



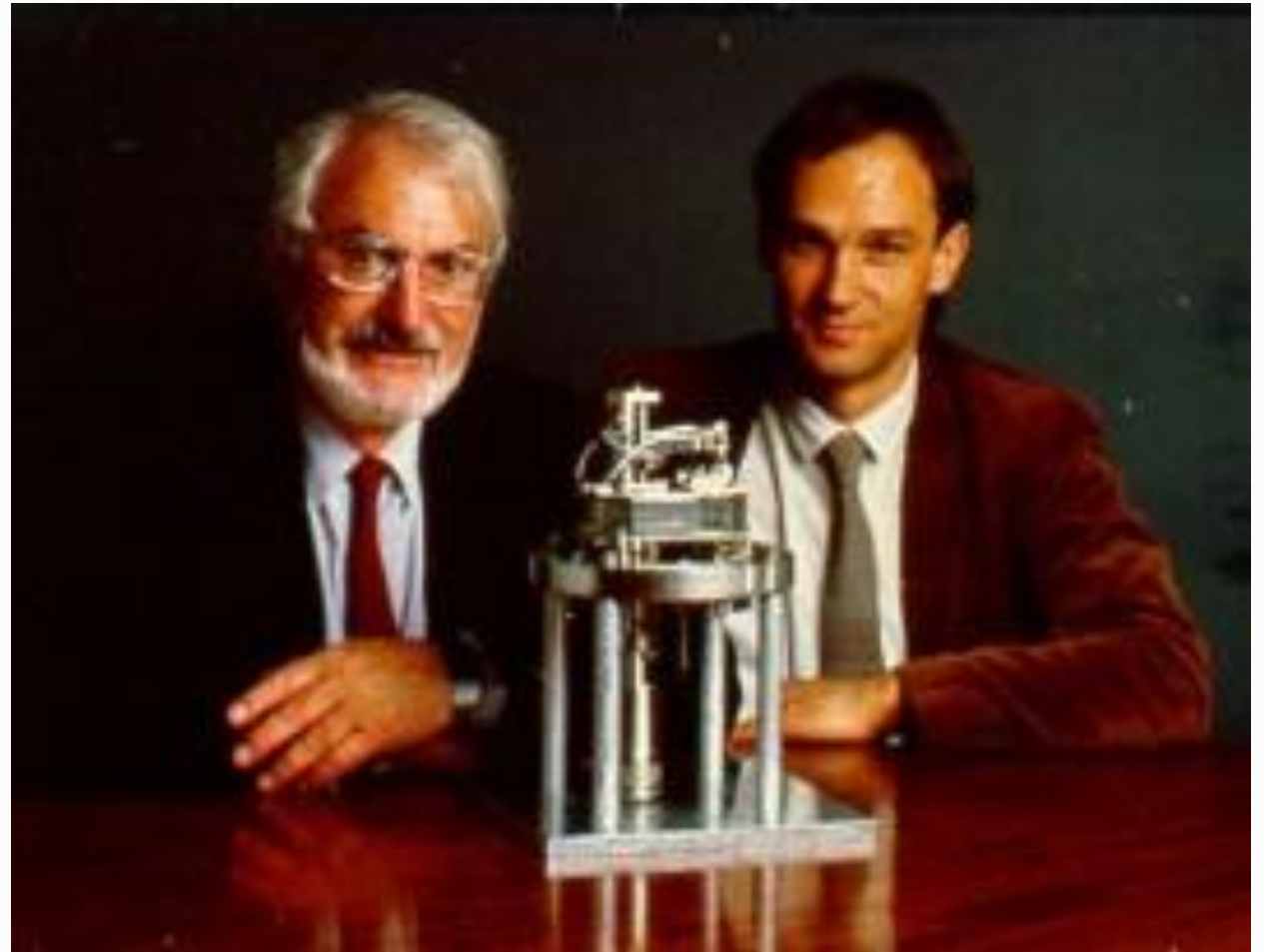
# Исследование живых клеток методом атомно-силовой микроскопии

Нижний Новгород  
2020

# Виды микроскопов

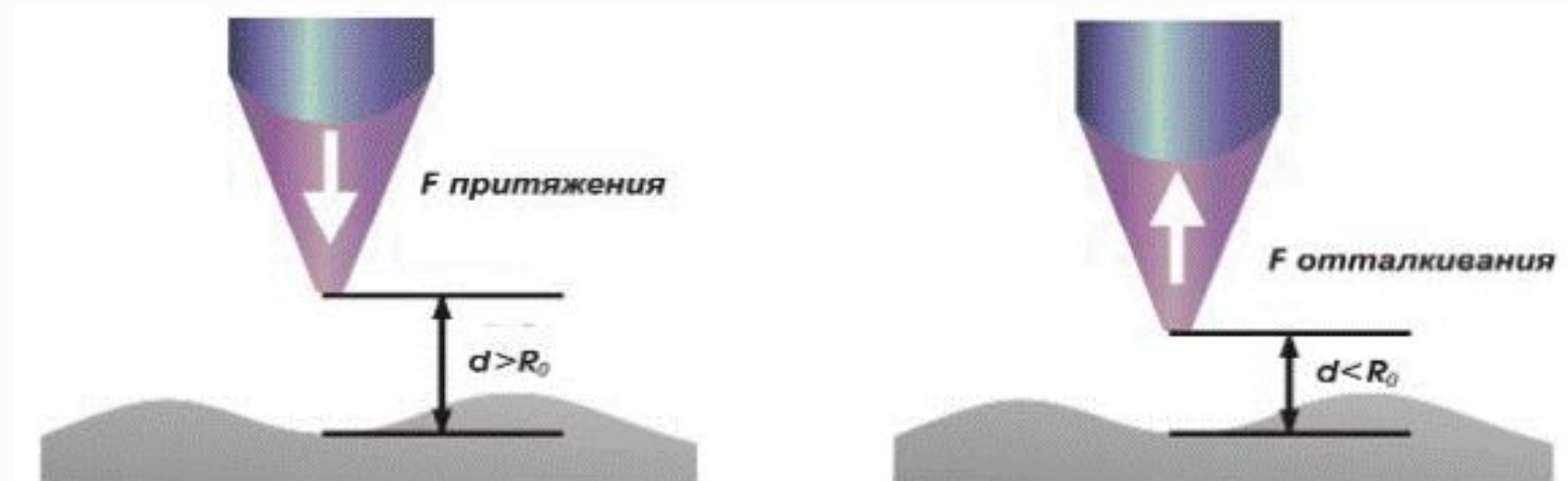
Оптические микроскопы	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ближнепольный оптический микроскоп</li><li>• Конфокальный микроскоп</li><li>• Двухфотонный лазерный микроскоп</li></ul>
Электронные микроскопы	<ul style="list-style-type: none"><li>• Просвечивающий электронный микроскоп</li><li>• Растровый электронный микроскоп</li></ul>
Сканирующий зондовый микроскоп	<ul style="list-style-type: none"><li>• Сканирующий атомно-силовой микроскоп</li><li>• Сканирующий туннельный микроскоп</li></ul>
Рентгеновские микроскопы	<ul style="list-style-type: none"><li>• Рентгеновские микроскопы отражательные</li><li>• Рентгеновские микроскопы проекционные<ul style="list-style-type: none"><li>• Лазерный рентгеновский микроскоп (XFEL)</li></ul></li></ul>

- \* В 1982 году (момент опубликования в Phys. Rev. Lett.) Генрихом Рорером и Гердом Биннигом был открыт метода сканирующей туннельной микроскопии.
- \* В 1986 году Гердом Биннигом, Кельвином Куэйттом и Кристофером Гербером в США, был изобретен первый атомно-силовой микроскоп.



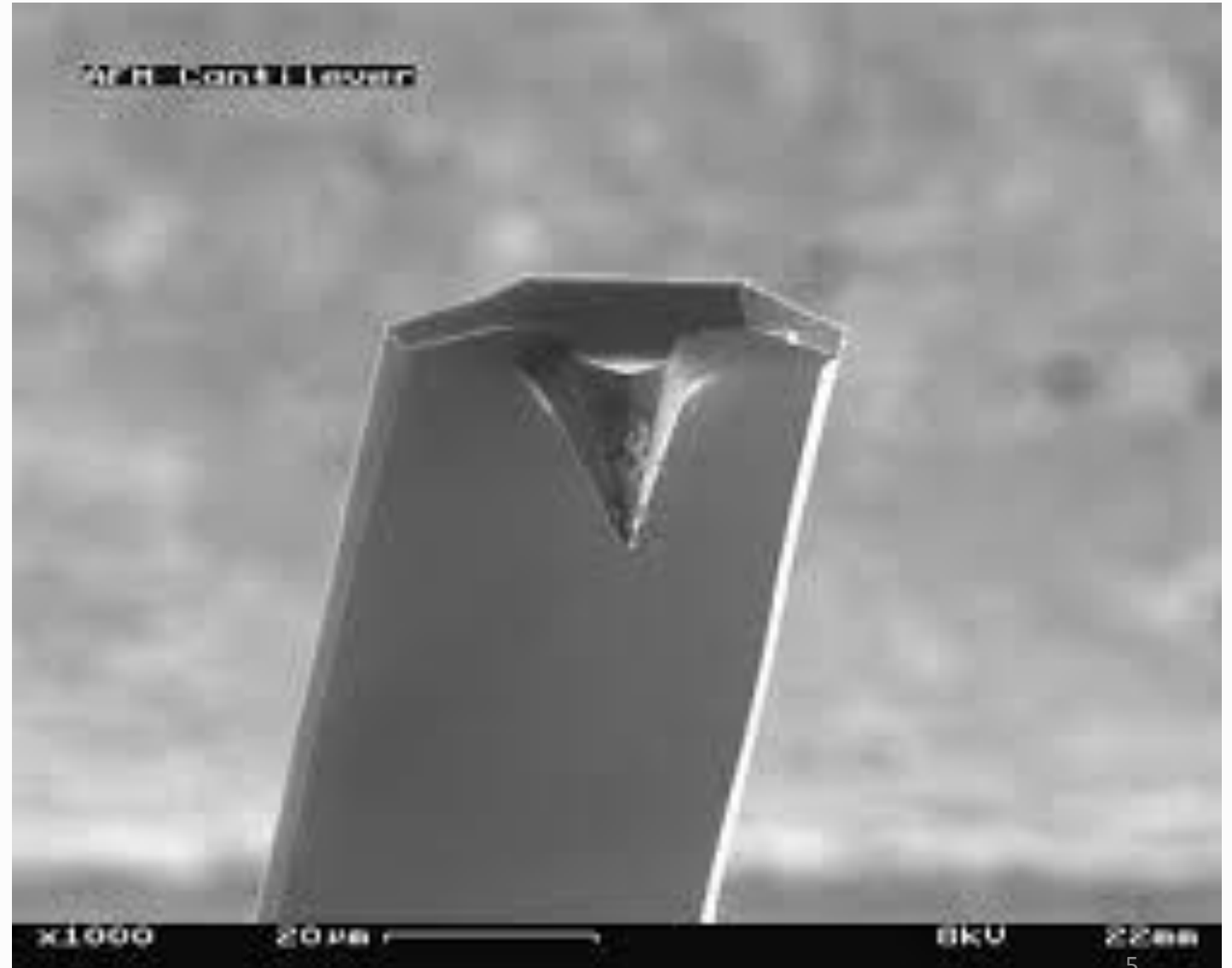
Атомно-силовая микроскопия — вид зондовой микроскопии, в основе которого лежит силовое взаимодействие атомов зонда и исследуемого образца.

- \* Атомно-силовой микроскоп (АСМ, англ. AFM – atomic-force microscope) - сканирующий зондовый микроскоп высокого разрешения. Используется для определения рельефа поверхности с разрешением от десятков ангстрем вплоть до атомарного.
- \* В отличие от сканирующего туннельного микроскопа, с помощью атомно-силового микроскопа можно исследовать как проводящие, так и непроводящие поверхности.

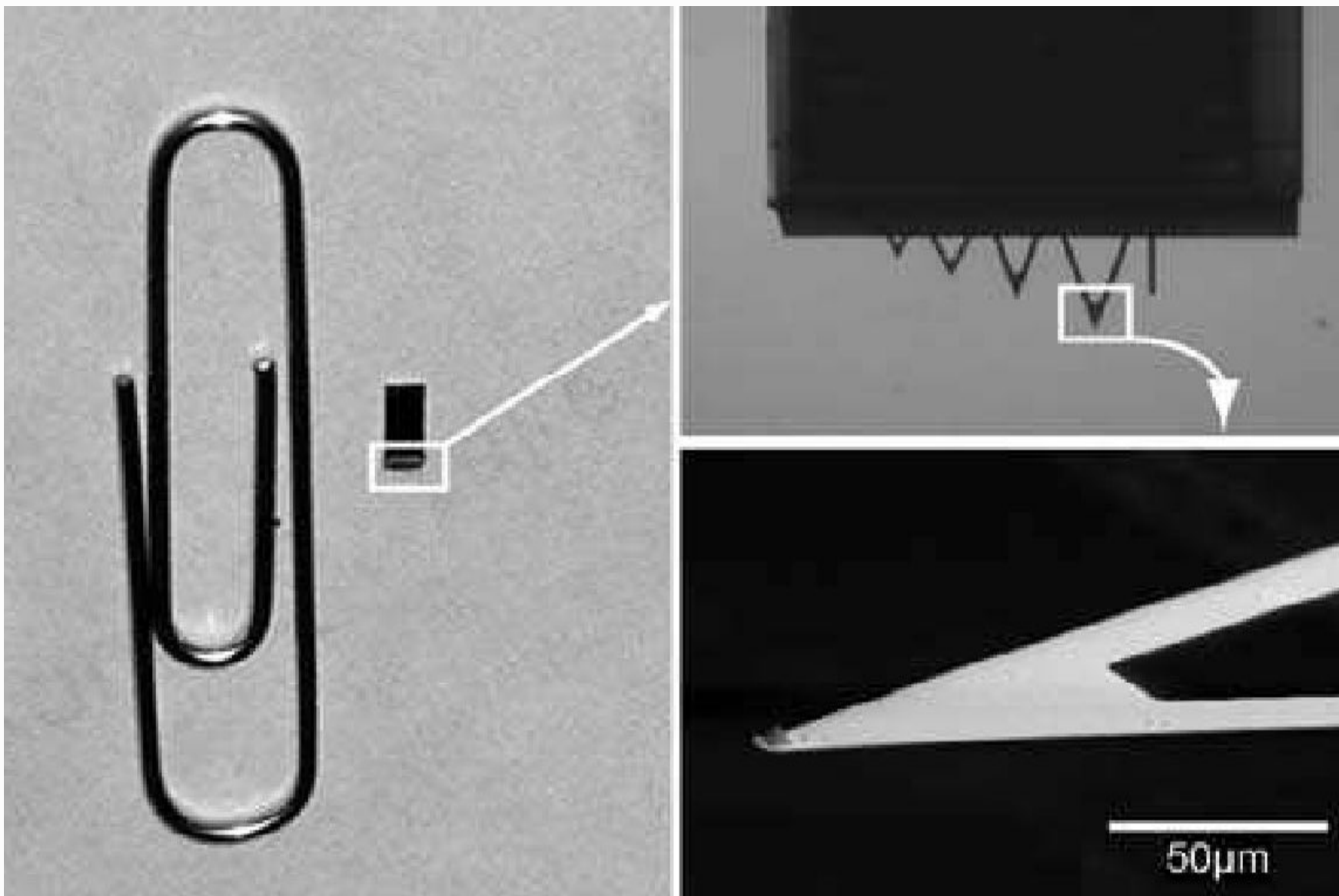


# Зонд АСМ

В сканирующих зондовых микроскопах исследование микрорельефа поверхности и ее локальных свойств проводится с помощью специальным образом подготовленных зондов в виде игл. Рабочая часть таких зондов (острие) имеет размеры порядка десяти нанометров. Характерное расстояние между зондом и поверхностью образцов в зондовых микроскопах по порядку величин составляет 0,1 – 10 нм.



# Сравнительные размеры зондов

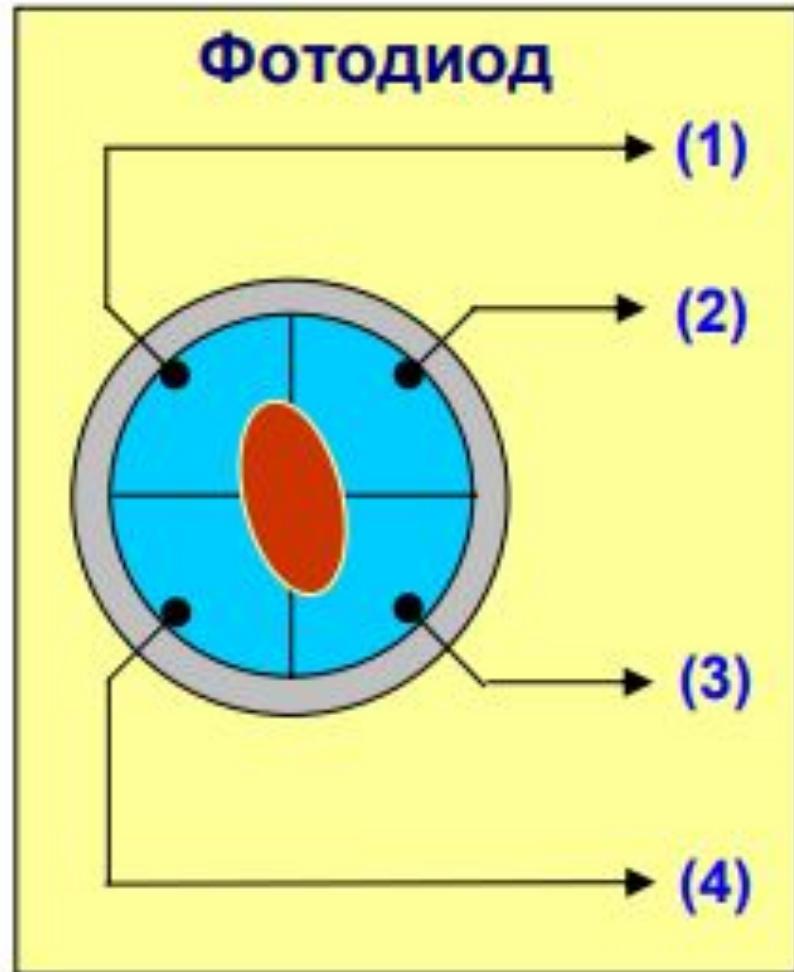
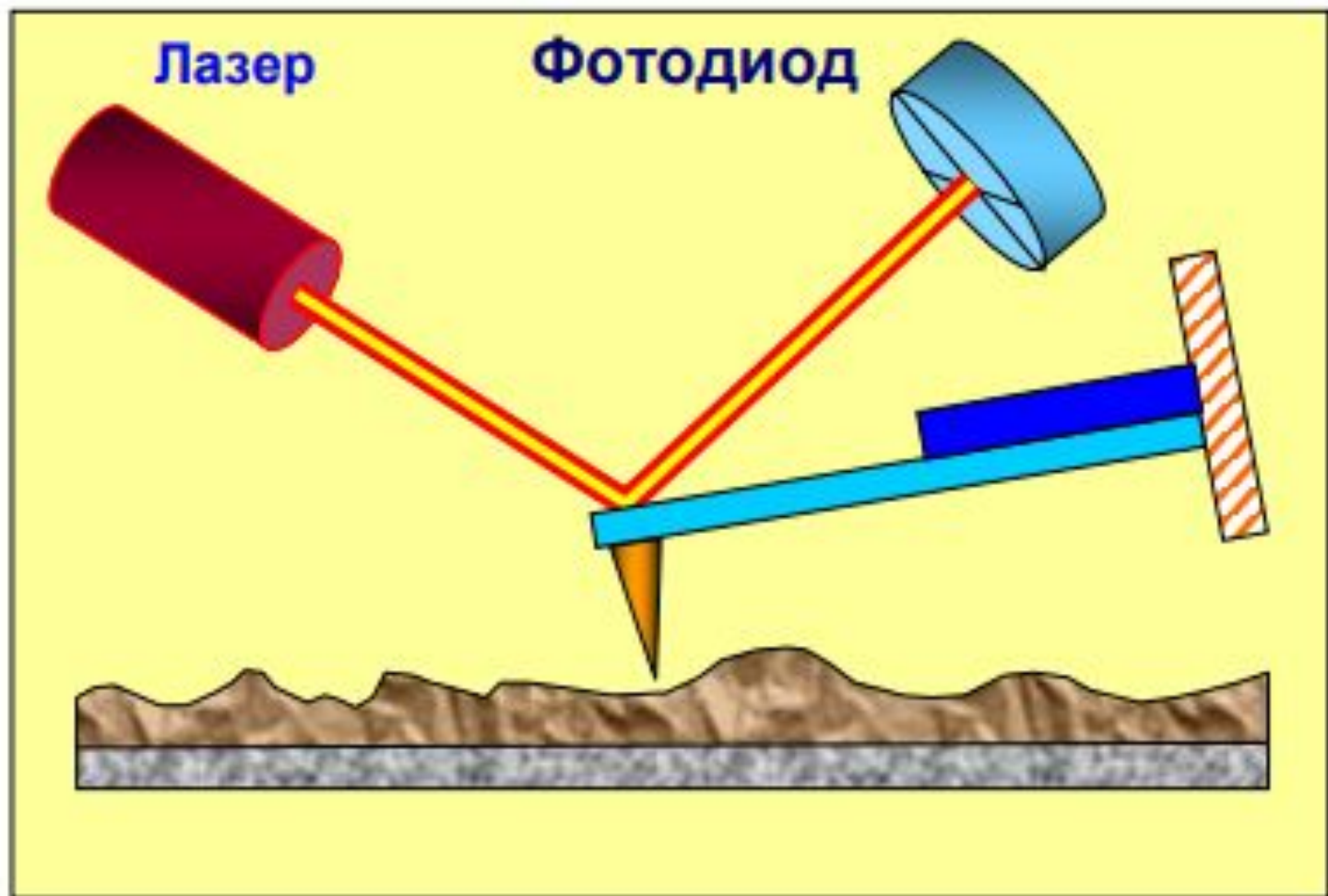


