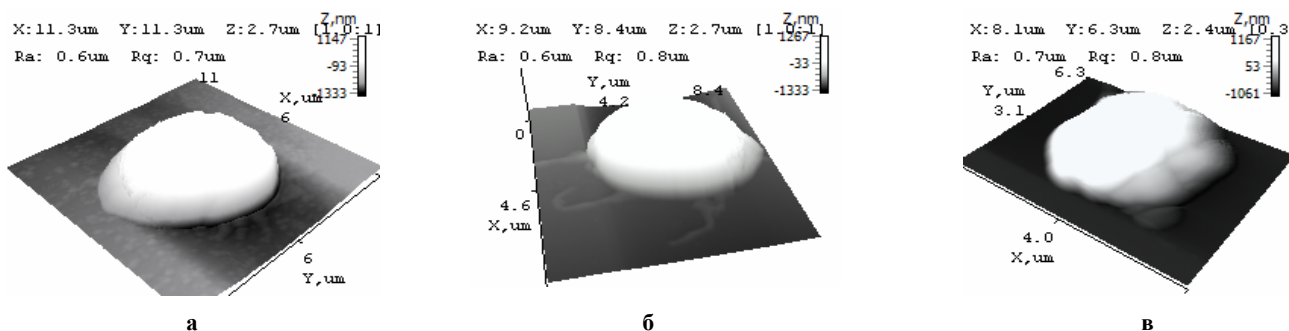


Рисунок 1 – Типичные АСМ-изображения тимоцитов крысы (топография, область сканирования 9 x 9 мкм). а – контроль; б – 30 мкмоль/л пероксинитрита; в – 300 мкмоль/л пероксинитрита

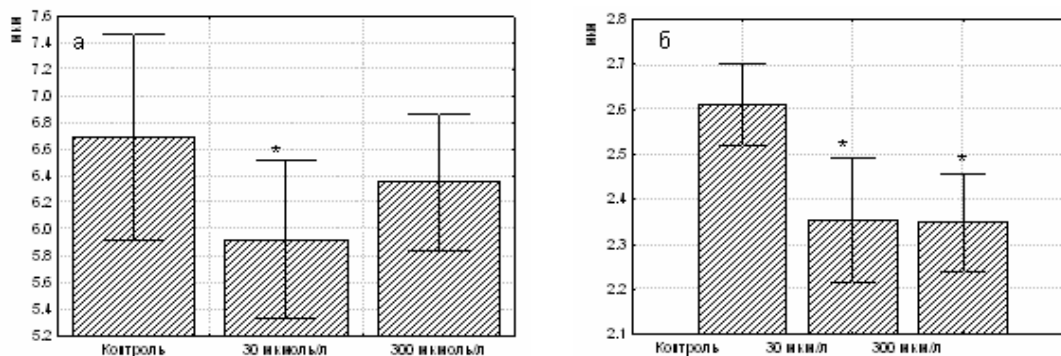


Рисунок 2 – Диаметр (а) и высота (б) контрольных и обработанных пероксинитритом тимоцитов (топография). Здесь и далее данные представлены в виде среднего выборочного и границы 95% доверительного интервала. (n=14–30). *p < 0,05, по сравнению с контролем (критерий Стьюдента)

том в концентрации 30 и 300 мкмоль/л, уменьшается примерно на 15 %, по сравнению с контролем (рис. 2а). При этом высота клеток после уменьшается в среднем на 2,5 мкм, по сравнению с контролем (рис. 3).

