

УДК 577.345 (075.8)

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Л.В. КУХАРЕНКО, М.В. ГОЛЬЦЕВ, О.Н. БЕЛАЯ

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Аннотация. С помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) Nanoscope (R) IIIa исследовалось изменение морфологии поверхности интактных тромбоцитов и их взаимодействие с лейкоцитами после добавления пероксида водорода в обогащенную тромбоцитами плазму. При воздействии пероксида водорода наблюдалась типичная последовательность изменений формы интактного тромбоцита – от дискоцита к активированным клеткам – дискоэхиноциту, далее к сфероциту и сфероэхиноциту. Использование атомно-силовой микроскопии позволило визуализировать изменение морфологии поверхности, как тромбоцитов, так и лейкоцитов, а также процесс формирования тромбоцитарных агрегатов и их взаимодействие с лейкоцитами. АСМ-исследования проясняют некоторые аспекты сложных процессов тромбообразования, включая идентификацию поверхностных лигандов и рецепторов, участвующих в тромбообразовании. Показано, что на основе АСМ можно не только разработать клиническую методику оценки морфофункциональной активности тромбоцитов, основанную на морфометрии большого числа одновременно визуализируемых клеток, но и исследовать взаимодействие кровяных пластинок с клетками крови в процессе образования тромба.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия; обогащенная тромбоцитами плазма; тромбоциты; дискоцит; сфероцит; сфероэхиноцит; лейкоциты; P-селектин.

STUDY OF THE HEMOCYTES INTERACTION BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

LYUDMILA.V. KUKHARENKO, MIHAIL.V. GOLTSEV, OLGA. N. BELAYA

Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus

Abstract. The platelet surface morphology change and platelet interaction with leukocytes after hydrogen peroxide addition to platelet-rich plasma was investigated by atomic force microscope (AFM) Nanoscope (R) IIIa. When exposed to hydrogen peroxide, a typical sequence of surface morphology changes of an intact platelet was observed - from discocyte to activated cells - discoechinocyte, then to spherocyte and spheroechinocyte. The use of atomic force microscopy made it possible to visualize surface morphology changes of both platelets and leukocytes, as well as the formation of platelet aggregates and their interaction with leukocytes. AFM studies elucidate some aspects of the complex processes of thrombosis, including the identification of surface ligands and receptors involved in thrombosis. It has been shown that, based on AFM, it is possible not only to develop a clinical method for assessing the morphofunctional activity of platelets based on the morphometry of a large number of simultaneously visualized cells, but also to study the interaction of platelets with blood cells in the process of thrombus formation.

Keywords: atomic force microscopy, platelet-rich plasma; platelets, discocyte; spherocyte; spheroechinocyte; leukocytes; P-selectin.

Введение

Современным перспективным методом определения структурной модификации поверхности активированных тромбоцитов на клеточном и макромолекулярном уровнях в условиях максимально приближенных к нативным является атомно- силовая микроскопия (АСМ). Именно методы атомно-силовой микроскопии находят в настоящее время все более широкое применение в изучении поверхностной морфологии клеток [1]. Несмотря на успехи в изучении механизмов активации тромбоцитов, многие вопросы, касающиеся изменения

морфологии поверхности активированных тромбоцитов, а также их взаимодействие с лейкоцитами остаются не известными. Поэтому использование АСМ в исследовании морфофункционального состояния тромбоцитов при их адгезии, агрегации, а так же процессов их взаимодействия с лейкоцитами не утрачивает своей актуальности.

Методика проведения эксперимента

Для проведения АСМ-исследований тромбоцитов была разработана методика их фиксации для изучения морфологии интактных и активированных кровяных пластинок. Слюда использовалась в качестве подложки для АСМ исследований тромбоцитов. Забор крови из локтевой вены проводился максимально быстро, благодаря чему исследуемые морфологические признаки тромбоцитов соответствовали их функциональному состоянию в кровотоке. Далее 2 мл крови фиксировали в 4 мл 0,125% глутаральдегида. Фиксированную кровь сразу же центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Супернатант разводили раствором 0,125% глутаральдегида в два раза. По одному кусочку свежесколотой слюды помещали на дно микроробирок, в которые добавляли 400 мкл клеточной суспензии. Через 20 мин образцы промывали фосфатным буфером (0,2 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 5 раз, а затем дегидратировали клетки последовательно помещая подложки с тромбоцитами на 5 мин в водные растворы этанола концентрации 30, 50, 70, 96% и высушивали на воздухе.

Исследование топографии поверхности тромбоцитов осуществлялось с помощью АСМ Nanoscope (R) IIIa в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием стандартных кремниевых кантилеверов ($k=29\text{-}57\text{Н/м}$, Nanosensors GmbH).