# Принцип работы АСМ

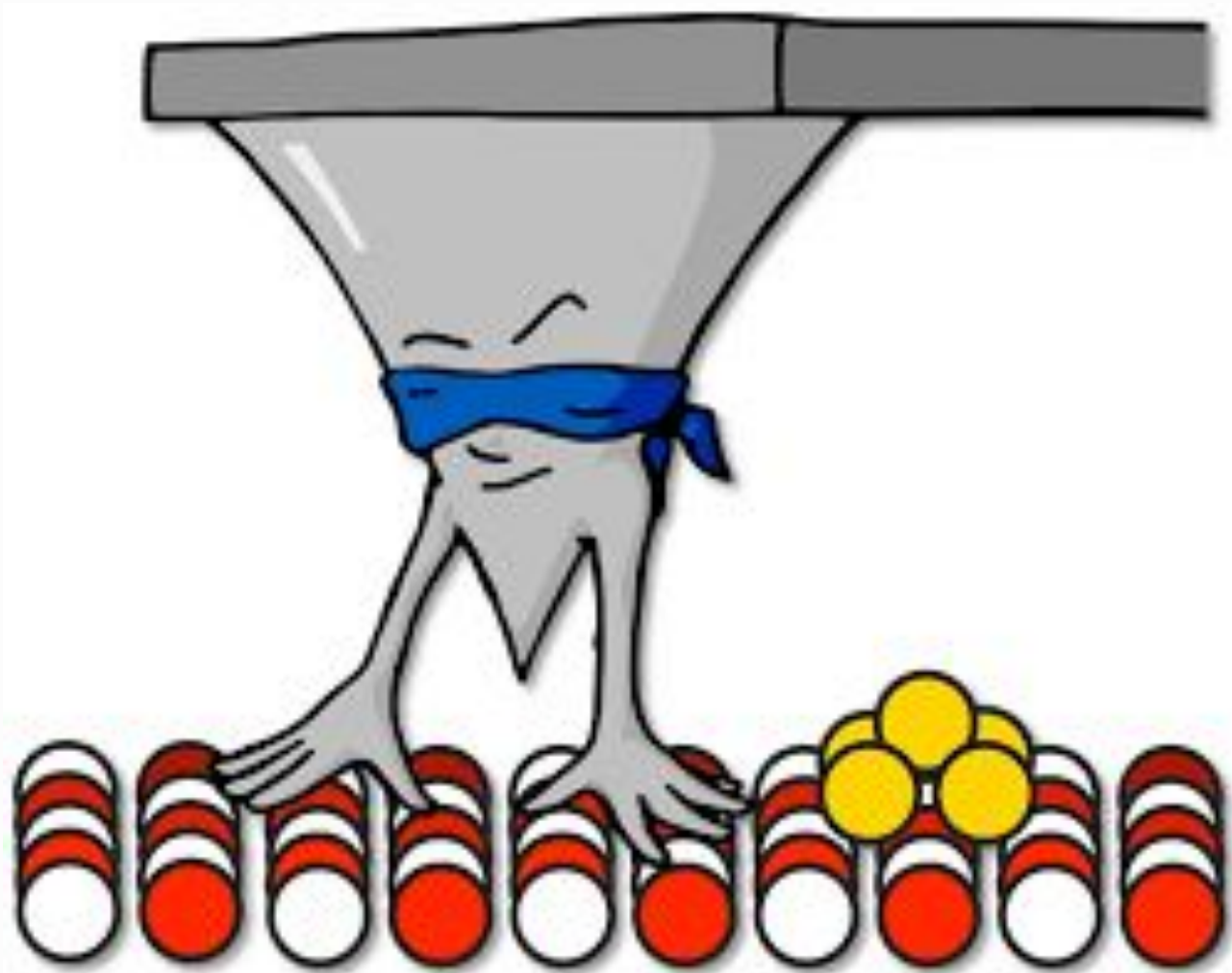


На расстоянии около одного ангстрема между атомами образца и атомом зонда (кантилевера) возникают силы отталкивания, а на больших расстояниях - силы притяжения.

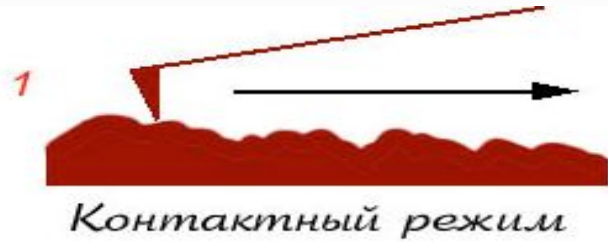
Идея устройства очень проста: кантилевер, перемещаясь относительно поверхности и реагируя на силовое взаимодействие, регистрирует ее рельеф. На основании прибора укреплен цилиндр, в котором находится сканер – пьезоэлектрическая керамика, изменяющая свои размеры при приложении электрического поля



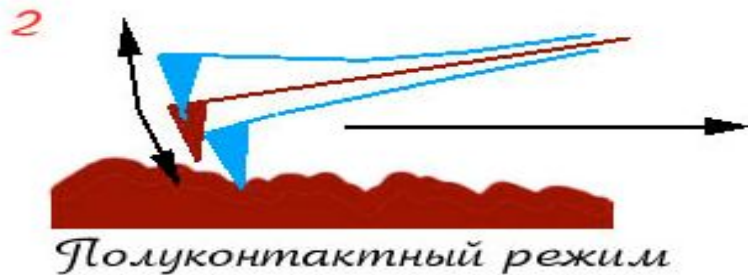




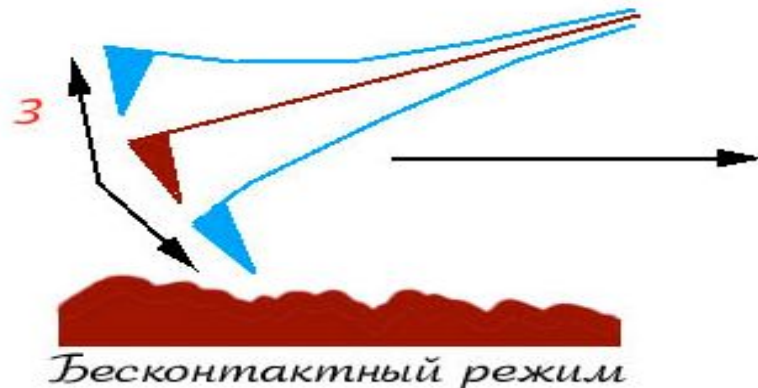
# Режимы работы АСМ



Кантилевер непосредственно касается поверхности и повторяет её форму по мере прохождения поверхности



Бесконтактный и полуконтактный режим характеризуются дополнительным условием сканирования, которое позволяет осуществить более щадящее и тонкое сканирование.



Кантилевер жестко связывается с пьезоэлементом и колеблется со своей резонансной частотой. Детектируется не только амплитудное отклонение, но и фазовое.



## Преимущества:

- \* Атомно-силовая микроскопия позволяет получить истинно трёхмерный рельеф поверхности;
- \* Изучаемая поверхность не требует нанесения проводящего металлического покрытия, которое часто приводит к заметной деформации поверхности.
- \* Большинство режимов атомно-силовой микроскопии могут быть реализованы на воздухе или даже в жидкости.



## Недостатки:

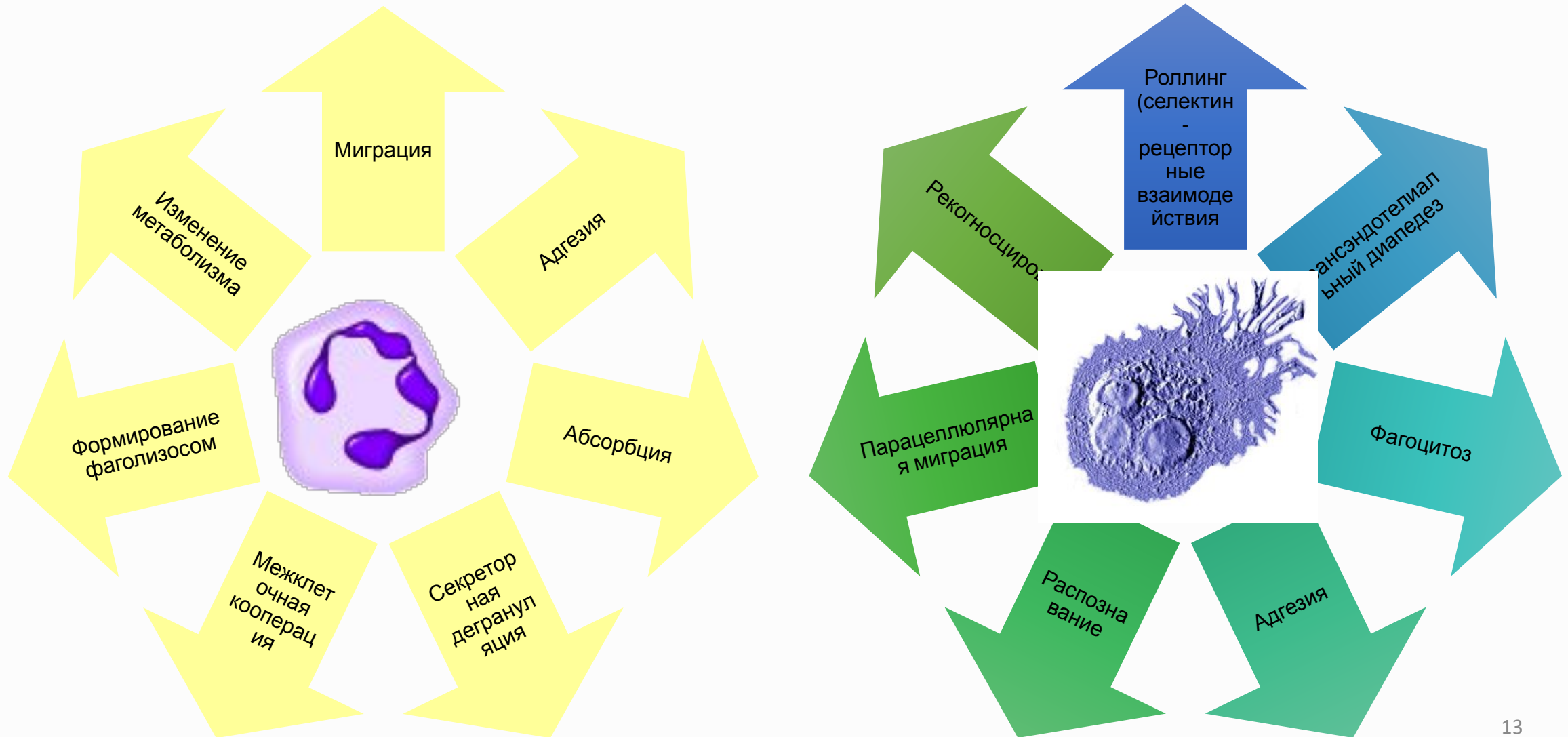
- \* Небольшой размер поля сканирования.;
- \* Низкая скорость сканирования поверхности, по сравнению с электронным микроскопом;
- \* Нелинейность, гистерезис и ползучесть (крип) пьезокерамики сканера, являются причинами сильных искажения АСМ-изображений.

# Нейтрофильный гранулоцит

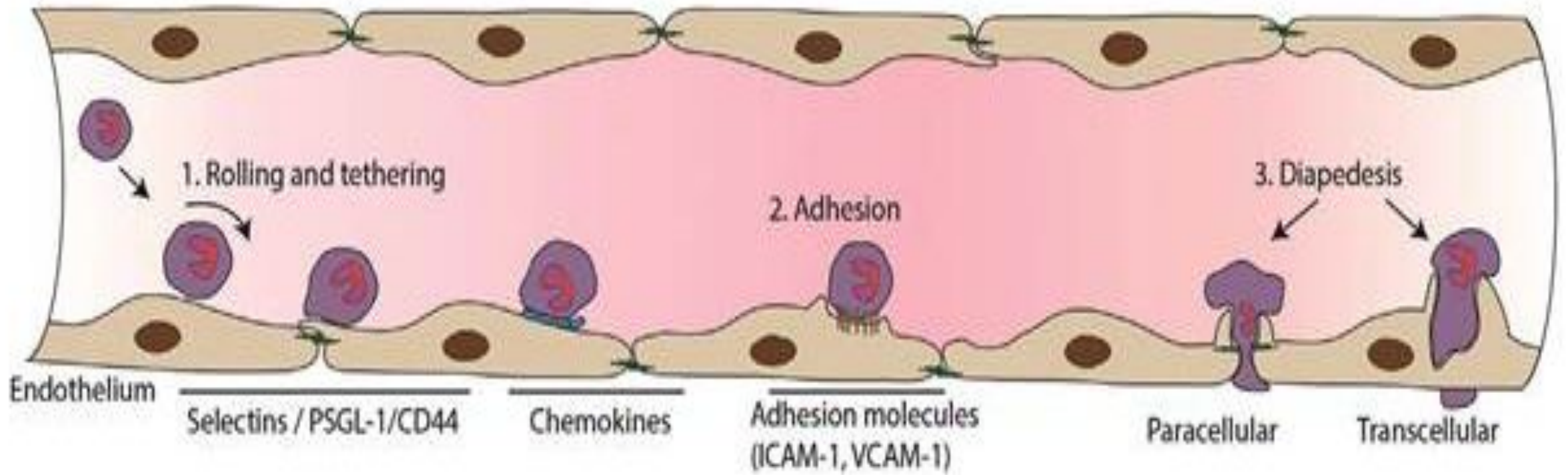


В крови человека содержится  $2,0-7,5 \times 10^9/\text{л}$  нейтрофилов, что составляет 50–70% от общего числа лейкоцитов крови. В кровотоке присутствует только 1–2% общего числа зрелых нейтрофилов в организме (остальные представлены в тканях, преимущественно в костном мозгу). Диаметр нейтрофилов составляет 9–12 мкм. Им свойственна уникальная морфология: ядро сегментированное (обычно состоит из 3 сегментов) с плотно упакованным хроматином цитоплазма содержит гранулы.