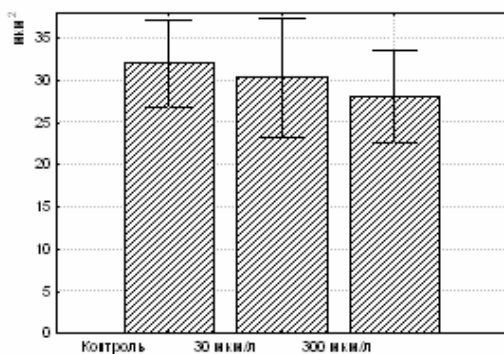


Рисунок 3 – Площадь контакта с подложкой контрольных и обработанных пероксинитритом тимоцитов

После часовой инкубации происходит адгезия клеток к подложке («распластывание» клеток по стеклянной плоской пластине). Площадь контакта тимоцитов с подложкой после обработки пероксинитритом уменьшается, но не существенно (рис. 2, б). В отличие от площади адгезионного контакта, площадь свободной поверхности тимоцитов после обработки пероксинитритом достоверно уменьшается как при концентрации 30, так и 300 мкмоль/л (рис 4).

Окислительный стресс приводит к уменьшению объема тимоцитов (рис. 5).

Чем выше концентрация пероксинитрита, тем больше уменьшается объем клеток. Эти изменения наблюдаются как в режиме топографии, так и на картах латеральных сил (рис. 5).

Индекс объема тимоцитов (отношение объема к площади поверхности клеток) возрастает при обработке клеток пероксинитритом в концентрации 30 мкмоль/л и, наоборот, уменьшается при обработке пероксинитритом в концентрации 300 мкмоль/л (рис. 6). Уменьшение объема клетки, приходящегося на единицу площади поверхности (уменьшение индекса объема), свидетельствует об увеличении удельных обменных потоков (вещество, энергия, информация) между клеткой и окружающей средой.

Уменьшение высоты клеток и уменьшение индекса объема при концентрации пероксинитрита 300 мкмоль/л свидетельствует об изменении формы клетки («уплощению» клеток).

Анализ клеточных характеристик, полученных при разных режимах АСМ-сканирования (топография и сканирование латеральных сил), позволяет заключить, что характеристики, относящиеся к режиму латеральных сил, являются более информативными, по сравнению с характеристиками режима «топография». Режим топографии позволяет оценить особенности структуры поверхности клеток, в то время как карты латеральных сил содержат информацию о структурно-механических свойствах поверхности.

Такие характеристики, как среднеарифметическая шероховатость, стандартное отклонение высот,

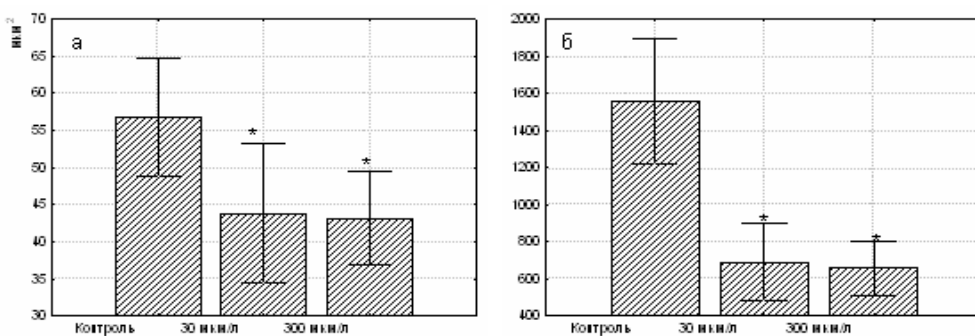


Рисунок 4 – Площадь свободной поверхности тимоцитов. а – топография; б – карта латеральных сил

