

## АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ – НОВАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ В ИЗУЧЕНИИ КАРДИОМИОЦИТОВ

Рассмотрены основные принципы работы атомно-силового микроскопа и результаты его использования при изучении поверхности клеток миокарда крыс. Отмечены преимущества метода атомно-силовой микроскопии. Подчеркивается, что метод атомно-силовой микроскопии позволяет не только визуализировать клеточную поверхность, но и получить информацию о различных ее свойствах.

Успехи современной биологии тесно связаны с созданием новых приборов и методов анализа биологических объектов. Появление в 30-х годах прошлого столетия электронного микроскопа, имеющего большую разрешающую способность по сравнению с оптическим микроскопом, открыло цитологам целый новый мир, дав возможность увидеть и изучить внутриклеточные структуры. Однако метод электронной микроскопии, несмотря на свои достоинства, имеет ряд недостатков: во-первых, он не позволяет исследовать живой материал, во-вторых, требует значительных финансовых и трудовых затрат. Прежде всего это связано со сложностью подготовки образцов. Кусочки биологического материала проходят долгий путь фиксации, постфиксации, заливки в специальные смолы, получения полутонких и ультратонких срезов. Последние подвергаются контрастированию уранилацетатом и цитратом свинца и лишь тогда просматриваются в электронном микроскопе. В течение многих лет ученые пытались совместить высокое разрешение электронного микроскопа с возможностью работать в жидкой среде с помощью оптического микроскопа. Изобретение в 1981 году сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) открыло новые перспективы для достижения этой цели. Следует заметить, что создание СТМ, первого из семейства атомно-силовых микроскопов (АСМ), оказалось неожиданным даже для подготовленных специалистов. Он был сконструирован сотрудниками швейцарского отделения Исследовательского центра фирмы IBM Г. Биннингом и Х. Рорером. Прошедшие десятилетия показали, что зондовые атомно-силовые микроскопы нашли широкое применение в научных исследованиях в различных областях физики, химии, биологии и медицины.

Можно перечислить по крайней мере три основные особенности данных микроскопов, благодаря которым они привлекли внимание специалистов различных профилей (Яминский, 1997).

1. Возможность увидеть атомную и молекулярную структуру поверхности, в том числе при различных воздействиях;

2. Структуру и разнообразные свойства (механические, электрические, электронные) поверхности можно изучать в различных средах – на воздухе, в жидкостях и вакууме;

3. Наглядность представляемой информации, которая может быть обработана статистически (при записи трехмерных изображений используются цифровые методы хранения информации, разработанные для компьютеров).

Традиционный АСМ представляет собой оригинальную конструкцию сверхчувствительного измерителя профиля поверхности. Но он позволяет измерять не только профиль поверхности, но и локальные силы трения, величину адгезии, упругие и вязкие свойства поверхности с субнанометровым пространственным разрешением.

Принцип работы такого микроскопа основан на прохождении электроном потенциального барьера, который образован разрывом электрической цепи (небольшим пространством между зондирующим микроострием и поверхностью того или иного образца). В основе работы прибора лежит хорошо известный феномен электронного туннелирования (туннельный эффект).

В качестве зонда обычно используется игла (сделана из нитрида кремния), расположенная на упругой микропластинке, именуемой кантилевером. Последний закреплен с одного конца. При сканировании поверхности силы, возникающие между острием иглы и образцом, вызывают деформацию кантилевера. Таким образом и описывается топография исследуемой поверхности. Деформация кантилевера определяется, как правило, оптическим методом. Лазерный луч, направленный на зеркальную поверхность тыльной стороны кантилевера, отражается от нее и регистрируется фотодетектором (рис. 1). Перемещение образца при сканировании производится прецизионными пьезодвигателями, которые управляются персональным компьютером. После завершения сканирования изображение в двумерном (трехмерном) виде выводится на экран компьютера.

АСМ обычно имеет три основных режима работы: контактный, бесконтактный и вибрационный.

В контактном режиме острие касается исследуемого образца в течение всего времени сканирования. Такой режим обеспечивает наиболее высокое разрешение, хотя возникающее давление может вызвать определенные повреждения и образца, и острия. В бесконтактном режиме острие колеблется над поверхностью образца (с частотой 100 КГц – 1 МГц). Это колебание значительно увеличивает чувствительность атомно-силового микроскопа, поэтому даже такие слабые силы, как силы Ван-дер-Ваальса и электростатические, могут быть обнаружены. Тем не менее бесконтактный режим практически не используется для биологических исследований вследствие его выраженных недостатков («захват» острия поверхностью за счет сил сцепления; малое разрешение из-за относительно большого расстояния «острие – образец»). Вибрационный режим может рассматриваться в качестве компромиссного между контактными и бесконтактными режимами. При данном режиме кантилевер колеблется, но с большей амплитудой. Так как острие соприкасается с поверхностью образца, то разрешение получается таким же, как и при контактном режиме. В то же время это соприкосновение весьма кратковременно, поэтому повреждения образца в значительной мере исключаются. Такой режим работы более всего подходит для построения изображений в жидких средах, в частности, для изучения биомолекул в водной среде.