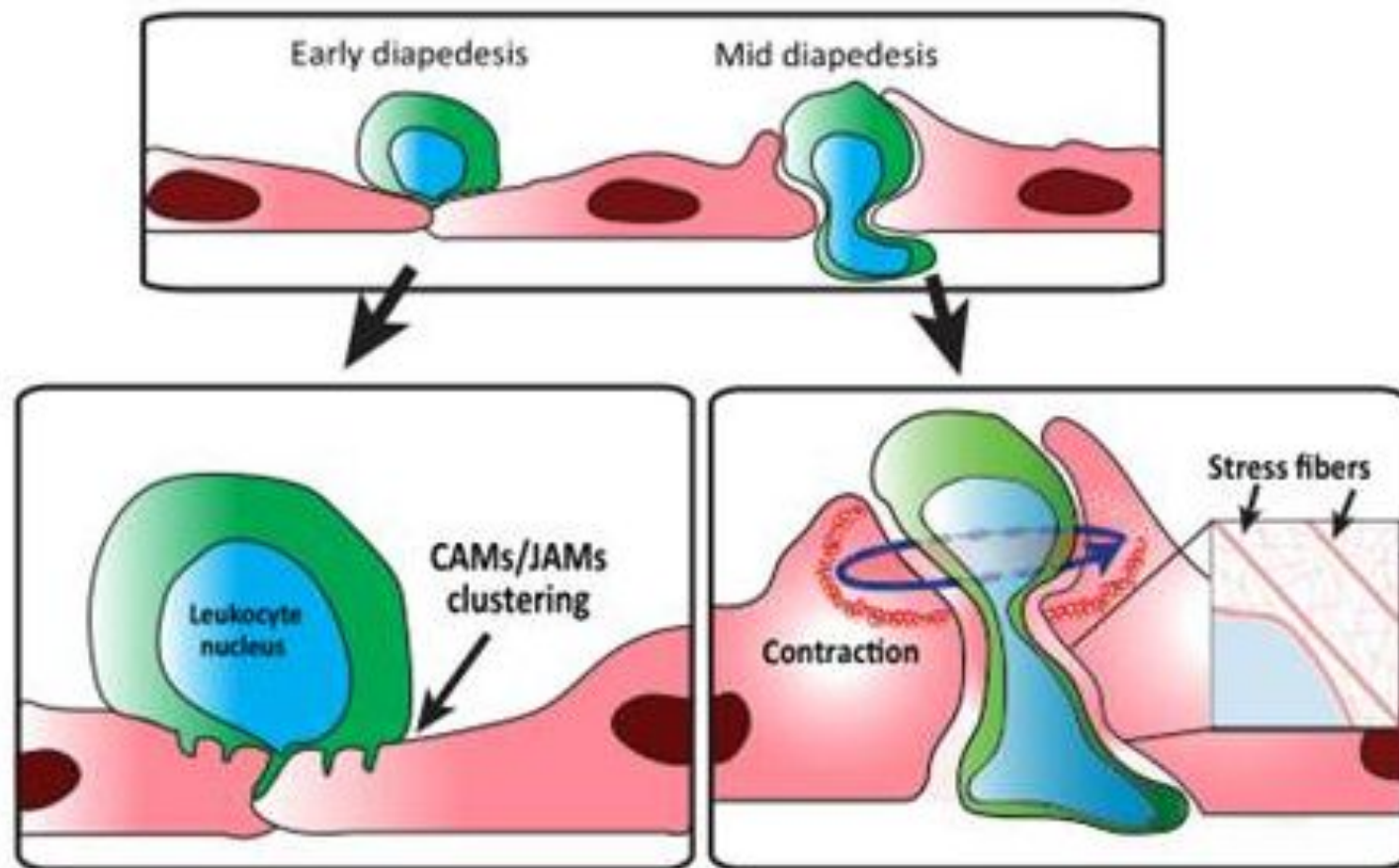
# Функции нейтрофильных гранулоцитов



# Диапедез НГ

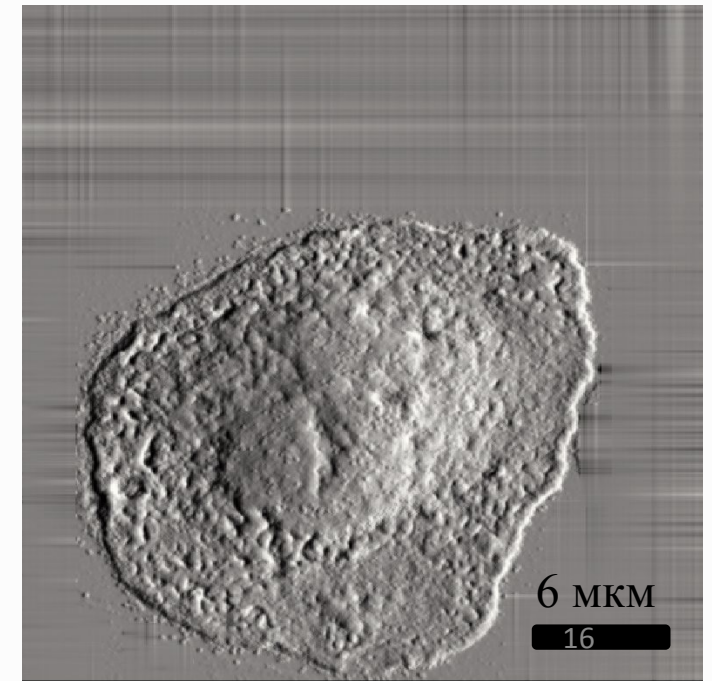
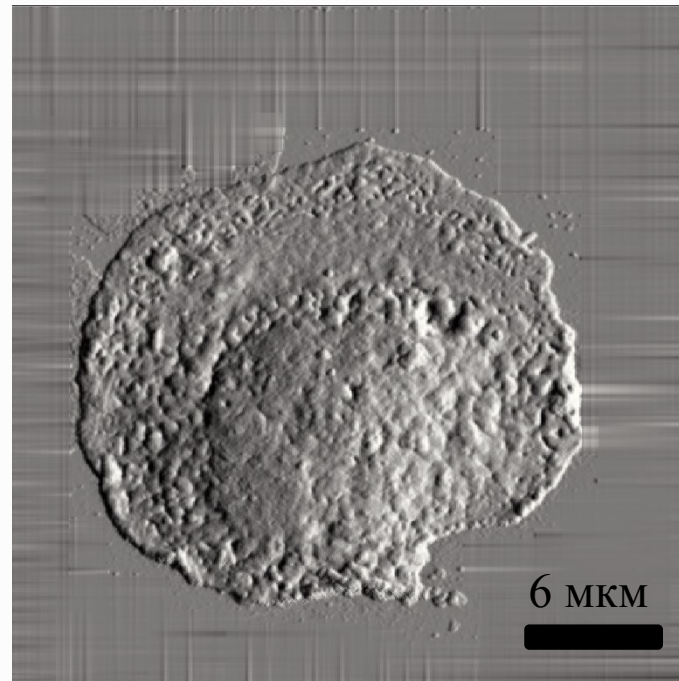
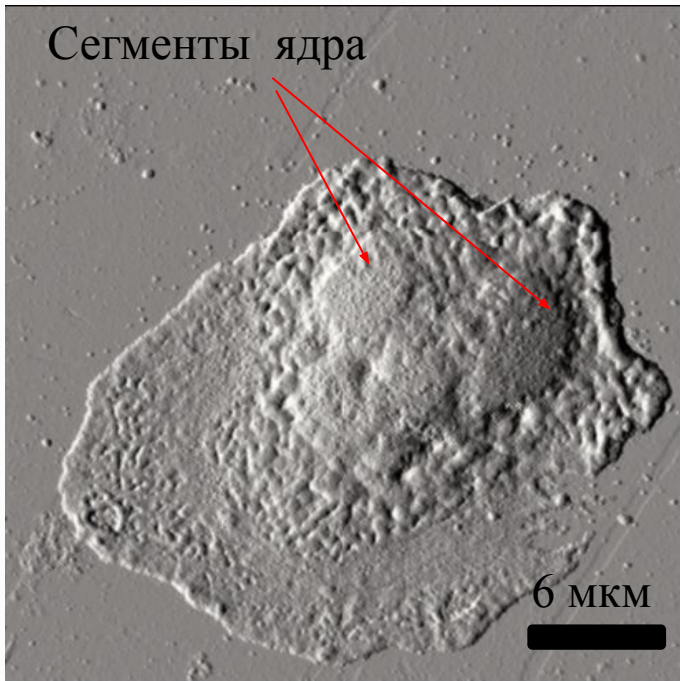
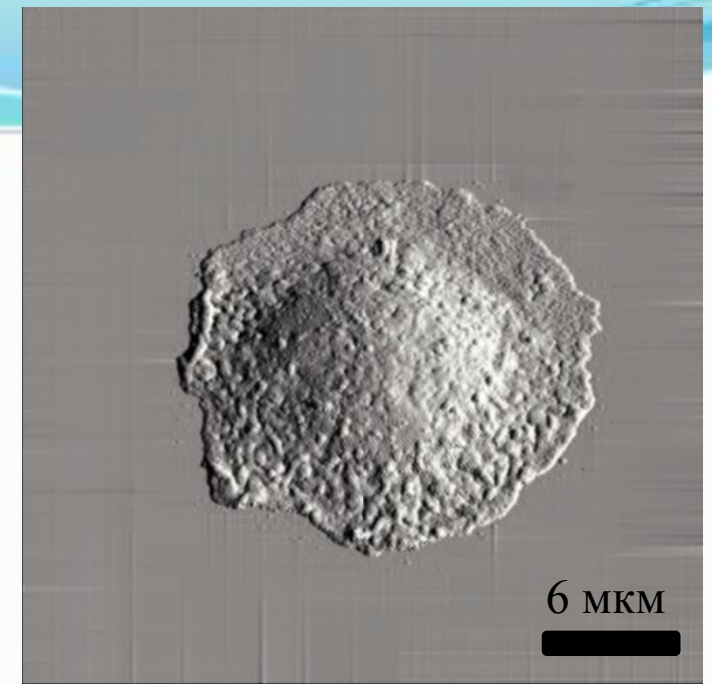
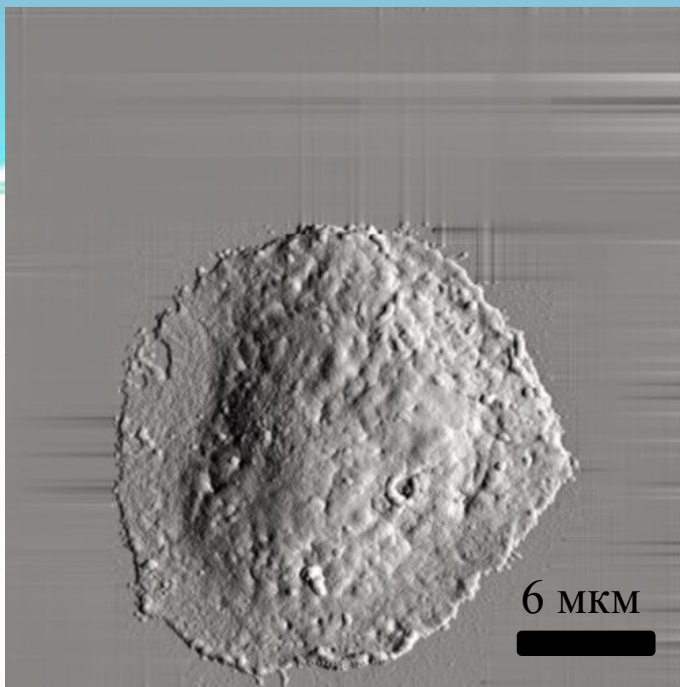


# Парацеллюлярная миграция НГ

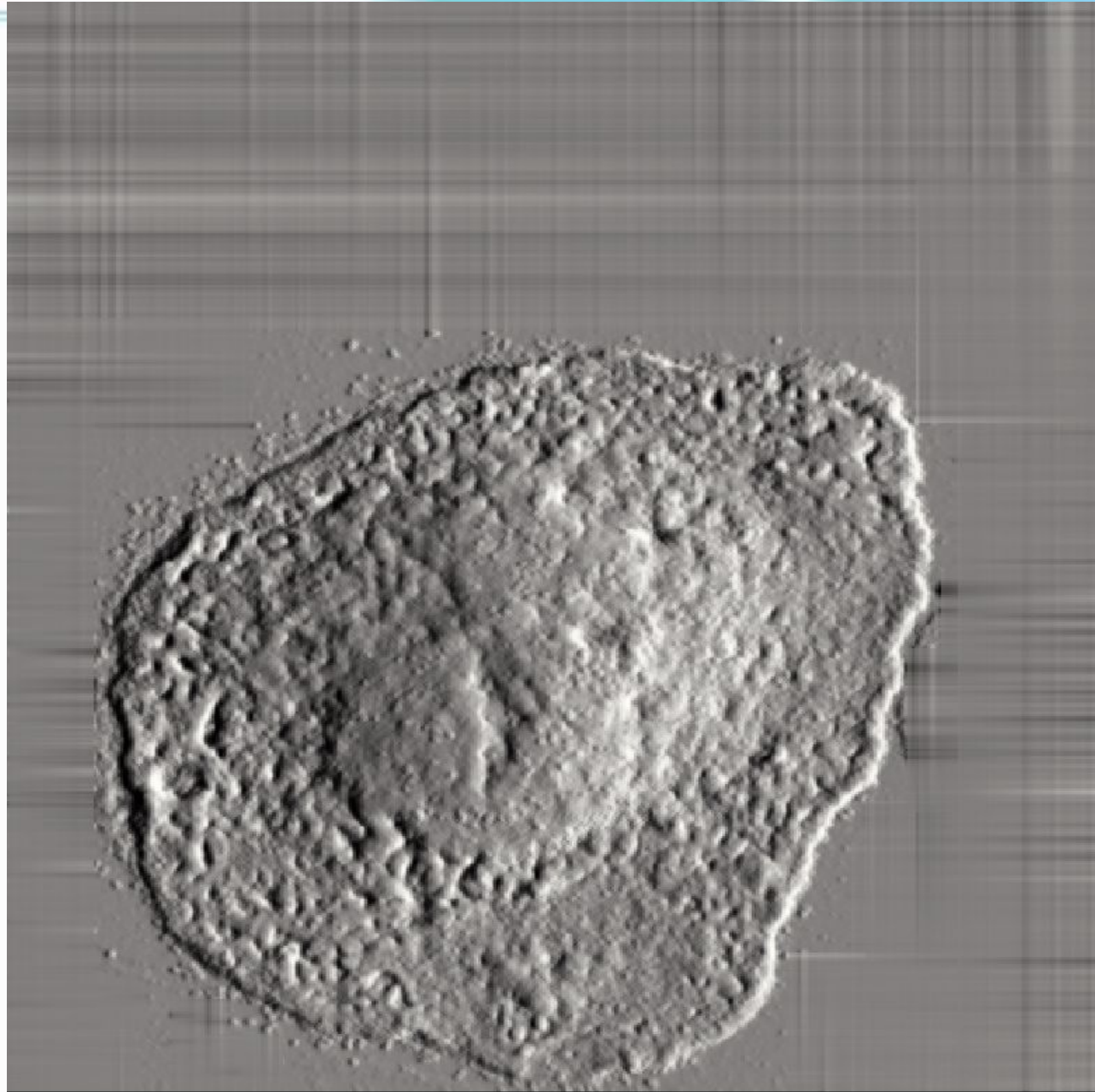


## Контроль

Характерна небольшая максимальная и средняя высота клеток, внешний вид клеток однообразен. Псевдоподии отсутствуют, что свидетельствует об отсутствии активации клетки. Преобладает площадь адгезии клетки. В ряде случаев можно наблюдать сегменты ядра.

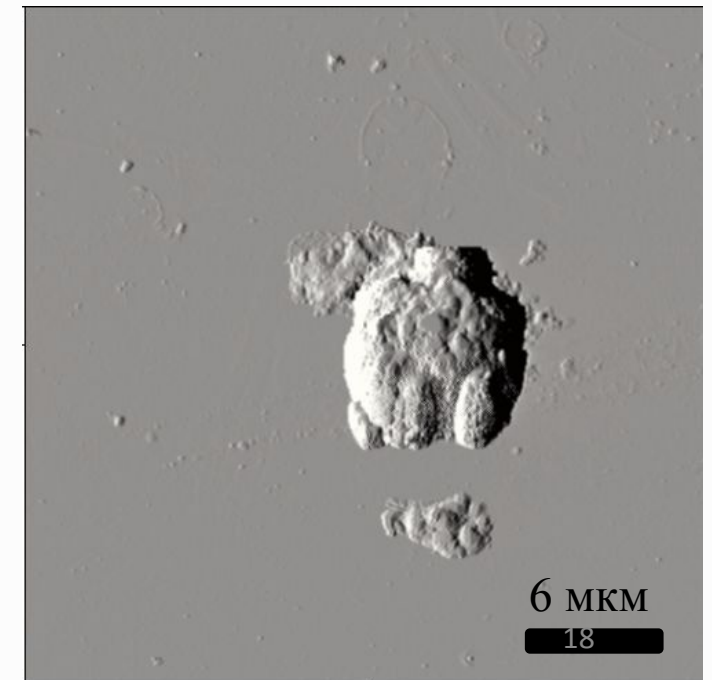
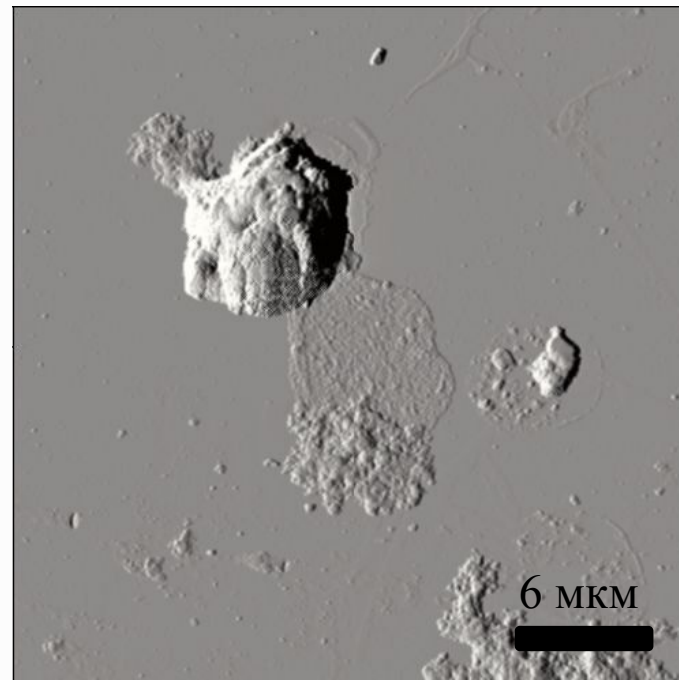
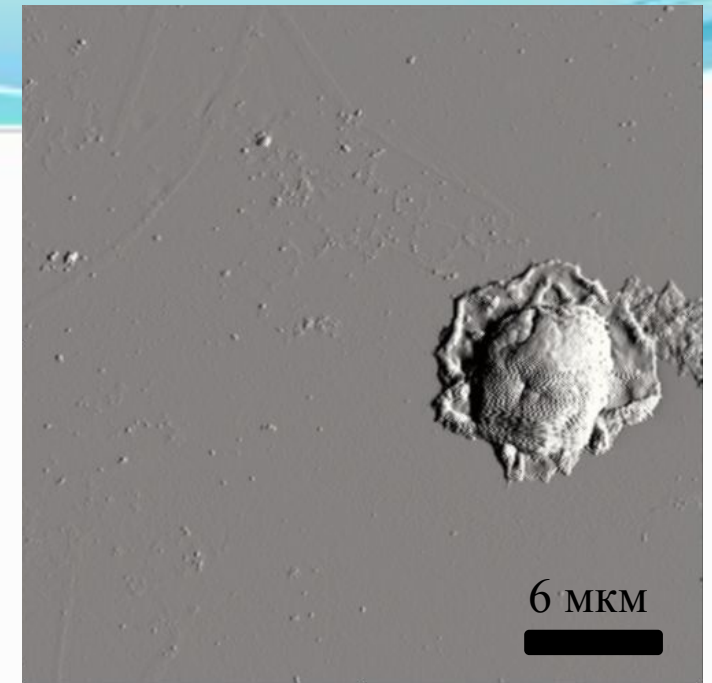
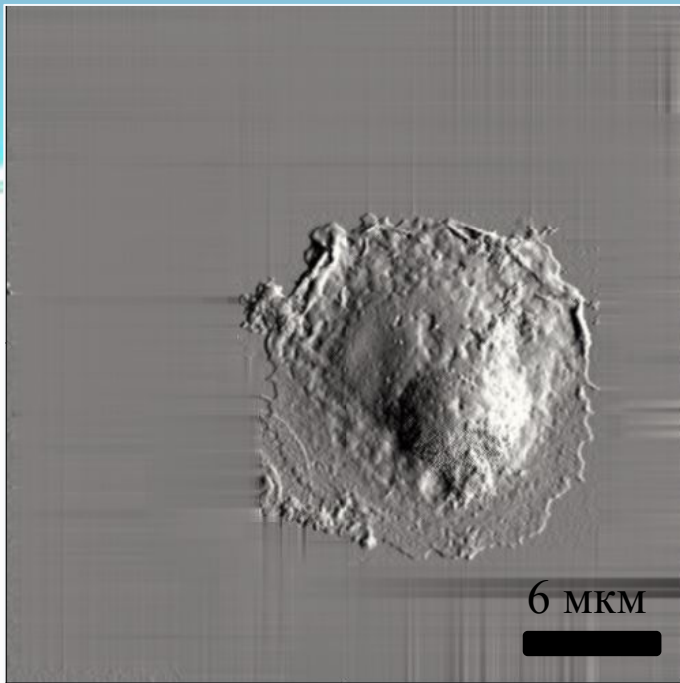






