

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В ИЗУЧЕНИИ РЕЛЬЕФА ЭНДОТЕЛИЯ

Карпунина Н.С.

ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь.

Пермь, Россия (614990, г.Пермь, ул.Петропавловская, 26) rector@psma.ru

Апробированы авторские методики получения изображения рельефа эндотелия коронарных артерий методом атомной силовой, интерференционной и цифровой оптической микроскопии. Использовали фрагменты коронарных артерий, полученные посмертно в процессе вскрытия больных, страдавших и умерших от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), а также фрагменты неизмененных коронарных артерий лиц, умерших не от сердечных причин. Всего исследован материал от 24 умерших, из них 12 (50 %) – мужчин. Больных с сахарным диабетом и новообразованиями не включали в исследование. Предложенный способ позволил визуализировать рельеф только с помощью цифровой оптической микроскопии. Даны описательные характеристики поверхности эндотелия неизменной артерии, а также ее реструктуризации на разных стадиях атерогенеза. Посредством доступного математического обеспечения выявить статистически значимые отличия между составными частями полученных изображений не удалось.

Ключевые слова: цифровая оптическая микроскопия, рельеф эндотелия, коронарные артерии, атерогенез.

AN EXPERIENCE OF USING THE HIGH RESOLUTION MICROSCOPY IN THE OBSERVING OF THE ENDOTHELIAL SURFACE

Karpunina N.S.

Perm state medical academy named in honor of E.A.Wagner, Perm.

Perm, Russia (614990, Perm, Petropavlovskaya str., 26) rector@psma.ru

There was suggested and performed an investigation of the endothelial surface of coronary arteries by atomic force, interferential and digital optic microscopy. We used the samples of the coronary arteries, dissected during the autopsy of patients, who suffered and died from coronary heart disease and patients, died from non-cardiac events also. We described the samples from 24 people totally, men -12 (50%). Patients with diabetes mellitus and diagnosed tumors were excluded. Our method of the sample preparation allowed us to get pictures with the help of the digital optic microscopy only. We described the endothelial surface in the unchanged regions and through the different stages of the atherogenesis. We failed to find any statistically significant differences between the composed parts of the images.

Key words: digital optic microscopy, endothelial relief, coronary arteries, atherogenesis.

В последние годы для биологических исследований был адаптирован метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), позволяющий отображать трехмерные клеточные структуры с высоким разрешением, проводить исследования в воздушной и жидкой среде, изучать особенности рельефа сканируемой поверхности, оценивать механические свойства клеток, мониторировать клеточные процессы в режиме реального времени [3, 4]. В доступной нам, в большинстве случаев, иностранной литературе представлены результаты исследований по изучению механической ригидности клеток и адгезивных межклеточных сил, их реакции на приложение нагрузки, межмембранный тетринг, корреляции между видами прилагаемой нагрузки и формами разрывов [5, 6]. Помимо АСМ современная наука располагает еще несколькими технологиями, позволяющими проводить эксперименты по изучению морфо-

функциональных свойств объектов со сверхвысоким разрешением. Оптическая интерференционная микроскопия – бесконтактный метод быстрого получения топографии поверхности в 3D, создающий условия для регистрации особенностей рельефа, начиная от шероховатости нанометрового масштаба до ступенек миллиметровой высоты. Цифровая видеомикроскопия предоставляет возможность получения оцифрованных изображений объектов и выполнения измерений по трем координатам. Она уже успешно применяется в электронике, машиностроении, материаловедении, криминалистике, металлографии, в производстве пластмасс, биологии, реставрации и других задачах. С помощью цифрового видеомикроскопа, в отличие от обычного, становятся возможными синтез и сравнение изображений, запись потокового видео, 3D обзор и трехмерное моделирование, послойное фотографирование с последующим синтезом слоев для получения сфокусированного изображения глубокого рельефа.

Использование этих методов в изучении рельефа эндотелия сосудов, в том числе на различных этапах атерогенеза, представляет, на наш взгляд, интерес с точки зрения фундаментальной медицины и возможности его морфо-функциональной оценки на уровне отдельных клеток с поиском математических закономерностей, описывающих характерные изменения поверхности. В этой связи **целью** настоящего исследования явилось изучение возможностей атомной силовой, интерференционной и цифровой оптической микроскопии в получении и обработке изображений рельефа эндотелия коронарных артерий.