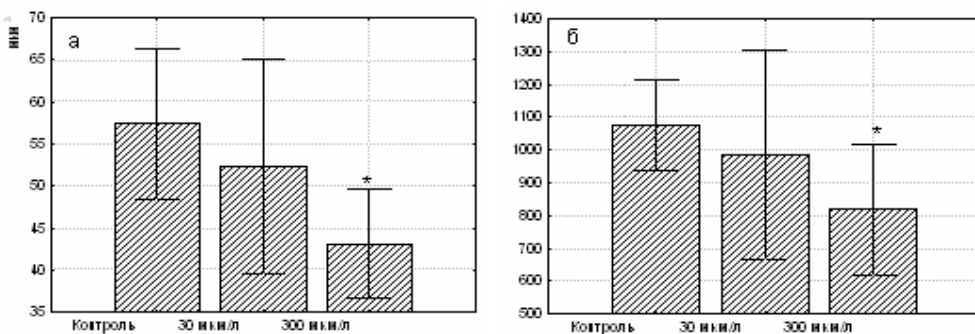


Рисунок 5 – Объем тимоцитов. а – топография; б – карта латеральных сил

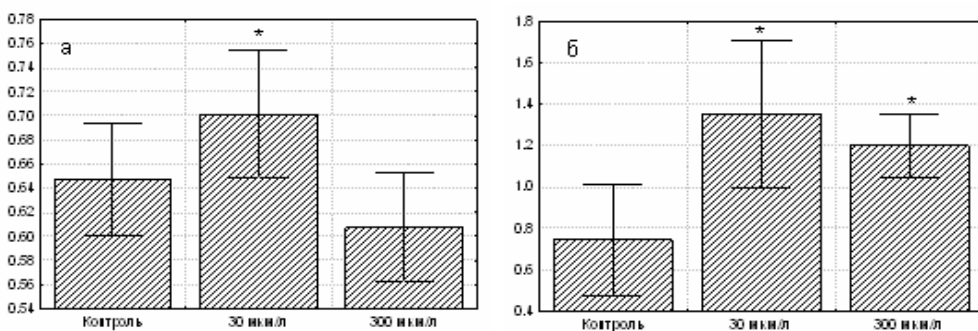


Рисунок 6 – Индекс объема тимоцитов (объем/площадь) а – топография; б – карта латеральных сил

Таблица 1 – Характеристики участков поверхности контрольных и опытных тимоцитов, полученные в режиме сканирования латеральных сил

Размер матрицы сканирования	Контроль	30 мкмоль/л пероксинитрита	300 мкмоль/л пероксинитрита
Стандартное отклонение			
4,0 Ч 4,0 мкм	1,34±0,24	0,86±0,18	3,18±0,69
1,5 Ч 1,5 мкм	1,23±0,28	0,80±0,09	2,66±0,45
Шероховатость			
4,0 Ч 4,0 мкм	0,99±0,19	0,69±0,15	2,41±0,54
1,5 Ч 1,5 мкм	0,94±0,22	0,66±0,07	2,08±0,37
Размах высот (в пределах 95% вариации)			
4,0 Ч 4,0 мкм	4,81±0,89	2,98±0,74	12,49±2,91
1,5 Ч 1,5 мкм	4,61±1,05	2,34±0,44	10,10±1,68
Фрактальная размерность			
4,0 Ч 4,0 мкм	2,71±0,04	2,77±0,03	2,55±0,03
1,5 Ч 1,5 мкм	2,60±0,03	2,61±0,03	2,52±0,02

размах высот в пределах 95% вариации, характеризуют средний разброс АСМ-данных (латеральных сил) на участках поверхности клеток (таблица 1). Пероксинитрит в концентрации 30 мкмоль/л вызывает уменьшение, а в концентрации 300 мкмоль/л – увеличение данных показателей. Фрактальная размерность, характеризующая сложность организации структуры поверхности клетки, уменьшается с увеличением концентрации пероксинитрита. Уменьшение фрактальной размерности поверхности клеток связана с появлением на ней крупномасштабных элементов.

Заключение

В результате действия окислительно-го агента – пероксинитрита, происходит уменьшение объема (потеря массы) тимоцитов. При этом клетки «уплощаются».

Пероксинитрит вызывает также изменение рельефа клетки – структура поверхности становится более крупнозернистой. Эти изменения должны оказывать существенное влияние на основные функции тимоцитов.

Литература

1. Зоров Д.Б. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. С. 265–272.
2. Никитина И.А., Стародубцева М.Н., Грицук А.И. Влияние окислительного стресса на процесс образования филоподий в тимоцитах // Актуальные проблемы медицины, сборник научных статей, Гомель, 2009. – Т. 3. – С. 129-132.

Поступила 08.04.09