Стремительное развитие атомно-силовой микроскопии и внедрение ее в биологию дает основание предполагать, что подобная техника вполне может занять пустующую ныне нишу между светоптическими и электронными микроскопами. В течение 90-х годов ушедшего столетия были оценены основные возможности атомно-силовой мик-

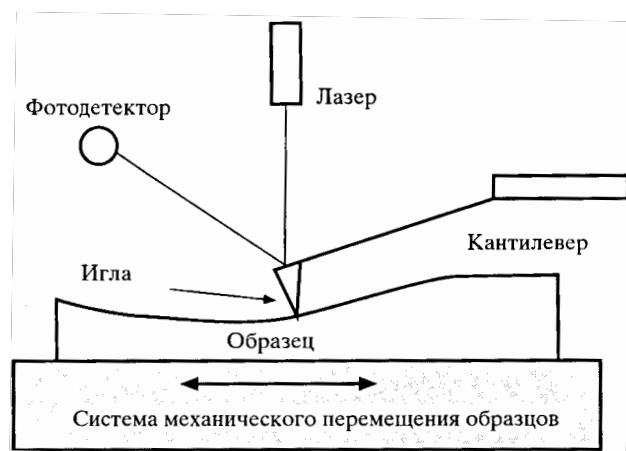


Рисунок 1. Схема основных блоков атомно-силового микроскопа

роскопии и определены границы ее применимости, разработаны и внедрены принципиальные подходы к решению методических трудностей, связанных со спецификой приготовления биологических препаратов, пригодных для визуализации этим методом. Наибольших успехов в этом направлении исследователи добились при изучении липополисахаридов клеточной стенки бактерий в процессе решения практических задач биологии и медицины [3, 4]. Атомно-силовая микроскопия плодотворно использовалась и для морфофункционального анализа риккетсий и вирусов, остеобластов мышинных фибробластов [2], кардиомиоцитов взрослых крыс [5]. Результаты, полученные данными авторами, показывают возможность получения корректных атомно-силовых изображений про- и эукариот, оценки формы и размеров клеток, а также детали рельефа и деформаций клеточных поверхностей изученных объектов.

В настоящем исследовании нами предприняты попытки изучения с помощью метода АСМ клеток миокарда. При подготовке образцов для получения изолированных клеток миокарда крысы подвергался щелочной диссоциации по ранее описанной методике [1]. Затем каплю клеточной взвеси наносили на подложку из слюды, после естественного высыхания которой, происходившего в течение 15-30 минут, производили сканирование исследуемой поверхности.

На рисунке 2 приведены экспериментальные сканы клеток миокарда крыс. В процессе измерения установлено, что для изучения клеток миокарда целесообразно применять сканер с полем захвата 6x6 мкм. Как видно из сканов, увеличивая степень диссоциации, удается получить одиночные клетки разнообразной формы с характерными параметрами 1,5-2 мкм в длину и 50-11 нм в высоту, что выявлено при построении профиля одиночной клетки (рис. 3).

Вышеизложенные факты коррелируют с результатами некоторых зарубежных исследований [6]. На сканах, показанных на рисунке 4, видно, что после воздействия на клетки миокарда окситоцина (одного из гипоталамических нонапептидов) топография поверхности претерпевает заметные изменения.

Для количественной оценки полученных нами изображений применялся анализ топографии поверхности с помощью набора инструментов, входящих в состав программного обеспечения микроскопа, представленного программой Scan Master. Вычислялась средняя шероховатость профиля (средний модуль отклонения точек профиля от его