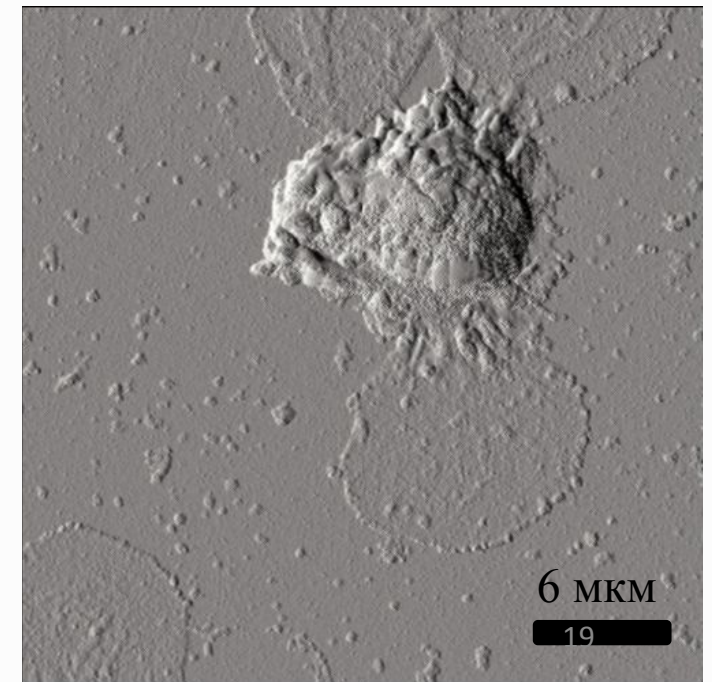
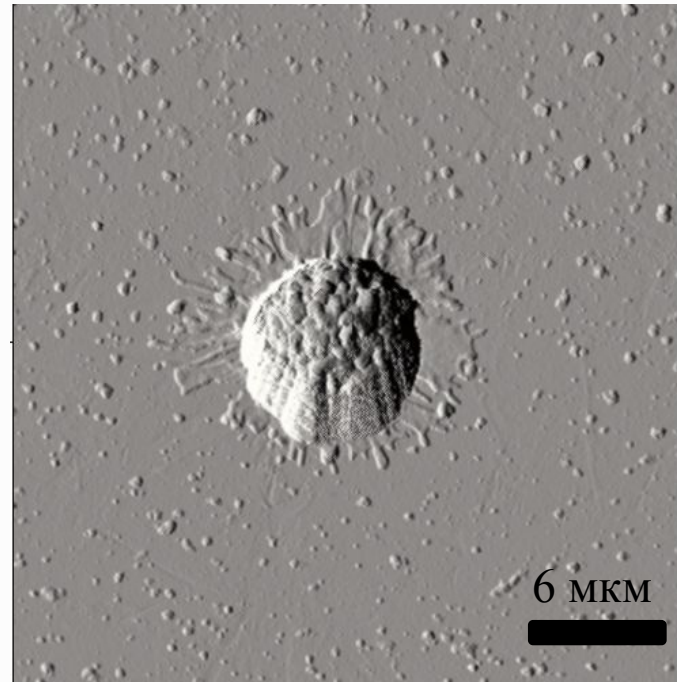
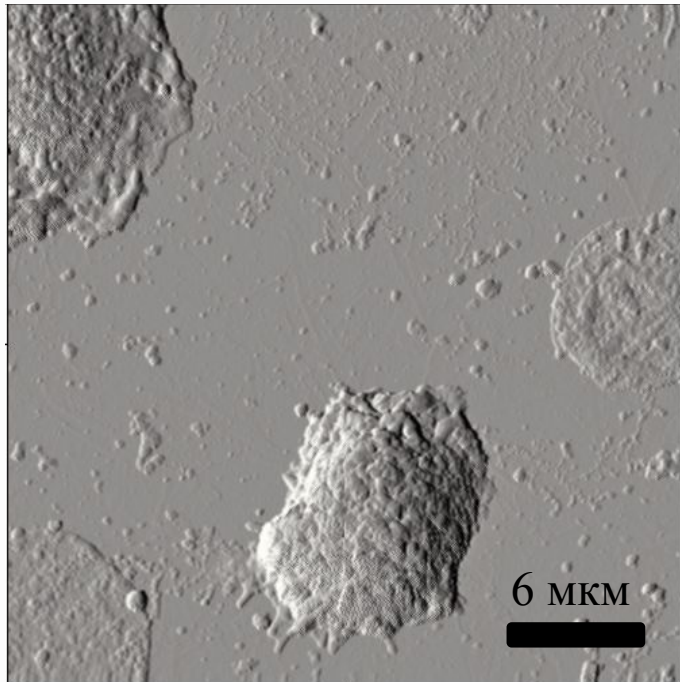
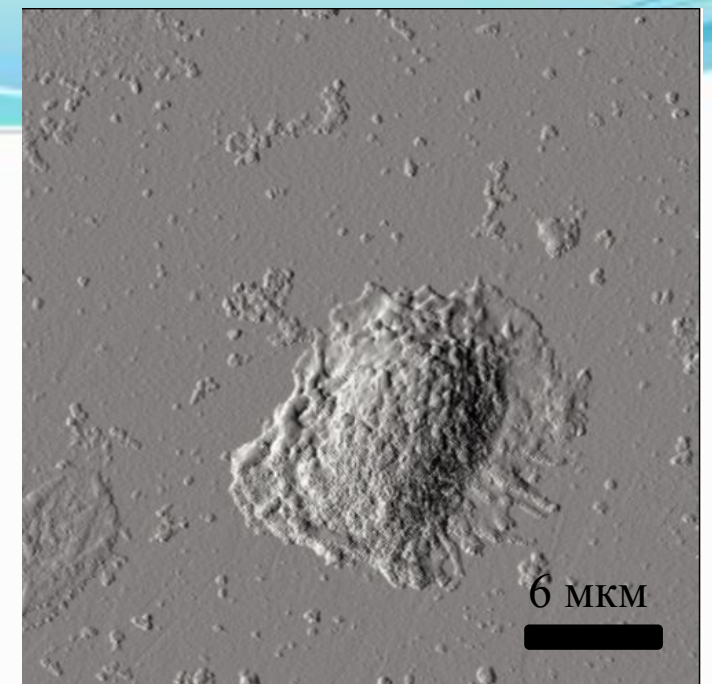
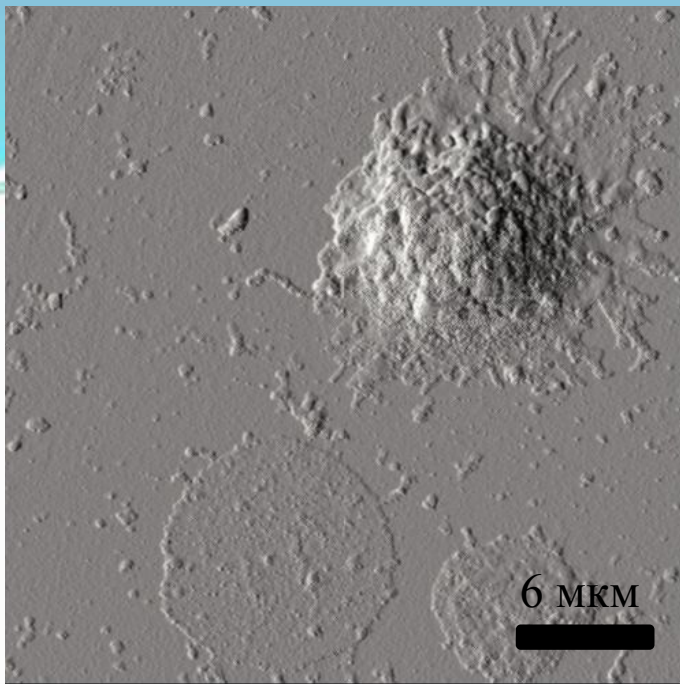
## КТ 1

Морфология клеток разнообразна, в большинстве случаев форма не правильная. Клетки выше. Площадь адгезии уменьшается. Отмечаются повреждения некоторых нейтрофилов. Ряд клеток морфологически напоминают нейтрофилы из контрольных образцов.



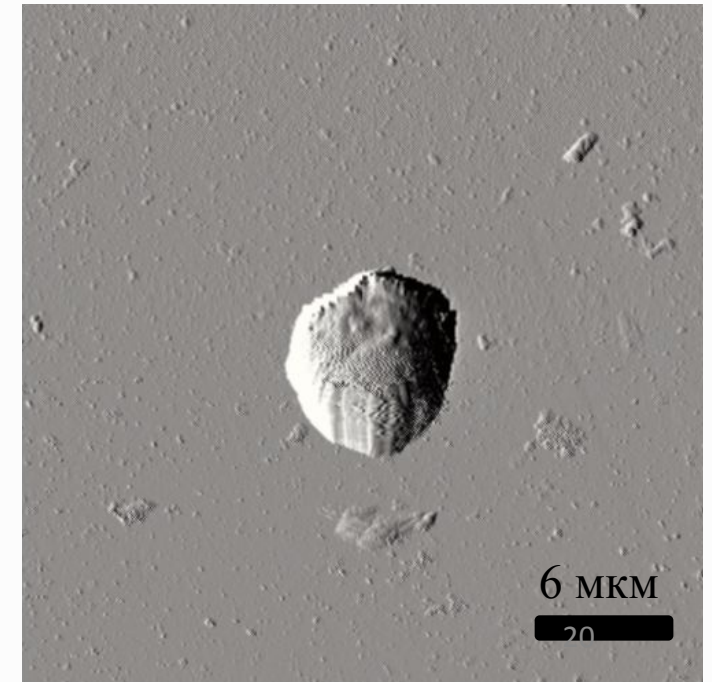
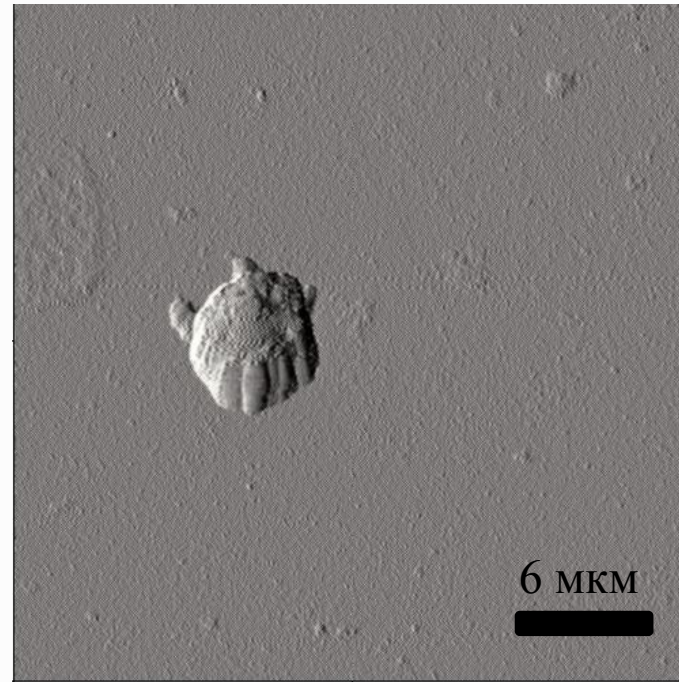
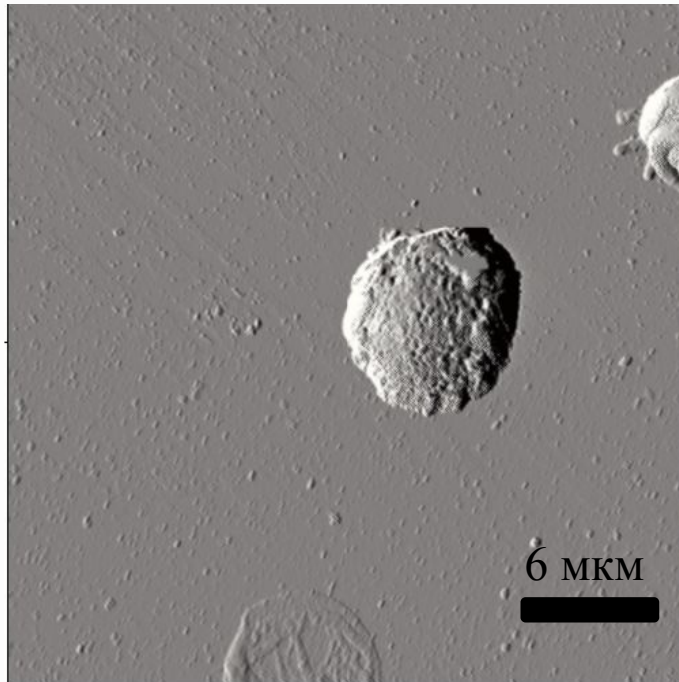
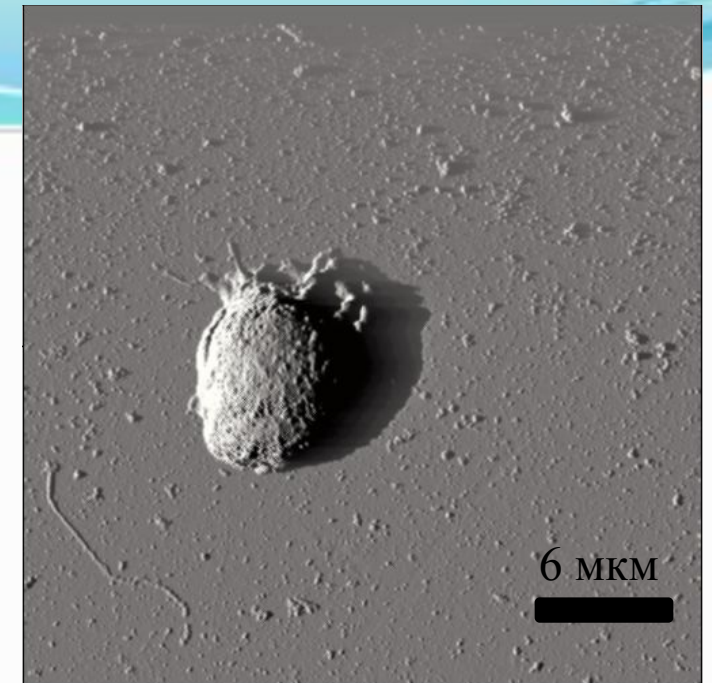
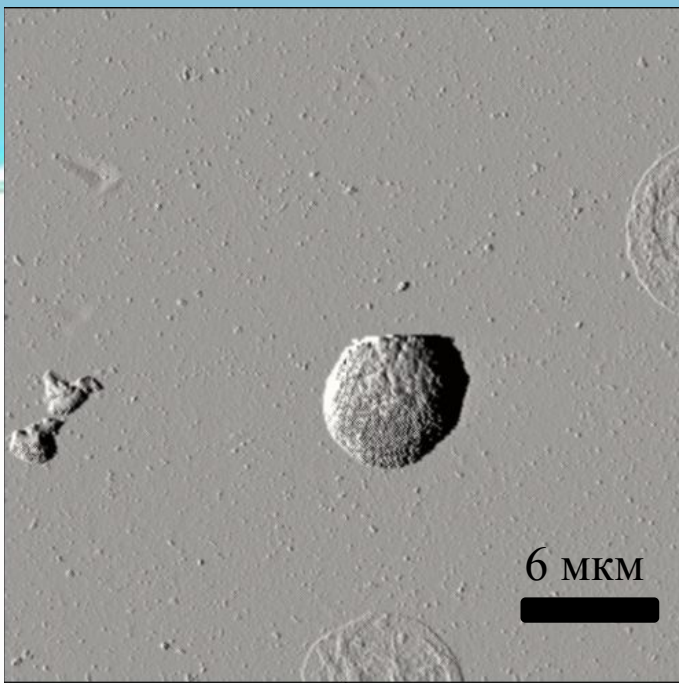
## КТ 2

Морфология клеток разнообразна. Во многих случаях большое количество псевдоподий, что свидетельствует об активации. Визуально клетки выше чем в контроле. Поверхность неоднородна. На подложке большое количество фрагментов похожих на разрушенные клетки. Сегменты ядра не визуализируются.



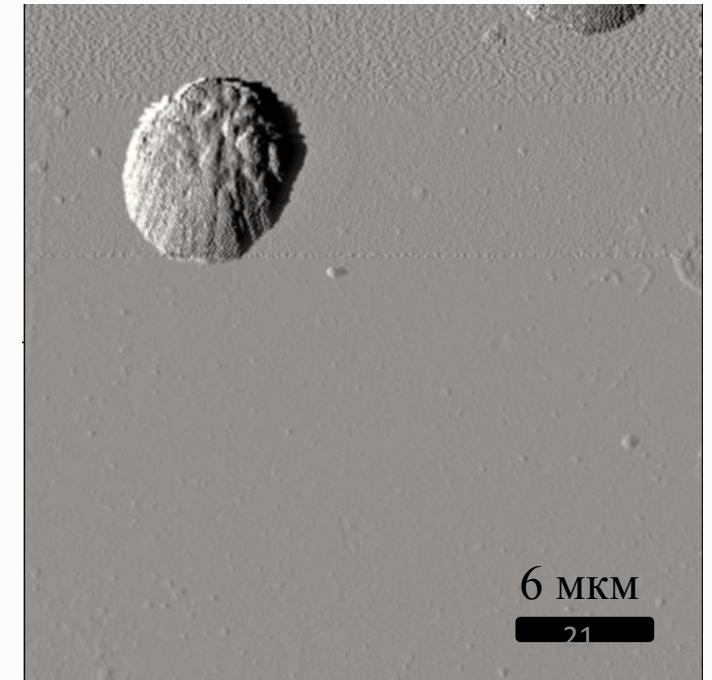
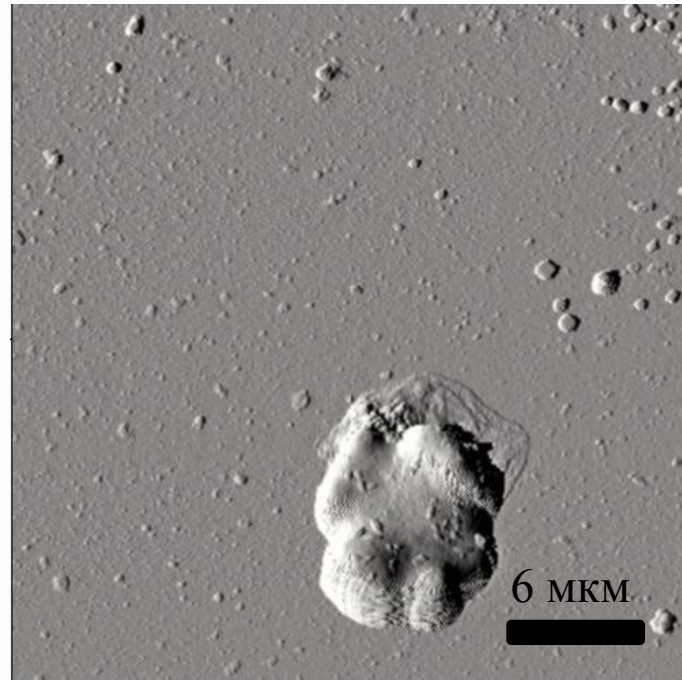
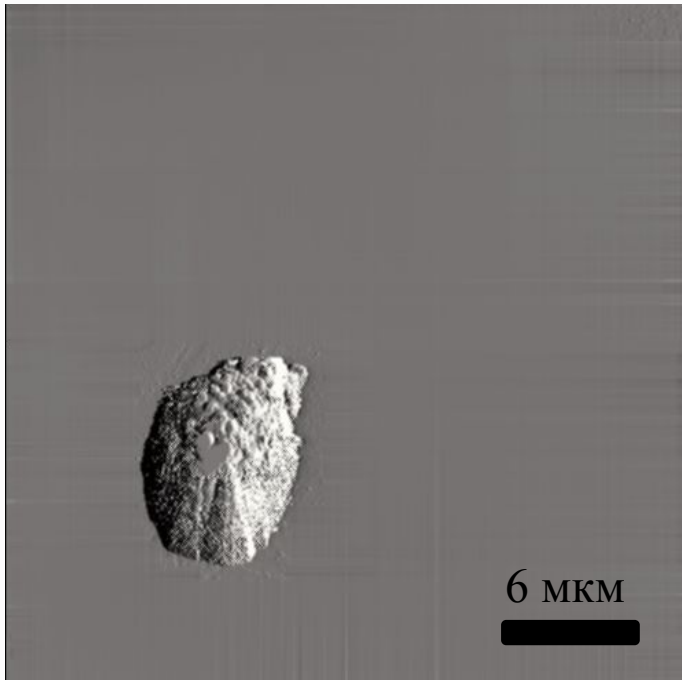
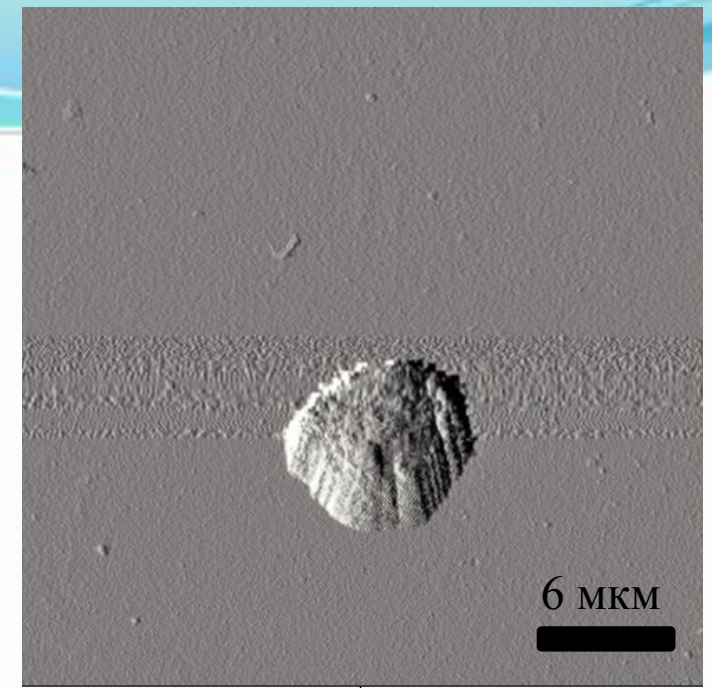
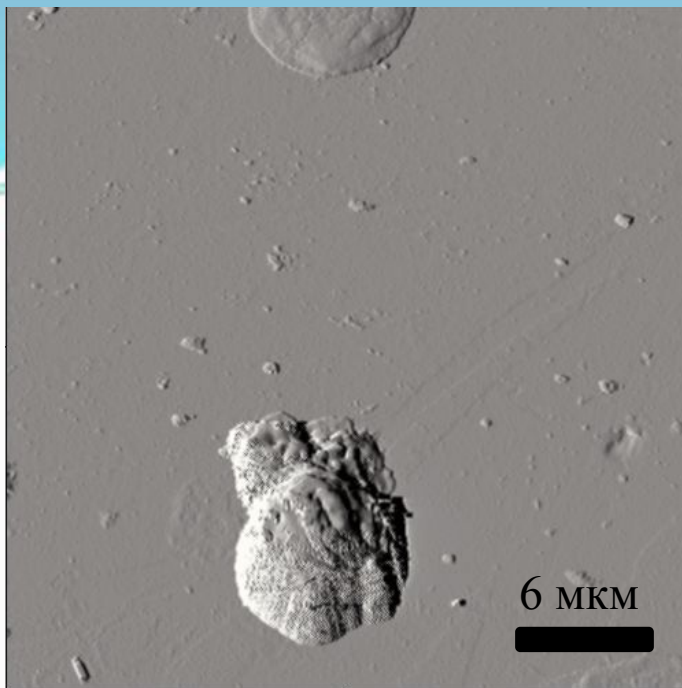
## КТ-3