Материалы и методы

В качестве материала для проведения исследования использовали фрагменты коронарных артерий (правой и левой коронарной, левой огибающей, диагональной ветви, ветви тупого края), полученные посмертно в процессе вскрытия больных, страдавших и умерших от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), а также фрагменты неизмененных коронарных артерий лиц, умерших не от сердечных причин. Пациенты со злокачественными новообразованиями и сахарным диабетом исключались. Всего исследован материал от 24 умерших (21 – от ССЗ, 3 – не от ССЗ), из них 12 (50 %) – мужчин. Извлеченные сосуды нарезают кусочками размером 1 см, рассекают вдоль и помещают попарно в раствор Хенкса и 0,9 % раствор хлорида натрия, поскольку, согласно имеющимся литературным данным, именно в этих жидких средах морфология клеток остается стабильной на протяжении длительного времени наблюдения, в том числе и в ответ на сканирование и спектроскопию [2]. Заготовки делали из неизмененных участков сосуда, а также зон с липидными пятнами, бляшками, в том числе, с изъязвлением и атерокальцинозом. В течение 2 часов материал доставляли в лабораторию и микроскопировали. Использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver BIO NT-MDT, зонды с жесткостью 0,3 N/m, радиус закругления кончика

зонда составлял 50 нм. (способ сканирования в воздушной фазе в контактном, так и в полуконтактном режимах), интерферометр NewView 5010 и цифровой оптический микроскоп HIROX KH-7700 при увеличении x1400. Полученное изображение рельефа поверхности подвергали математической обработке с целью поиска характерных закономерностей.

Результаты и обсуждение

Предложенный способ заготовки материала не позволил нам получить его изображение в АСМ: длительное время экспозиции в воздушной среде приводило к пересыханию, деформации образца, что создавало помехи в работе кантилевера. Работа на интерферометре также сопровождалась непреодолимыми трудностями: свет проникал и рассеивался в толще сосуда, без достаточной задержки и отражения от изучаемой эндотелиальной поверхности, что не позволяло с достаточной точностью восстанавливать рельеф по получаемым интерференционным полосам. Данный метод позволяет «склеивать» изображения из разных участков с целью проведения компьютерной обработки большого числа данных. Однако, мы столкнулись с трудностью первичного получения изображения (из 24 образцов удалось получить только 5), в этой связи дальнейшая обработка оказалась нецелесообразной. На наш взгляд, способ изучения рельефа с использованием интерференционного микроскопа мало пригоден для нативного сосудистого материала. Значительно больше информации удалось получить при помощи цифрового оптического микроскопа. Нами обработаны данные трехмерного рельефа внутренней поверхности коронарных артерий на различных этапах атерогенеза: от неизменной картины до морфологического субстрата острого коронарного синдрома и финального атерокальциноза.

Эксперимент проходил в два этапа: первый – описательный, предполагает получение изображения и его визуальную характеристику; второй – поиск математических закономерностей, описывающих особенности рельефа в зависимости от морфологических изменений в стенке сосуда.

Наиболее типичная картина рельефа поверхности эндотелия коронарной артерии представлена на рисунке 1а–д: получаемое изображение позволяет анализировать поля зрения, охватывающие 2–3–5 соседних клеток, учитывая, что их размер колеблется от 20 до 50 мкм. На рис. 1а – относительно однородная поверхность без явных углублений и возвышений с единичными пористыми включениями. Отдельные более крупные понижения рельефа, на наш взгляд, скорее связаны с механическим повреждением материала в процессе его подготовки. Далее представлен четкий переход от неизменного рельефа к рельефу поверхности над липидным пятном, а также снимки интимы коронарной артерии над ним (рис. 1б). В зоне перехода, в первую очередь, обращает внимание значительное усиление

пористости поверхности, что может свидетельствовать о повышенной проницаемости таких участков и для молекул липопротеинов, и для иммунокомпетентных клеток, мигрирующих из кровотока. Сама структура рельефа визуально также отличается от описанной на рисунке 1а: определяется перепад высоты рельефа (зона пятна начинает возвышаться), складывается впечатление об увеличении плотности подлежащей ткани, ее неоднородности. Тем не менее, сохраняется возможность определения направленности, ориентированности морфологических элементов вдоль продольной оси сосуда.