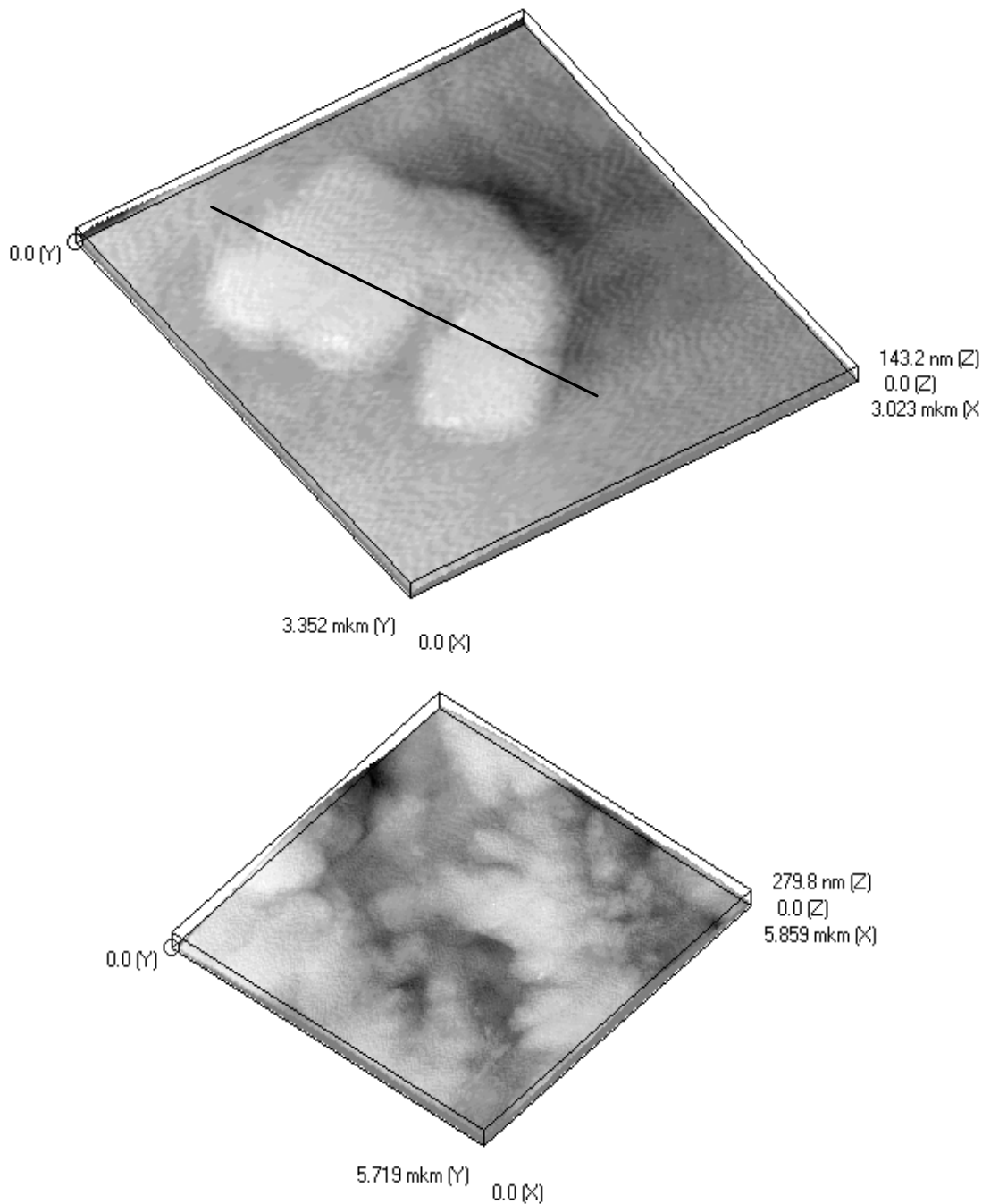


Рисунок 2. Трехмерные АСМ-изображения кардиомиоцитов, осажженных на поверхности стекла при разной степени диссоциации