Морфология клеток однообразна. Края ровные. Форма чаще правильная в большинстве случаев близка к округлой или куполообразной. Нет признаков активации. Площадь адгезии меньше. Высота значительная. Поверхность чаще однородная. Разрушенных клеток мало.



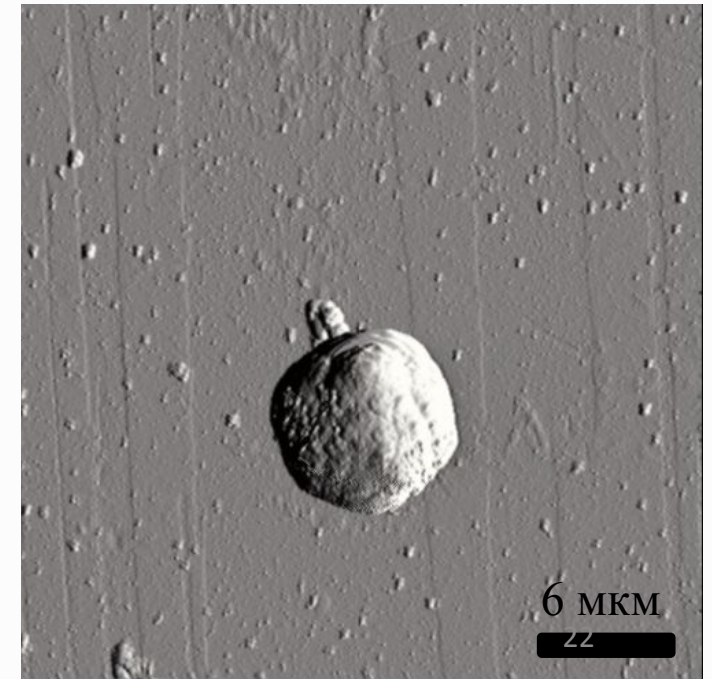
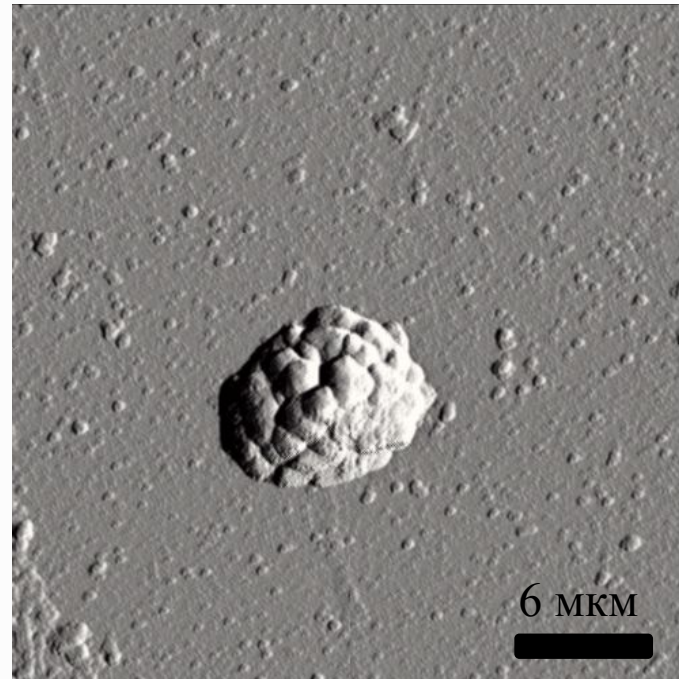
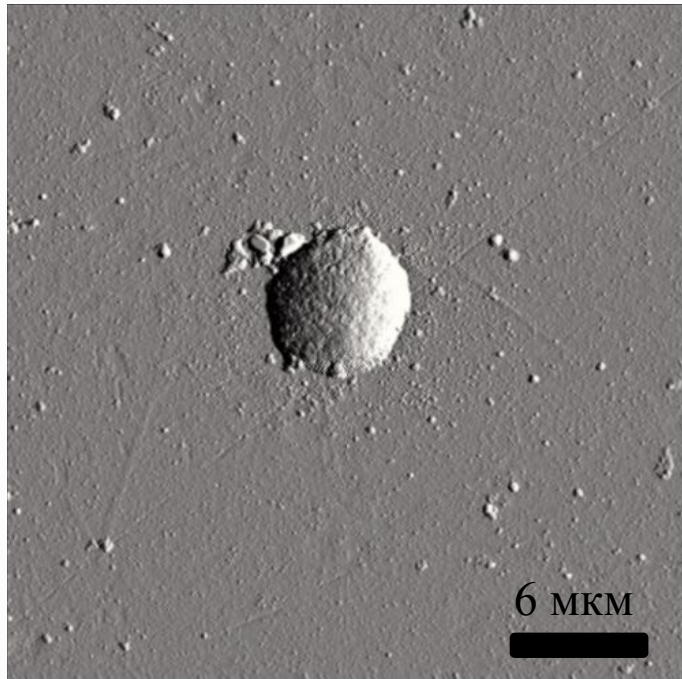
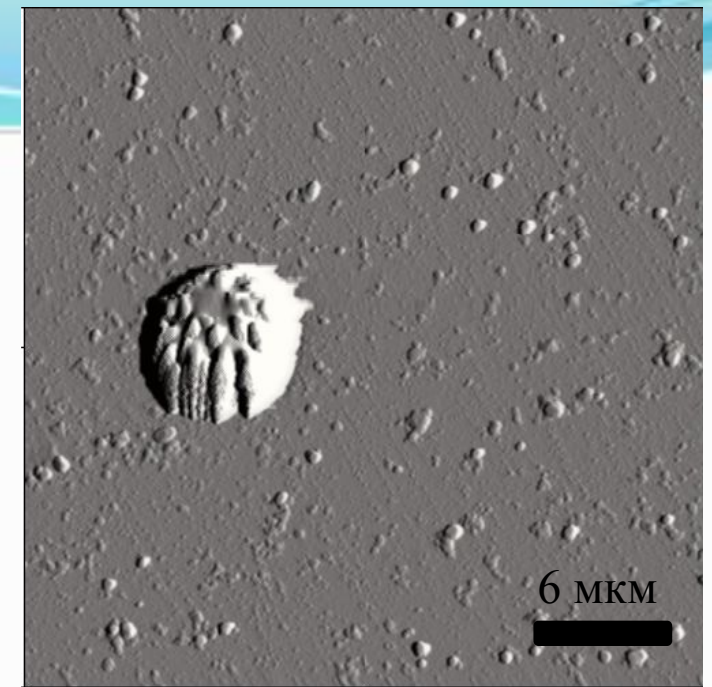
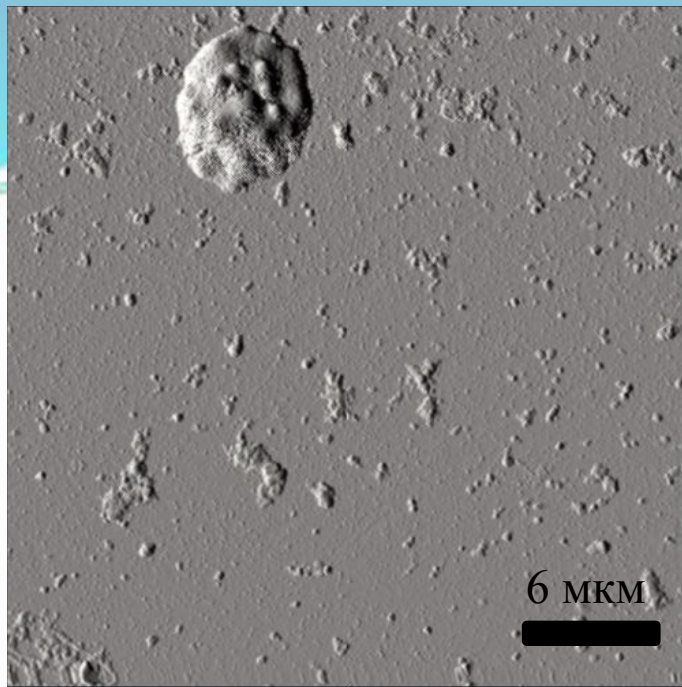
## КТ- 4

Морфология сходна с клетками в предыдущем эксперименте, но более разнообразна. Высота увеличивается относительно контроля. Площадь адгезии так же значительно меньше чем в контроле. В ряде случаев поверхность клеток грубо деформирована. Есть частично разрушенные клетки.



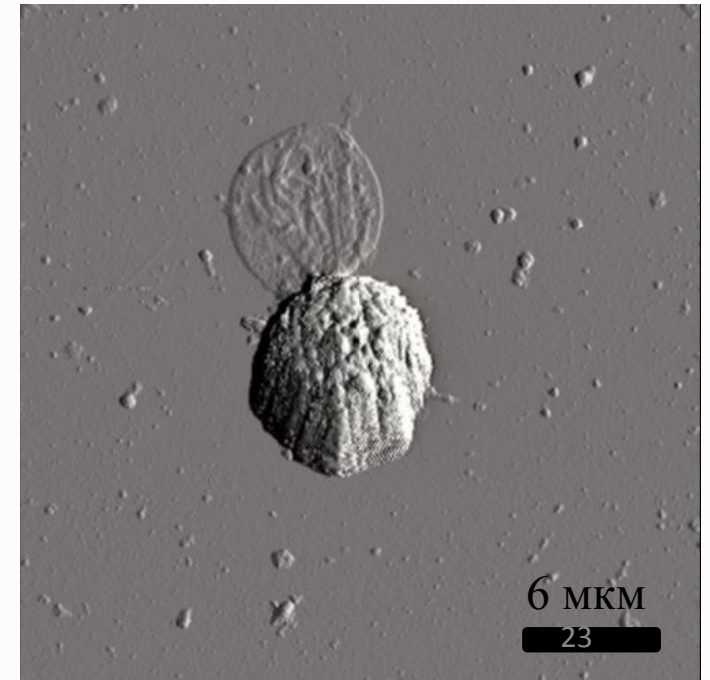
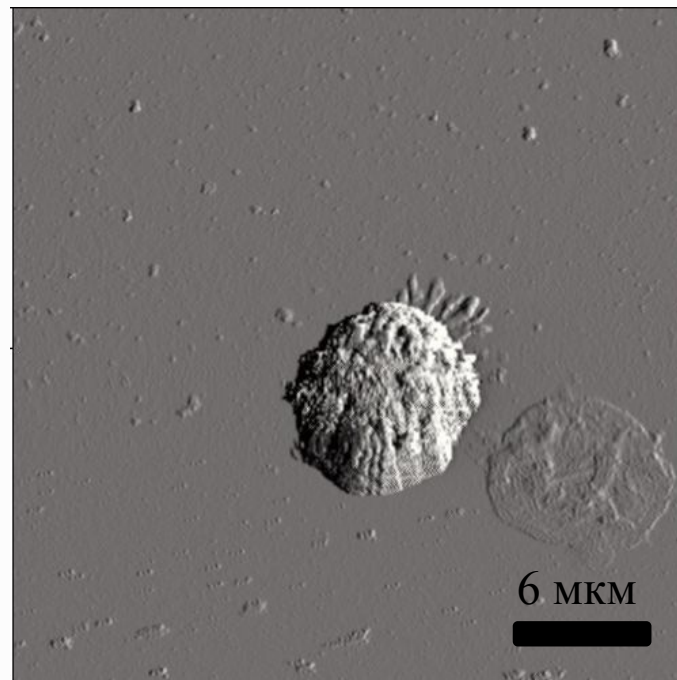
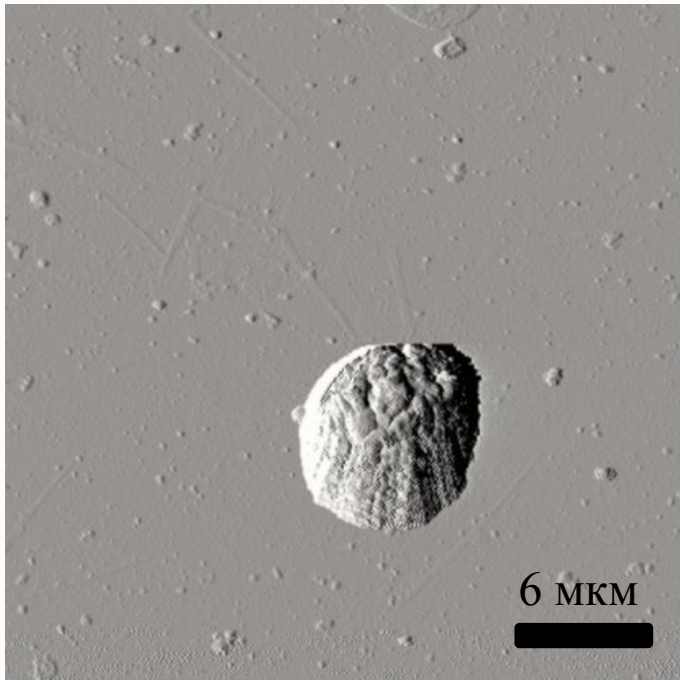
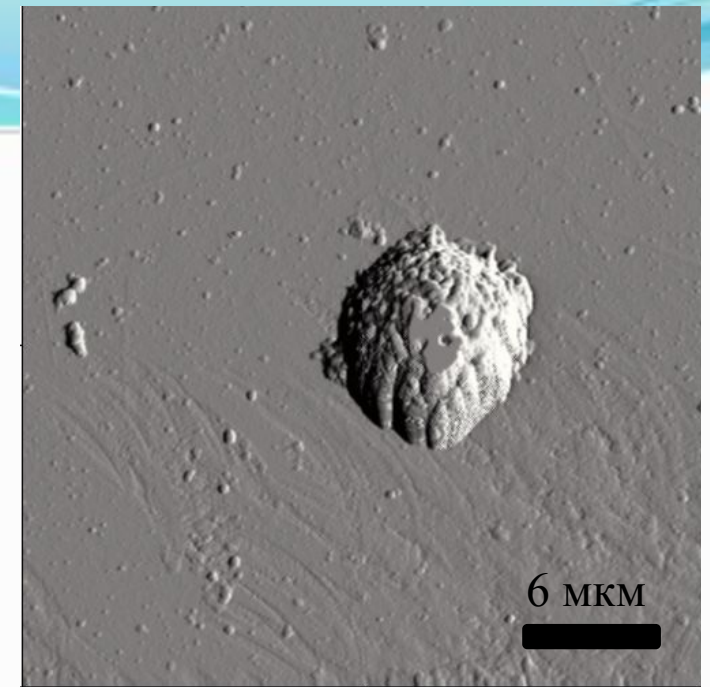
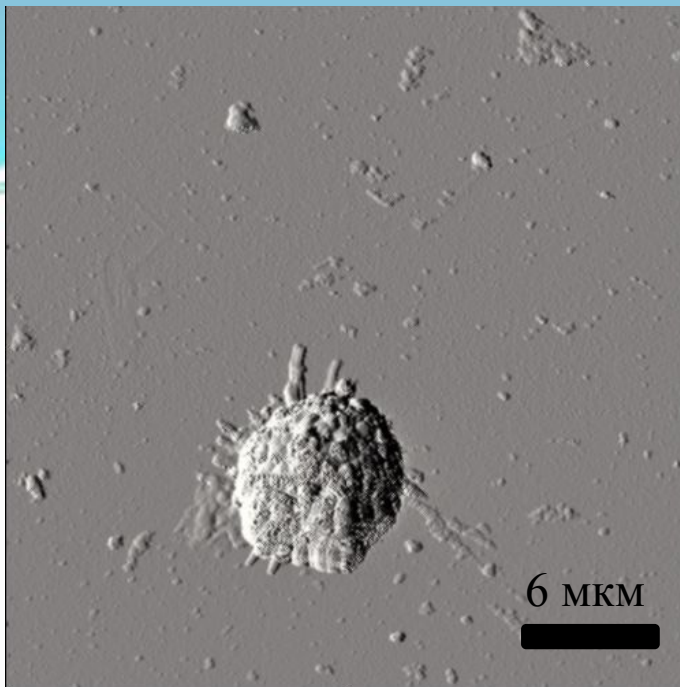
## КТ-5