Результаты и их обсуждение

В сосудистом русле при отсутствии патологических активирующих факторов подавляющее большинство тромбоцитов интактно, имеют характерную дискоидную форму и практически гладкую поверхность. Анализ полученных АСМ-изображений интактных тромбоцитов показал, что тромбоциты, циркулирующие в кровотоке при отсутствии активирующих факторов, были интактно и имели дискоидную или овальную формы. Диаметр интактных тромбоцитов в среднем составлял 2,5 – 3 мкм, а высота – 150 - 300 нм.

При воздействии факторов активации происходит изменение формы тромбоцитов, отражающее процессы их внутренней ультраструктурной и биохимической перестройки. При этом развивается типичная последовательность изменений: от формы интактного тромбоцита – дискоцита к активированным клеткам – дискоэхиноциту, то есть дискоциту, у которого на поверхности появляются филоподии, далее к сфероциту, имеющего форму шара, и сфероэхиноциту, у которого не только форма становится сферичной, но и возрастает число филоподий. В данной работе активация тромбоцитов осуществлялась добавлением H_2O_2 (10^{-5} М) в обогащенную тромбоцитами плазму.

Известно, что взаимодействие тромбоцитов с клетками крови осуществляется посредством адгезивных молекул Р-селектина, которые экспонируются активированными тромбоцитами. Добавление пероксида водорода в обогащенную тромбоцитами плазму инициировало экспрессию молекул Р-селектина на мембране тромбоцитов путем перемещения их из внутриклеточного депо в α -гранулах. Образование агрегатов, состоящих из тромбоцитов и лейкоцитов, осуществлялось через взаимодействие молекул Р-селектина на мембране тромбоцитов со специфическим Р-селектин-гликопротеиновым лигандом-1 (PSGL-1), находящимся на поверхности лейкоцитов (нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов). Активация тромбоцитов так же сопровождается высвобождением фибриногена и адгезивных молекул ICAM-2, которые являются лигандом для β_2 - интегринов CD11b/CD18, CD11a/CD18. Более того, лейкоциты могут напрямую взаимодействовать с фактором Виллебранда через PSGL-1, тем самым усиливая адгезию к тромбоцитам.

На рис.1 показано АСМ-изображение активированных (10^{-5} М H_2O_2) тромбоцитов, взаимодействующих с лейкоцитом.

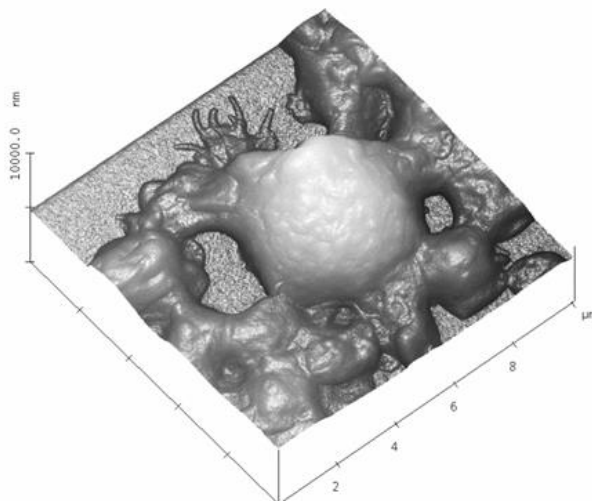


Рис. 1. АСМ-изображение активированных тромбоцитов, взаимодействующих с лейкоцитом

Визуализировано изменение морфологии поверхности, как тромбоцитов, так и лейкоцита. Активированные тромбоциты из дисковидной формы превращаются в сферические с многочисленными короткими выпячиваниями мембраны и агрегируют. Визуализировано образование длинных узких филоподий тромбоцитов. Ширина филоподий составляет от 30 нм до 290 нм. Высота активированных тромбоцитов изменялась от 480 нм до 760 нм. Данные АСМ-изображения так же показывают процесс образования микровилей у лейкоцита.

Заключение

АСМ-исследования могут прояснить некоторые аспекты сложных процессов тромбообразования, включая идентификацию поверхностных лигандов и рецепторов, участвующих в тромбообразовании. Более того, на основе АСМ можно не только разработать клиническую методику оценки морфофункциональной активности тромбоцитов, основанную на морфометрии большого числа одновременно визуализируемых клеток, но и исследовать взаимодействие кровяных пластинок с клетками крови в процессе образования тромба.

Список литературы

1. Dufrene, Y.F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Gerber, Ch., Müller, D. J. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology / Y.F. Dufrene, T. Ando, R. Garcia, D. Alsteens, D. Martinez-Martin, A. Engel, Ch. Gerber, D. J. Müller // Nature Nanotechnology. 2017. – Vol.12, – P. 295–307.