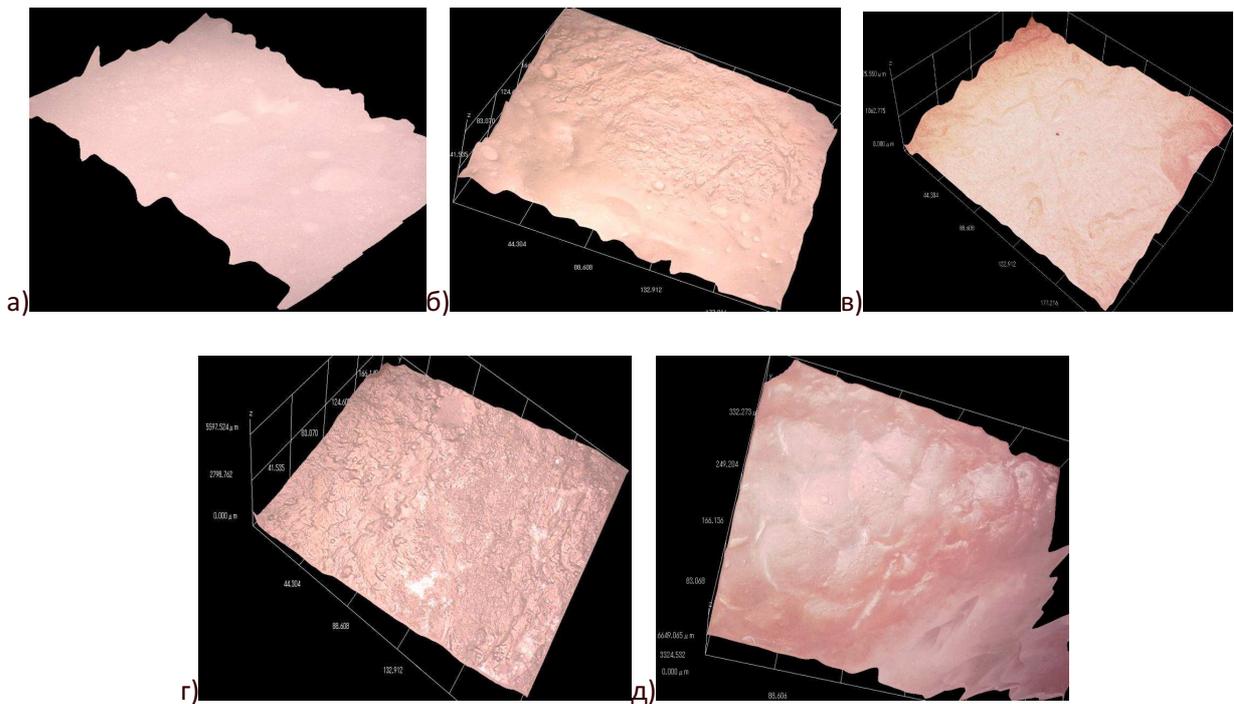


Рис. 1. Рельеф внутренней поверхности неизменной коронарной артерии (а), поверхности в зоне липидного пятна (б), в зоне атеросклеротической бляшки (в), в зоне обызвествленной атеросклеротической бляшки (г), в зоне кровоизлияния (д)

Представленные на рисунке 1 в данные, относящиеся к изучению рельефа поверхности над зрелой атеросклеротической бляшкой, в основном совпадают с картиной над липидным пятном и в отношении плотности ткани, и ее пористости, и неоднородности. Ориентированность рельефа вдоль продольной оси сосуда также сохранена.

Рисунок 1 г – изображение интимы над участками обызвествленной атеросклеротической бляшки: рельеф однозначно более грубый, неоднородный, не представляется возможным даже предположительное определение соседних эндотелиальных клеток, тем не менее, в отдельных зонах более четко, чем на ранних стадиях, прослеживается продольная ориентированность кальцификации вдоль оси сосуда. Зона кровоизлияния (рис.1 д), безусловно, имеет иную окраску, накопление крови в субэндотелиальном пространстве способствует выраженному возвышению этого участка над окружающей здоровой тканью. Рельеф, характерный для неповрежденной ткани, на наш взгляд, в этой зоне отсутствовал.