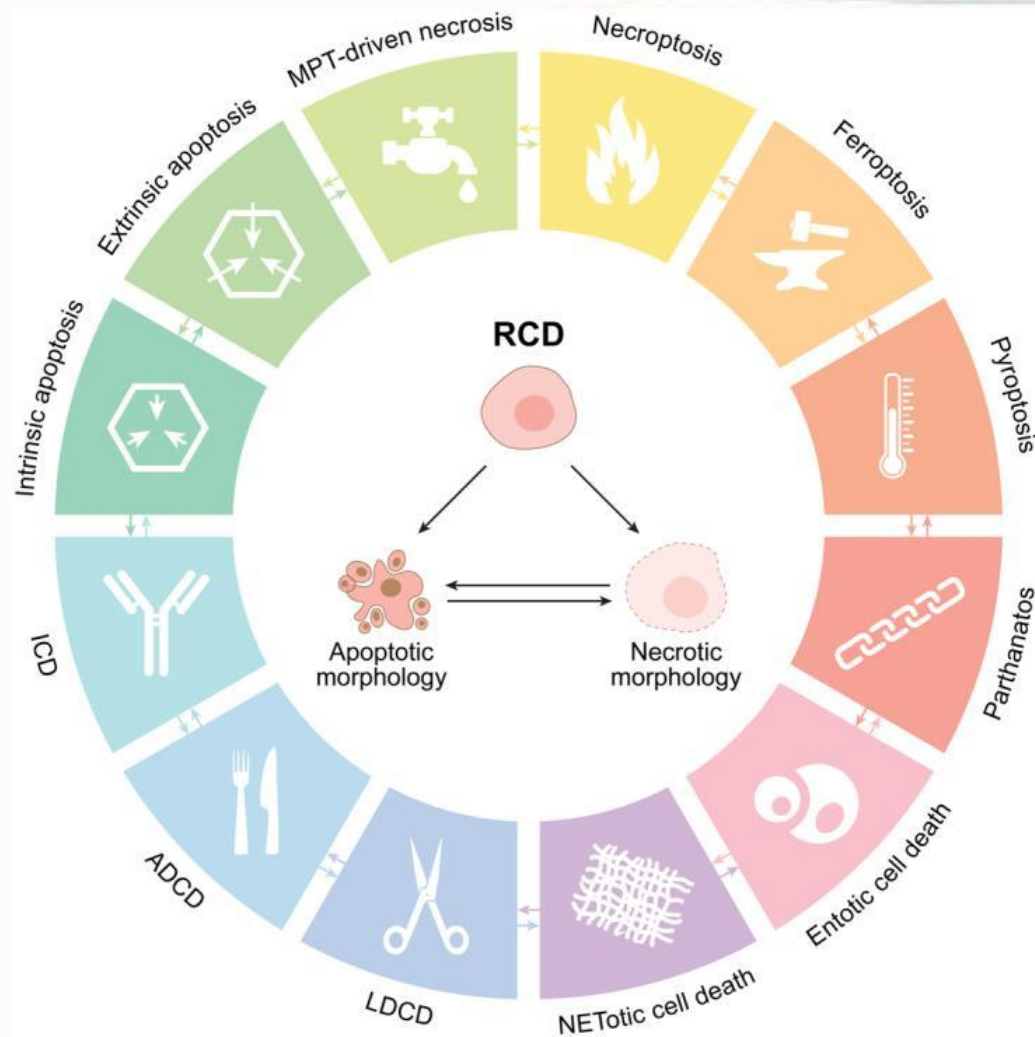
В большинстве случаев форма клеток правильная, округлая или куполообразная. Размер клеток заметно меньше чем в остальных образцах. У многих клеток поверхность не однородная, зернистая. Разрушенных клеток не много. Псевдоподии встречаются у очень малого числа клеток.



## КТ-6

Клетки преимущественно однообразны, правильной округлой или куполообразной формы. Встречаются псевдоподии. Поверхность клеток не однородна. В образце наблюдается большое количество разрушенных клеток.

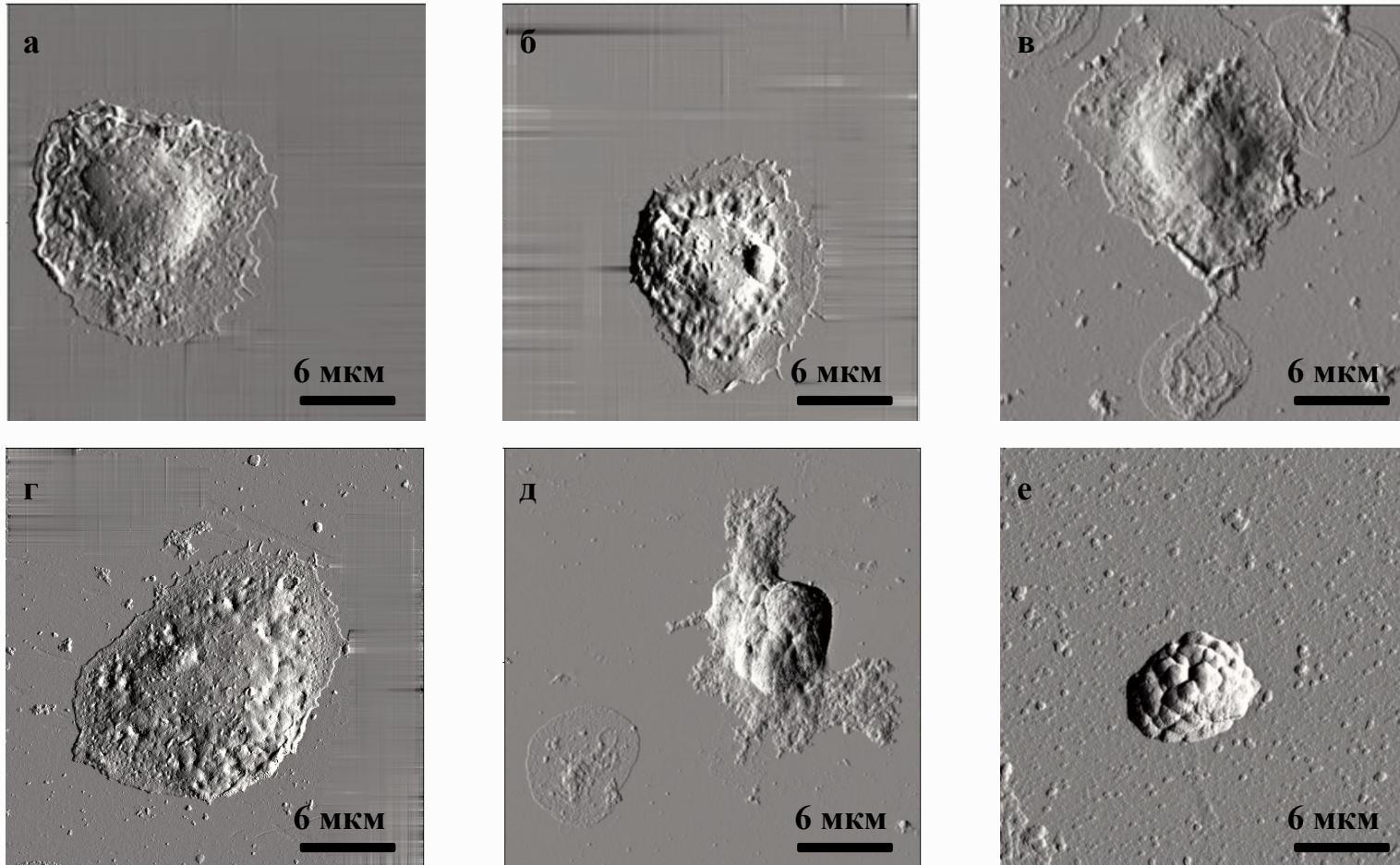




**Международный номенклатурный комитет по клеточной гибели официально выделяет 12 типов клеточной гибели**



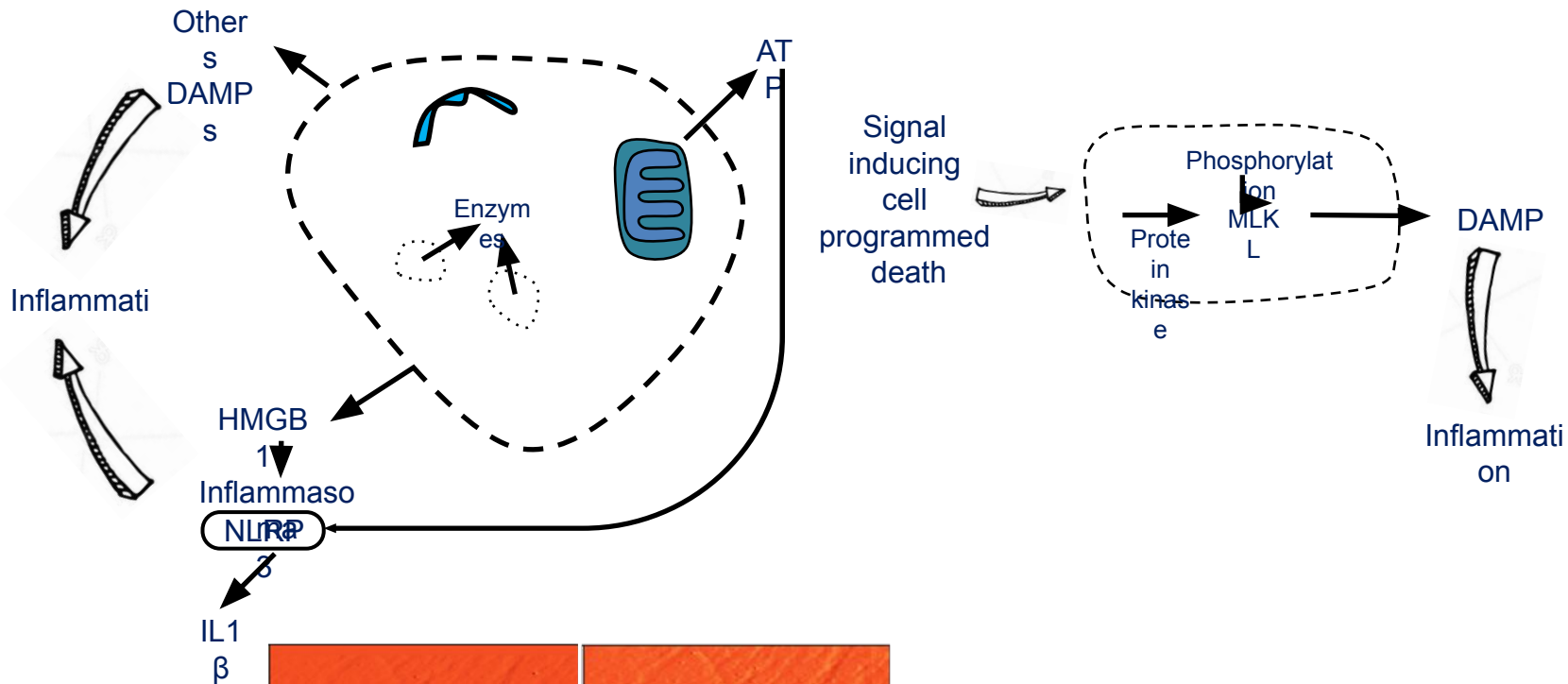
# Механизмы гибели нейтрофильных гранулоцитов (фиксированные клетки)



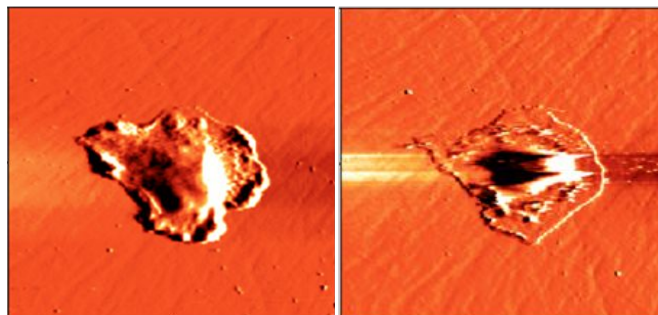
Гибель нейтрофилов под воздействием КТ: а - контроль; б - апоптоз ; в - быстрый нетоз ; г - аутофагия; д - некроз; е-мумификация.

# Основные механизмы гибели нейтрофилов

Для исхода воспалительного процесса важно по какому механизму погибают нейтрофилы:

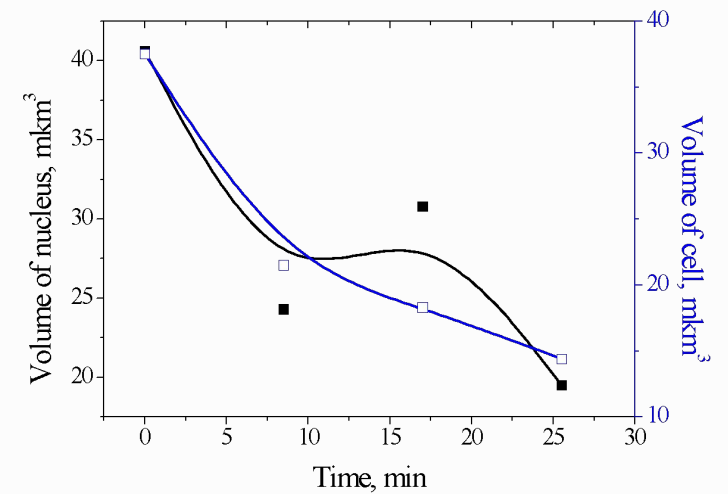
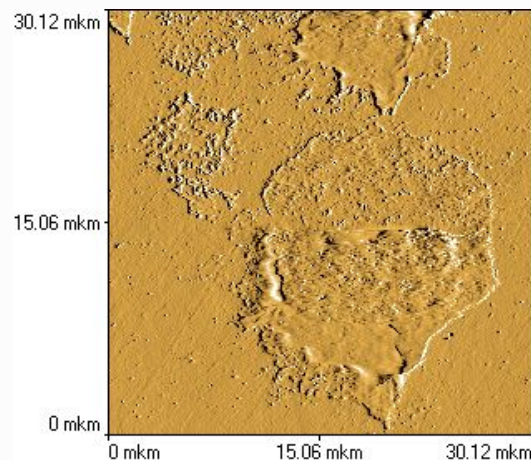
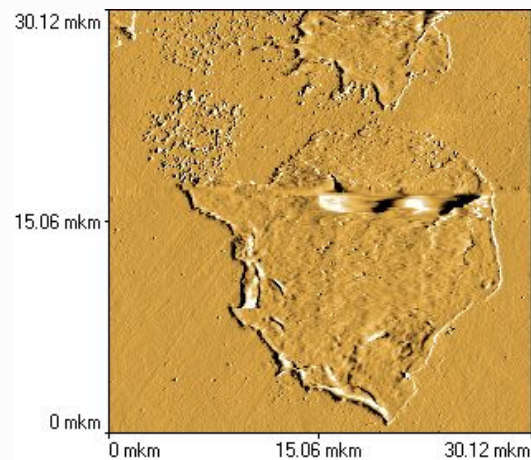
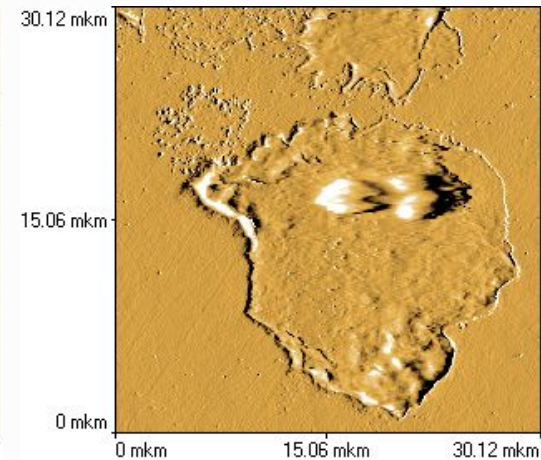
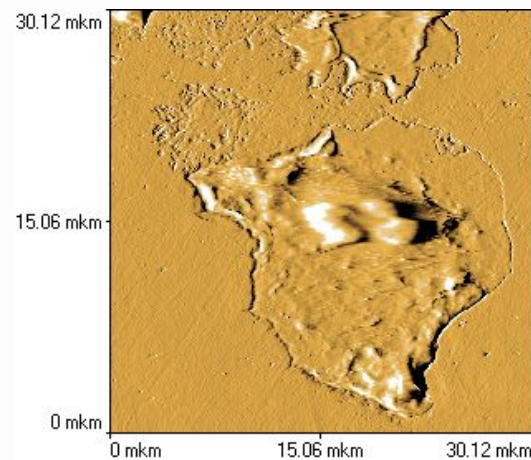
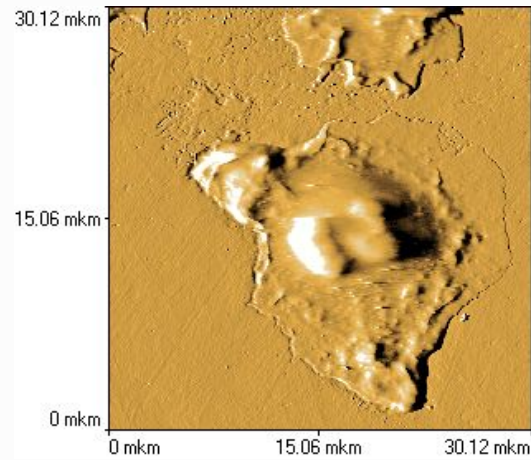