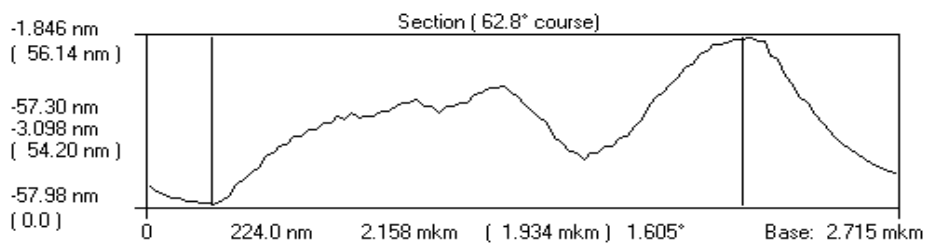
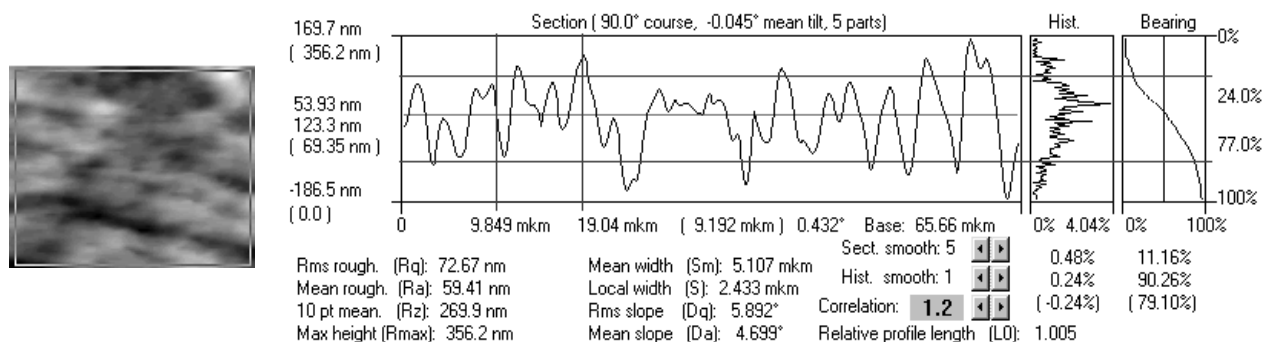
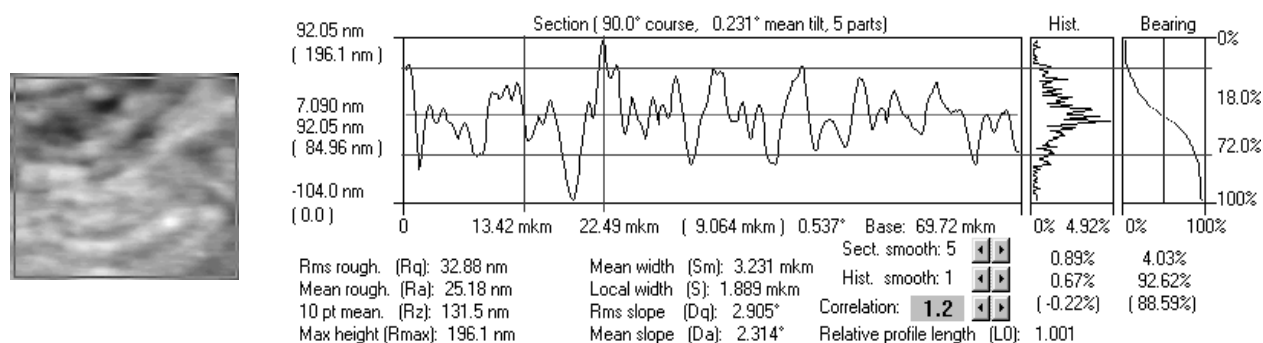


Рисунок 3. Профиль поверхности кардиомиоцита



а



б

Рисунок 4. АСМ-изображение миокарда белых крыс до (а) и после (б) воздействия окситоцина. На гистограммах приведены результаты анализа степени шероховатости поверхности исследуемых образцов.

средней линии). Среднее значение шероховатости поверхности образцов до воздействия окситоцина 59,41 нм, после воздействия – 25,18 нм. Видно, что степень шероховатости уменьшается.

Таким образом, АСМ позволяет нам оценить многие параметры клеток миокарда, такие как длина, ширина, высота, площадь, среднее значение шероховатости и другие, что открывает широ-

кие возможности в изучении механизмов многих биологических процессов (рост, деление, апоптоз). В настоящее время накоплен лишь начальный опыт применения методики АСМ для исследования строения и функционирования клеток. Однако даже уже достигнутые результаты указывают на перспективность использования АСМ в фундаментальных и практических исследованиях.

**Список использованной литературы:**

1. Белов Л.Н., Коган М.Е. Получение изолированных клеток методом щелочной диссоциации фиксированных формалином тканей // Цитология. 1975. Т. XVII, N11. С.1332-1338.
2. Боровик А.С., Тарасова О.С., Большакова А.В., Яминский И.В. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения живых клеток // Усп. соврем. биологии. 2000. Т. 120, №2. С. 217-224.
3. Яминский И.В. Взгляд в микромир: от атомов до молекул живых клеток // Сканирующая зондовая микроскопия полимеров. М., 1997. Вып. 1. С. 9-12.
4. Яминский И.В., Филонов А.С., Галлямов М.О., Бондаренко В.М. Зондовая микроскопия: методы, аппаратура и построение изображений // Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров. М., 1997. Вып. 1. С. 13-80.
5. Lal R., John D.W., Laird S.A., Arnsdorf M.F. Heart gap junction preparation reveal hemiplaques by atomic force microscopy // J. Amer.Physiol. Society. 1995. Vol.68.P.967-977.
6. Sanjeev G.Shroff, Donald R.Saner et al. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy // Am. J. Physiol. Society. 1995. Vol. 269 (Cell Physiol.38). P. C286-C292.