Поскольку визуальная характеристика изучаемых объектов не достаточна для сравнительного анализа степени выраженности структурных изменений интимы сосудов, на следующем этапе был предпринят поиск математических закономерностей, позволяющих описывать происходящую реструктуризацию эндотелиальной поверхности. Однако, посредством доступного математического обеспечения выявить статистически значимые отличия, даже при очевидном несовпадении полученных изображений, не удалось. На наш взгляд, это связано с недостаточно отработанной методикой заготовки материала для микроскопического исследования. Вероятно, качество получаемого изображения существенно зависит от влажности материала, времени экспозиции и ряда других причин, которые мы не смогли предусмотреть в работе, не имея четких методических рекомендаций.

Проблемы, связанные с процедурой приготовления препаратов для исследования с помощью АСМ, к сожалению, нередки. Во-первых, для получения устойчивых изображений необходимо правильно иммобилизовать клетки. При этом чем продолжительнее срок подготовки, тем более распластанными по подложке оказываются клетки и тем проще их исследовать, но вместе с тем происходит потеря особенностей строения поверхностной структуры. Во-вторых, при сканировании клетки легко деформируются и разрушаются, поэтому для увеличения их жесткости применяется фиксация, например, глутаровым альдегидом, что приводит к умеренной деформации поверхности и может исказить рельеф [1, 3]. Работ, посвященных изучению внутреннего рельефа сосудистой стенки, в частности, интактной и атеросклеротически измененной коронарной артерии, равно, как и рекомендаций по подготовке материала для исследования, в доступной литературе мы не встретили. Предложенная нами методика в перспективе требует доработки: на наш взгляд, это может быть отработка возможностей фиксации образцов, например, метанолом [2]. Альтернативным способом изучения «поведения» эндотелия могут быть эксперименты, выполняемые с заготовленной культурой эндотелиальных клеток, хранящихся в специальной питательной среде, однако, на наш взгляд, это тоже, в некоторой степени, должно исказить получаемый результат вследствие приближения постановки эксперимента к *in vitro*. Вместе с тем наблюдаемые эффекты иллюстрируют потенциальную информативность такого подхода, а, следовательно, открывают перспективу для расширения представлений о морфофункциональных особенностях и изменениях в эндотелии сосудов на разных этапах атерогенеза.

Выводы

1. Предложенная методика заготовки нативного материала с учетом его минимальной травматизации не обеспечила адекватную визуализацию поверхности с помощью атомной силовой и интерференционной микроскопии;

2. Цифровая оптическая микроскопия позволила получить качественное изображение эндотелиального рельефа и изучить его особенности, как на неизмененных, так и на пораженных атеросклерозом участках;

3. На небольшом объеме экспериментального материала не удалось выявить статистически значимые отличия, несмотря на очевидное несовпадение полученных изображений.

Список литературы

1. Никитина И. А., Стародубцева М. Н., Грицук А. И. Использование атомной силовой микроскопии для изучения тимоцитов крыс // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии, VIII Межд. семинар. – 2008. – С. 108–113.
2. Плескова С.Н. Морфо-физиологические аспекты гуморальных и клеточных механизмов неспецифической резистентности организма: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Н. Новгород, 2009. – 48 с.
3. Сорокина М.Ю. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов / М.Ю. Сорокина [и др.] // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 1. – С. 17–21.
4. Lee Y.J., Patel D., Park S. Local Rheology of Human Neutrophils Investigated Using Atomic Force Microscopy // Int J Biol Sci. – 2011. – 71. – P. 102–111.
5. Martinez-Lemus L.A.. Integrins and regulation of the microcirculation: from arterioles to molecular studies using atomic force microscopy / LA. Martinez-Lemus [et al.] // Microcirculation. – 2005. – Vol. 12, № 1. – P. 99–112.
6. Miyazaki H., Hayashi K. Atomic force microscopic measurement of the mechanical properties of intact endothelial cells in fresh arteries // Med Biol Eng Comput. – 1999. – 34 (4). – P. 530–536.

Рецензенты:

Орехова Е.Н., д.м.н., заместитель директора по кардиологии и инновационным технологиям ГБУЗ ПК «ПККБ № 2 Институт сердца», Филиала научного центра ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, Пермь.

Фрейнд Г.Г., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии с секционным курсом, Пермь.