Некро

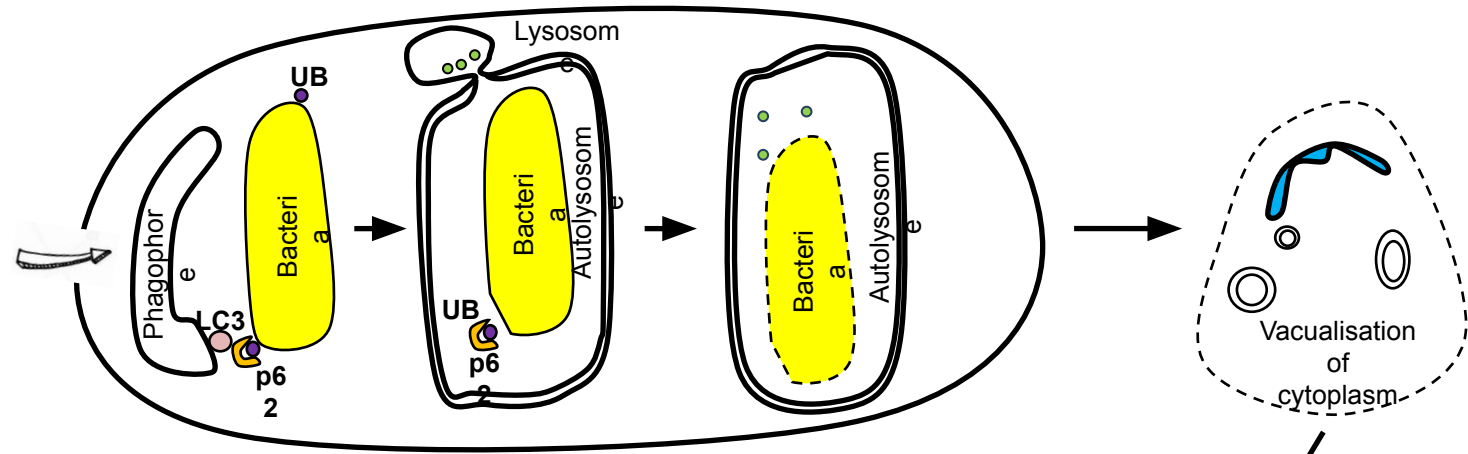


Некроптоз

# Динамика некроза нейтрофилов, исследованная методом АСМ



# Основные механизмы гибели нейтрофилов

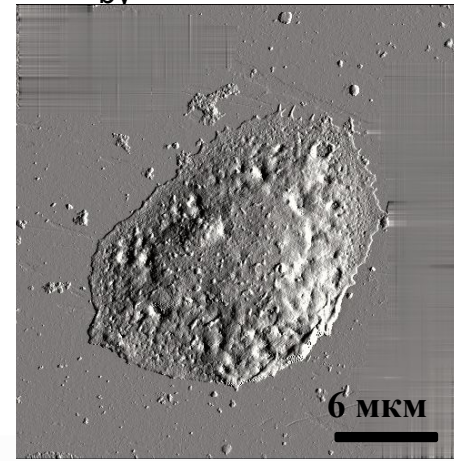


Regulation  
of  
inflammatio  
n

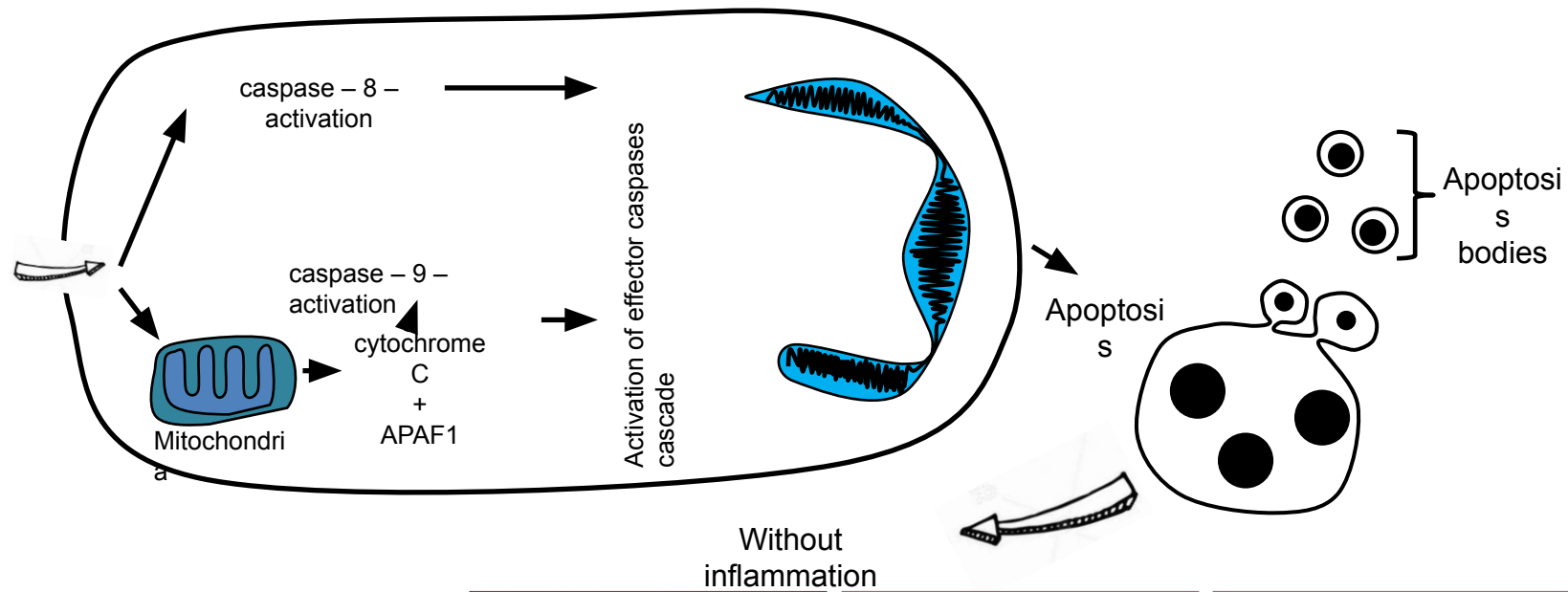
Cell death  
by

Аутофаги

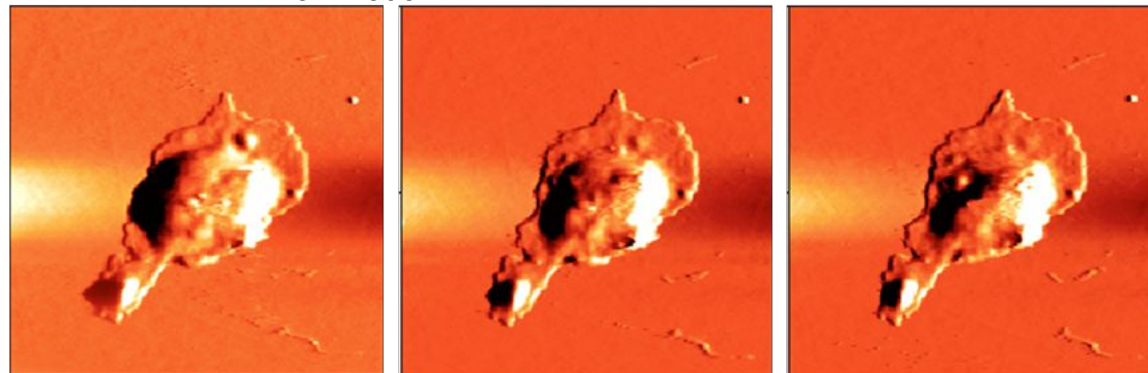
я



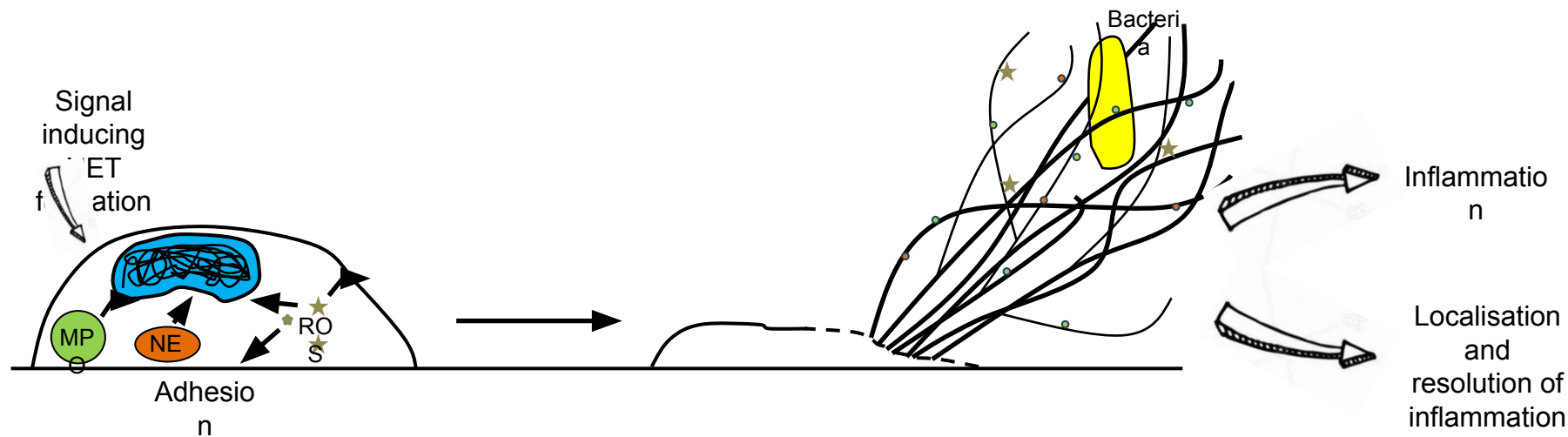
# Основные механизмы гибели нейтрофилов



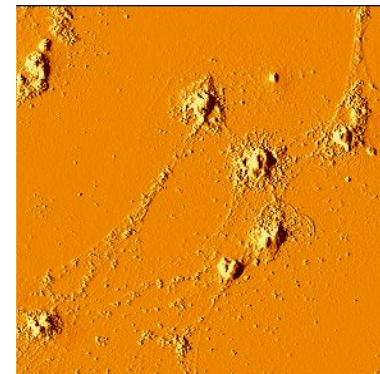
**АПОПТОЗ**



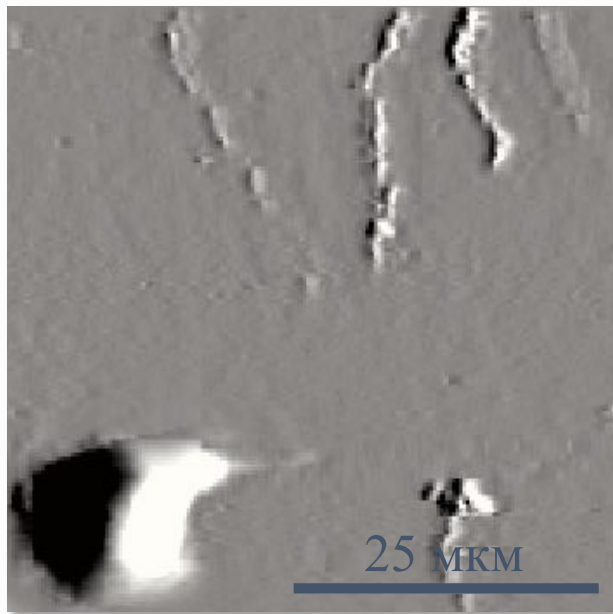
# Основные механизмы гибели нейтрофилов



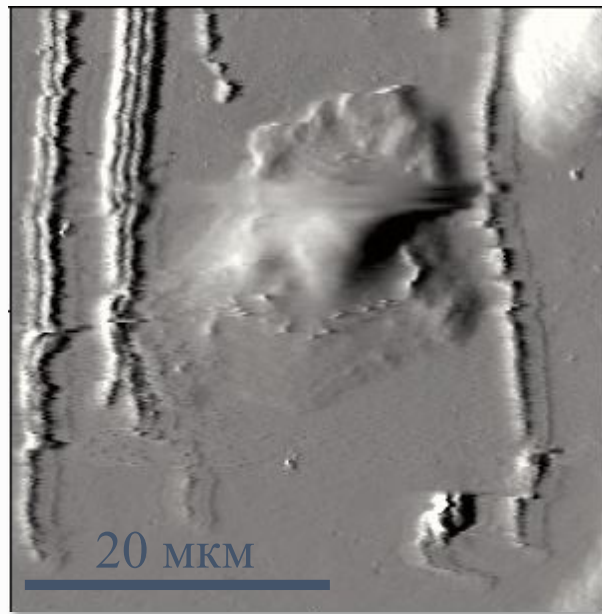
Нетоз



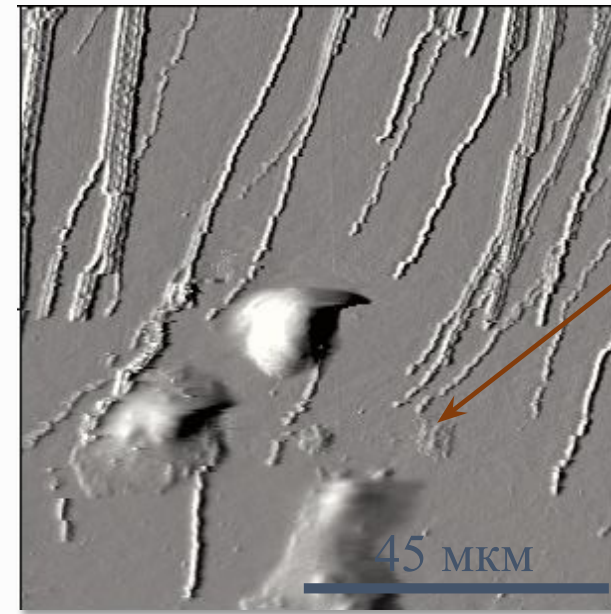
# Изучение динамики формирования нетоза в живых препаратах после инкубации со *S.aureus*



70 мин



85 мин

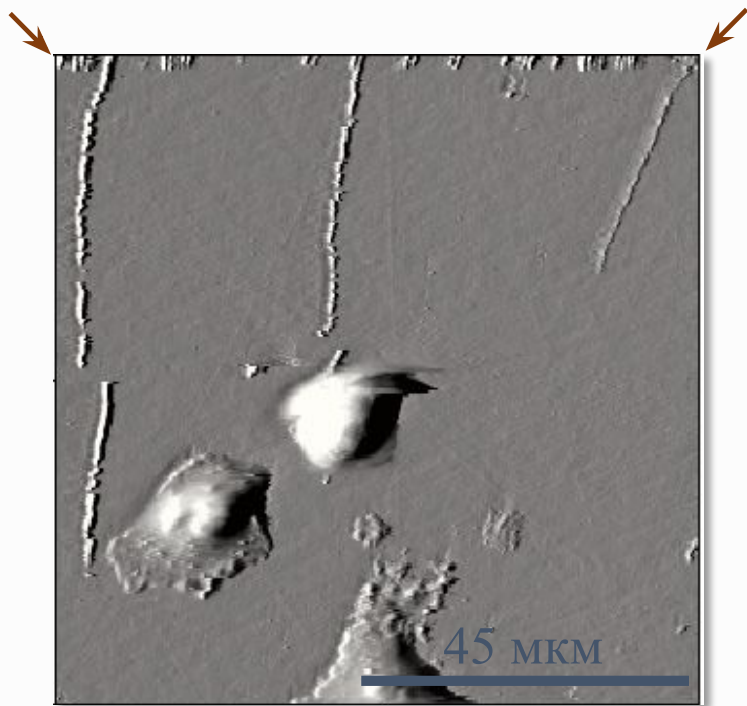


95 мин

Опсонизир  
ованный  
*S. aureus*

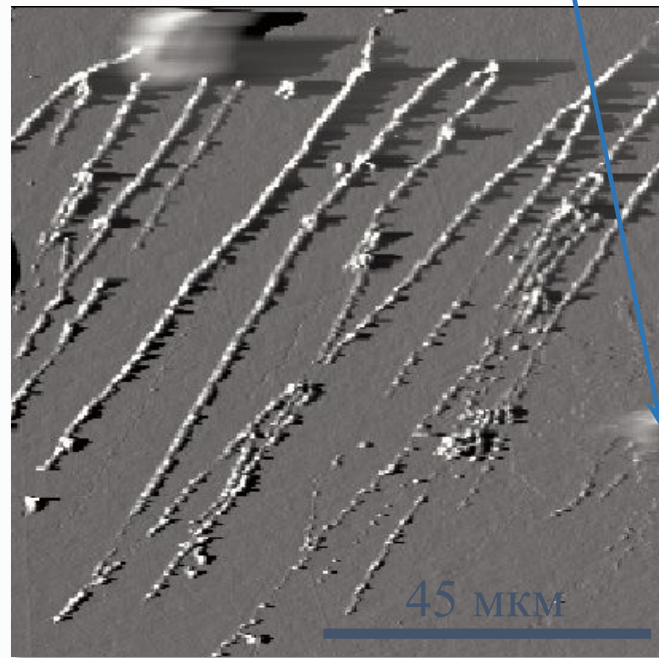
# Изучение динамики формирования нетоза в живых препаратах после инкубации со *S.aureus*

Обрезание ДНК зондом после первого сканирования

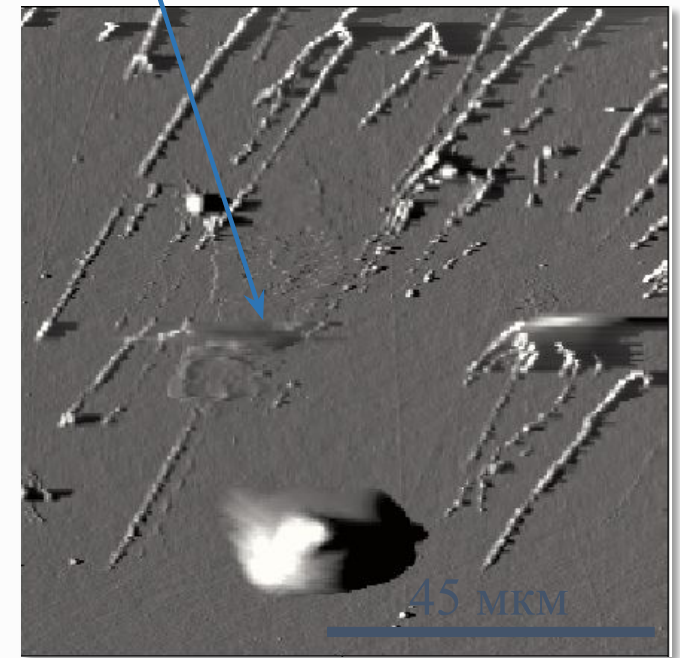


105 мин

Клетка после формирования длинных нетотических сетей полностью расходует свое внутреннее содержимое и идентифицируется только как «тень» клетки



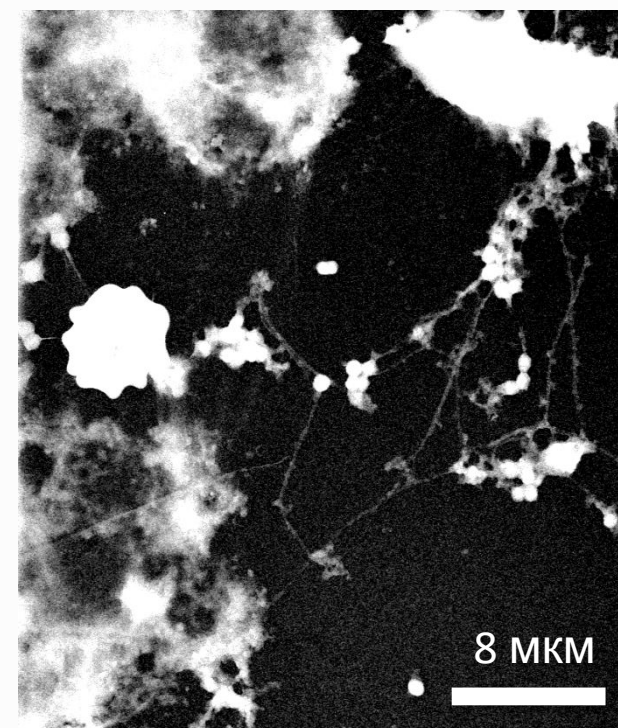
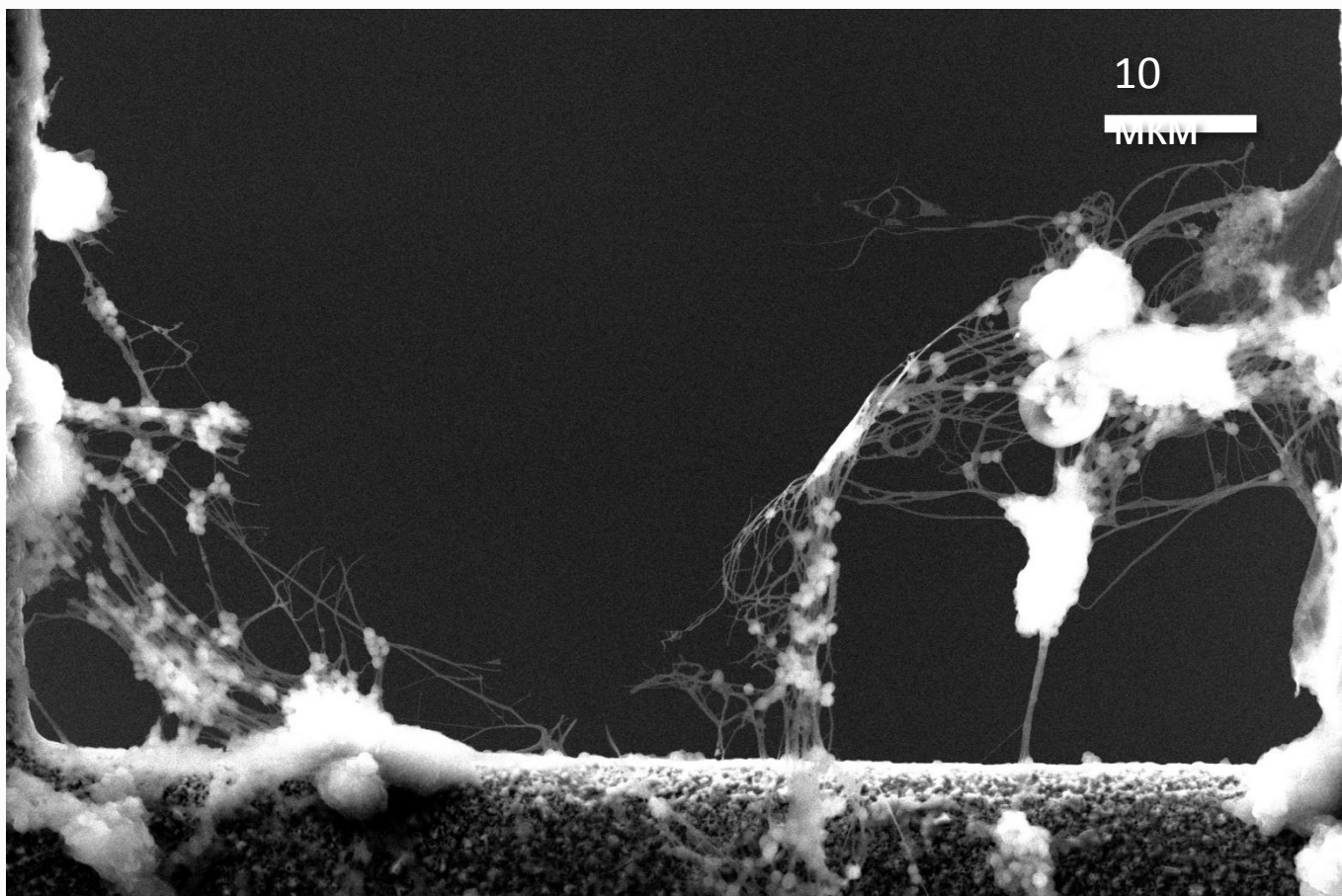
115 мин



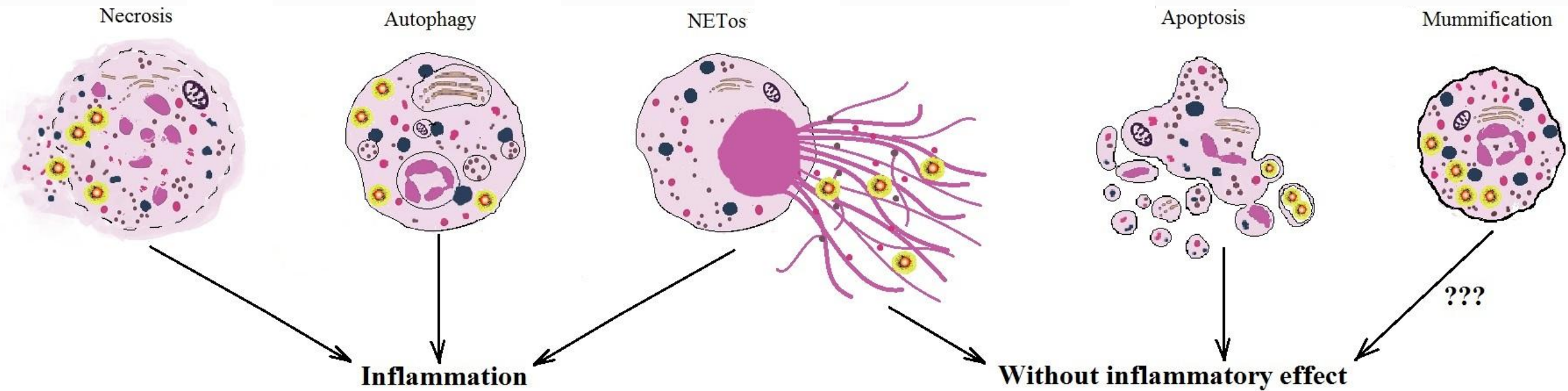
125 мин



# Структурно-морфологические особенности классического нетоза, исследованные методом СЭМ



# Исходы разных вариантов клеточной гибели



# Основные черты нетоза, идентифицированные АСМ

**Хеликсы ДНК распространяются волнообразно целыми блоками;**

**Постепенно наблюдается бифуркация и отделение отдельных нитей ДНК;**

**Отдельные ферменты оказываются «замаскированными» в блоках;**

**Позднее, при отделении отдельных цепочек ДНК видны глобулярные и овальные структуры, которые по всей вероятности соответствуют гистонам и ферментам;**

**В начале формирования блоки хеликсов окружены защитной мембраной;**

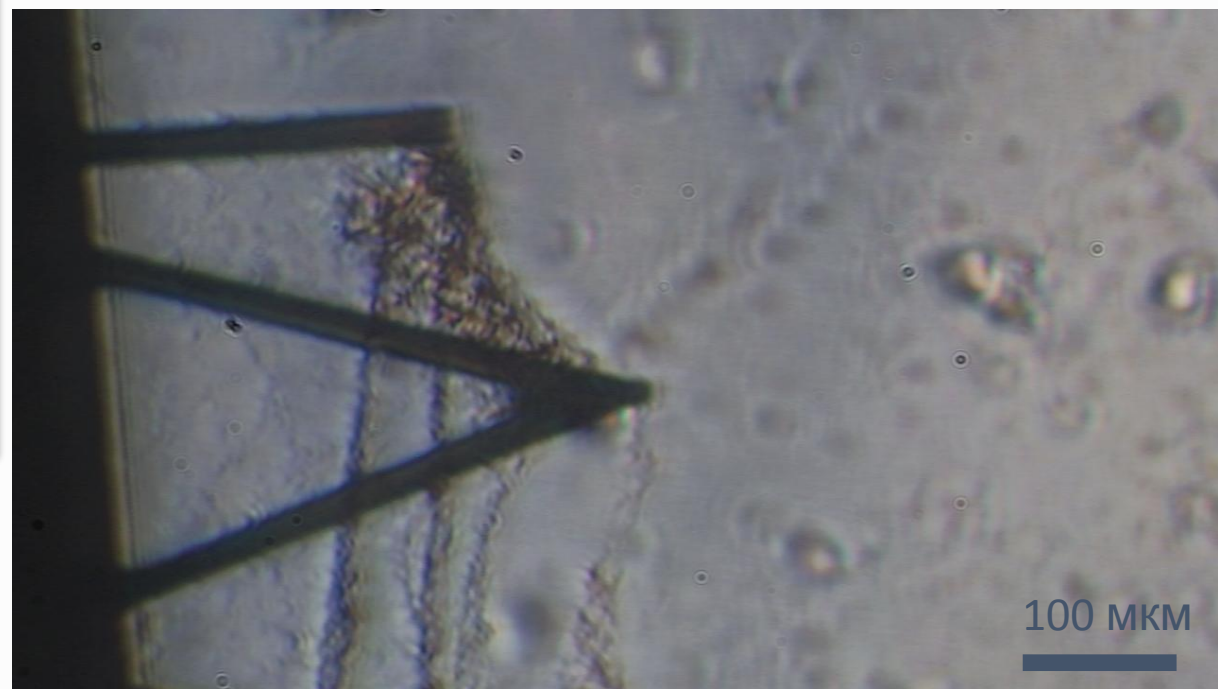
**Происходит истончение спиральных нитей, вероятно из-за деконденсации ДНК;**

**Возможно формируемые нетозные сети обладают своего рода хемотаксической активностью, поскольку наблюдается их движение к опсонизированному стафилококку;**

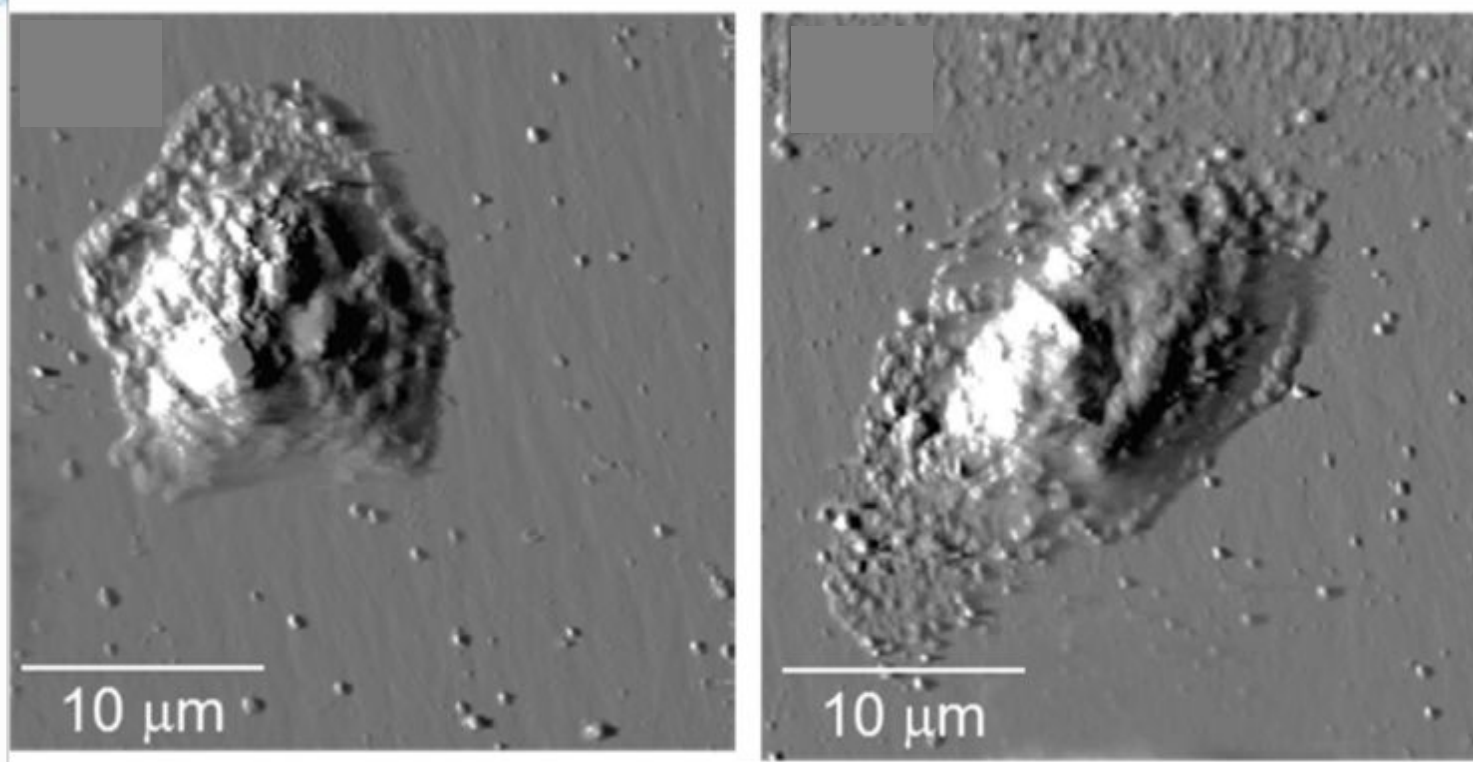
**Весь клеточный материал полностью расходуется на формирование сетей;**

**Достижение нетозной сеткой нейтрофила стимулирует формирование им следующей нетозной сетки.**

# Проблемы исследования нетоза методом АСМ



# Мумификация впервые была открыта методом АСМ



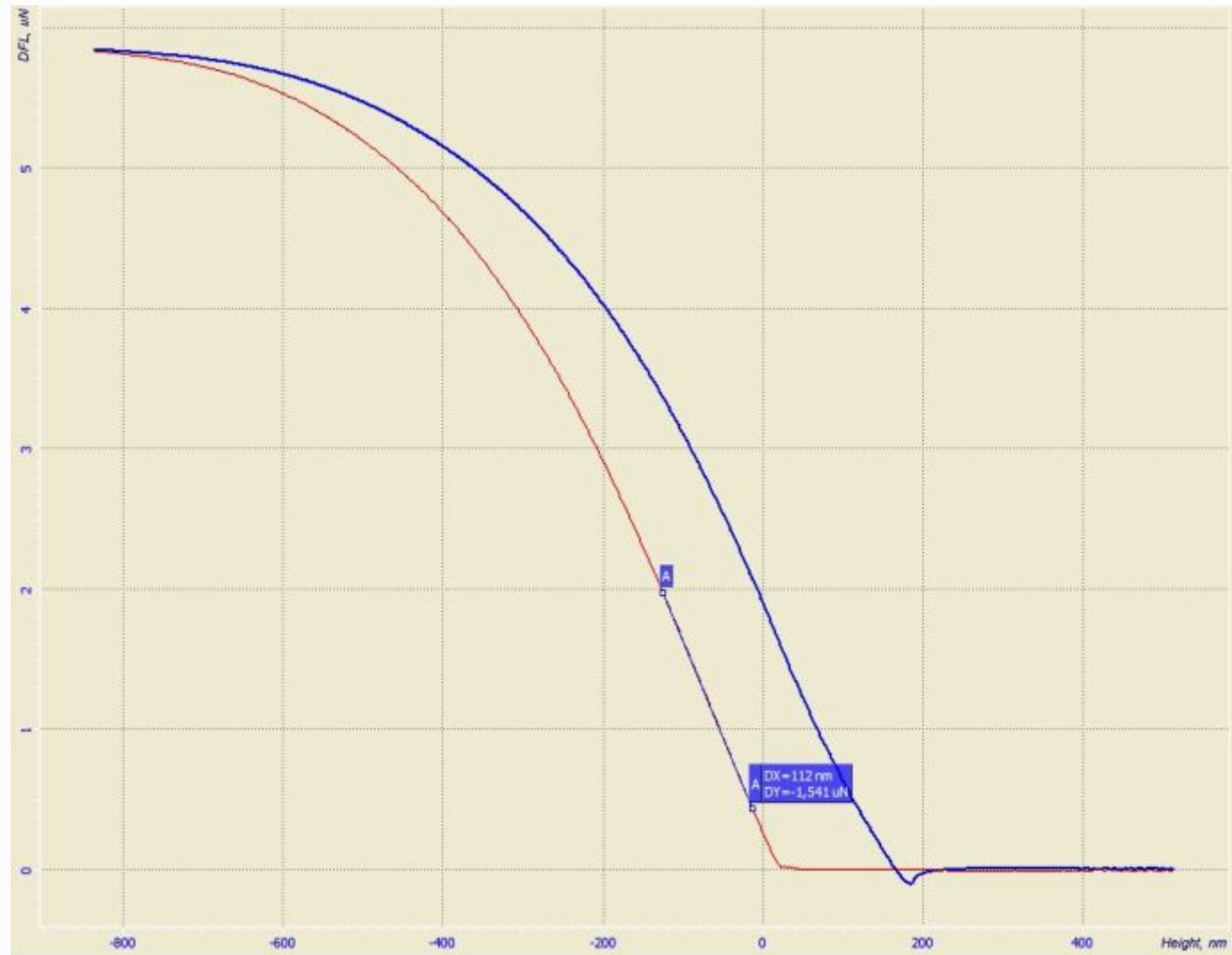
## Мумификация нейтрофилов, исследованная методом АСМ

Pleskova S.N. The use of the light microscopy and the atomic force microscopy for studying cell death under hydrogen peroxide influence. «Current microscopy contributions to advances in science and technology». Editor: Antonio Méndez-Vilas. Publisher: Formatex Research Center. Volume 1 ISBN (13): 978-84-939843-5-9. Publication date: December 2012 p. 602 – 609.

Pleskova S.N., Mikheeva E.R., Gornostaeva E.E. The Interaction between Human Blood Neutrophil Granulocytes and Quantum Dots // Micron. 105 (2018) 82–92. Doi: 10.1016/j.micron.2017.11.011

Pleskova S.N., Gorshkova E.N., Novikov V.V., Solioz M. Treatment by serum up-conversion nanoparticles in the fluoride matrix changes the mechanism of cell death and the elasticity of the membrane // Micron. 2016. – V. 90. P. 23 – 32.

# Диаграмма силовых кривых воздействия кантилевера на мембрану живых клеток программы

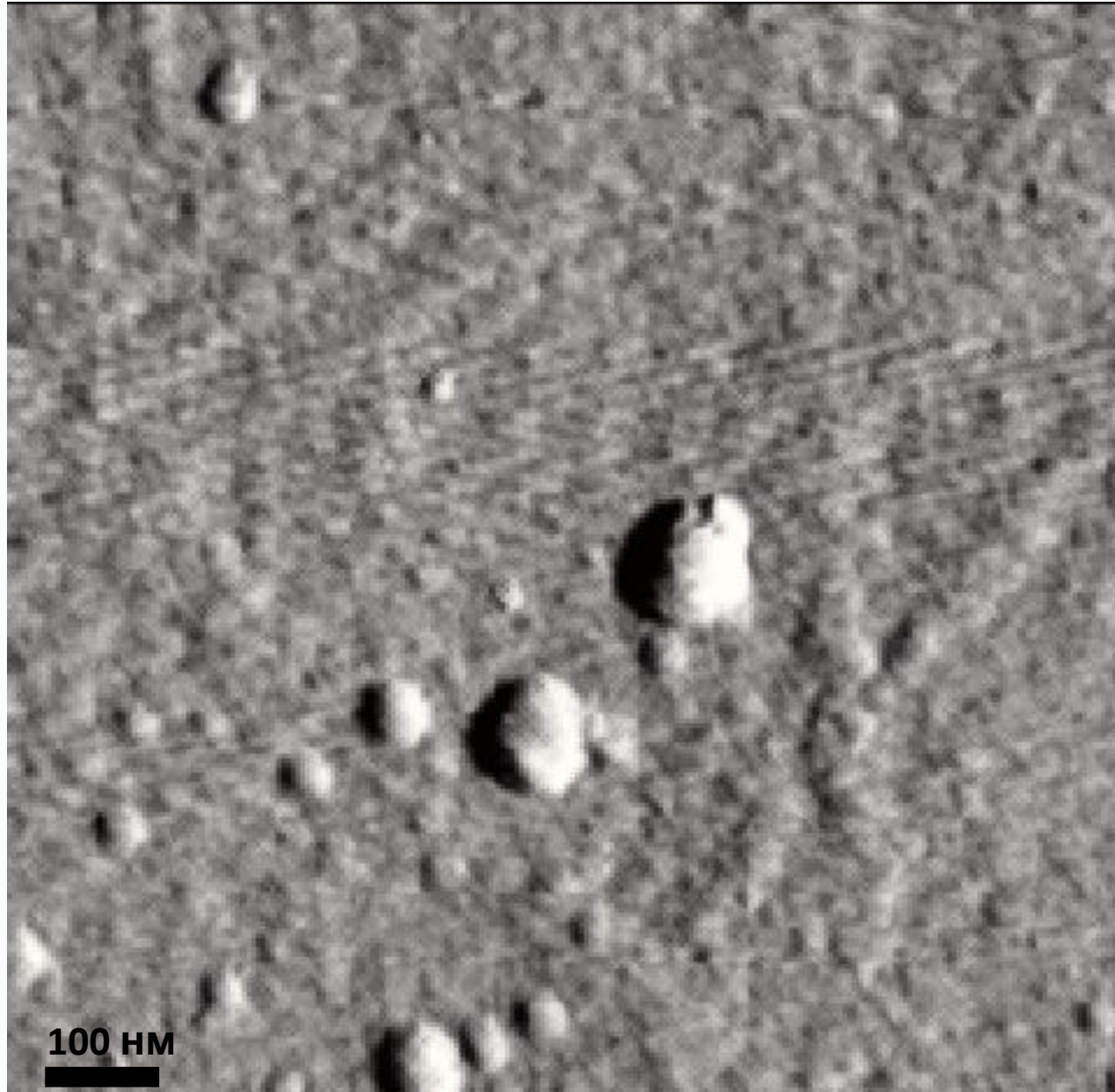




Нейтрофилы в контроле  $26.75 \pm 2.49$  кПа



Мумифицированные нейтрофилы  $143.21 \pm 22.19$  кПа



100 nm





Спасибо за  
внимание