

# Различные виды микроскопий в исследовании мезенхимальных стволовых клеток

<sup>1</sup>Кухаренко Л. В., <sup>2</sup>Шиммель Т., <sup>2</sup>Барщевский М., <sup>1</sup>Гольцев М. В.,  
<sup>3</sup>Шман Т.В., <sup>3</sup>Тарасова А.В.

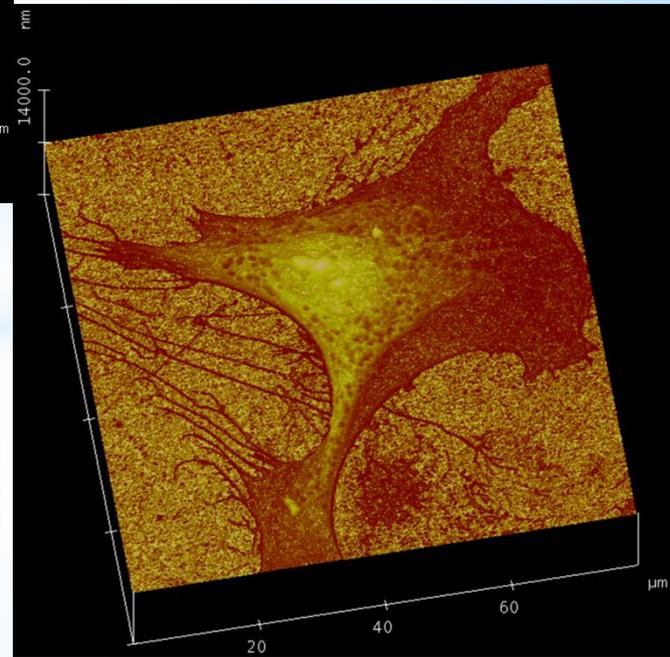
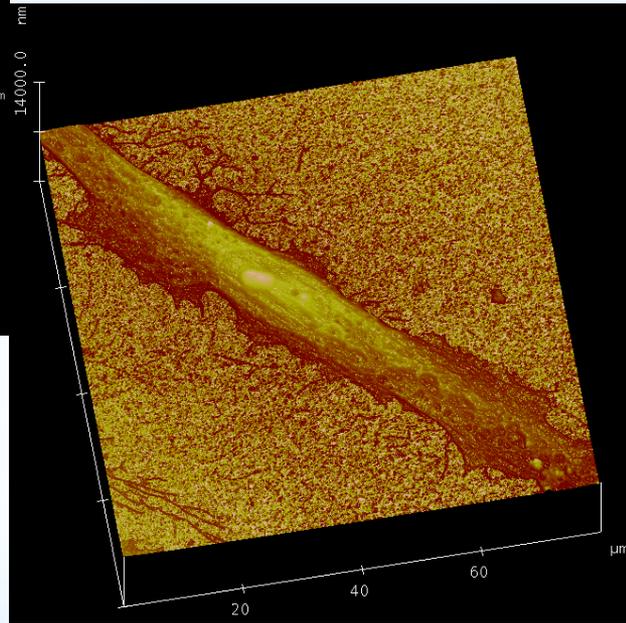
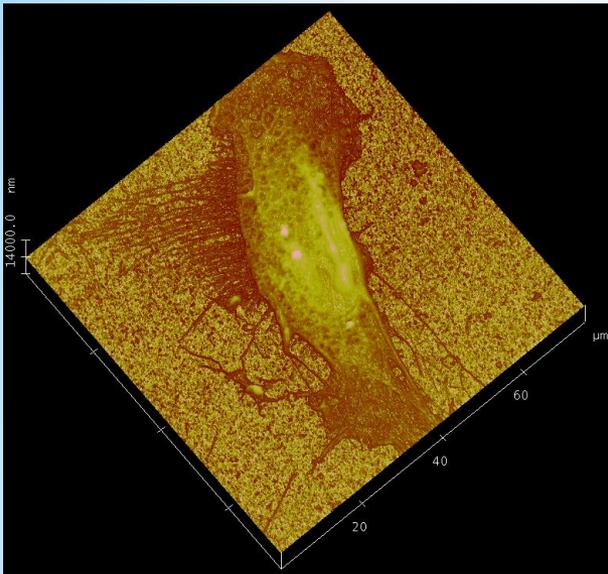
<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>Институт технологии Карлсруэ

<sup>3</sup>РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии

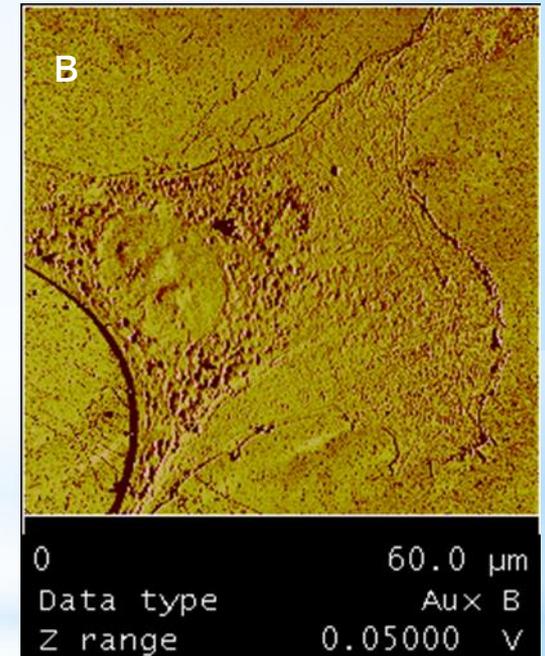
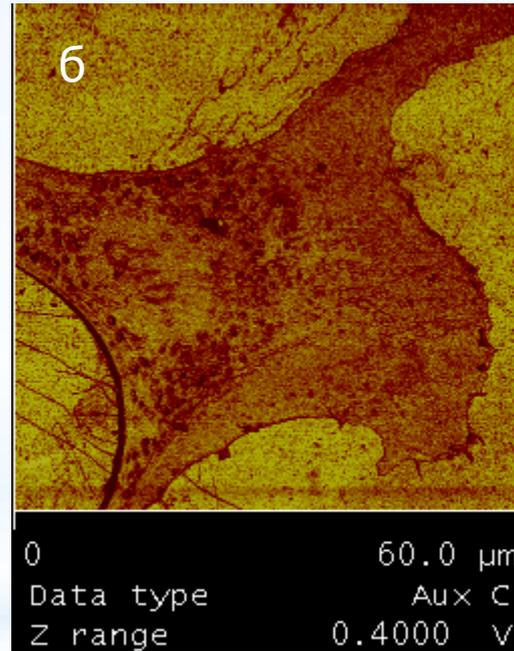
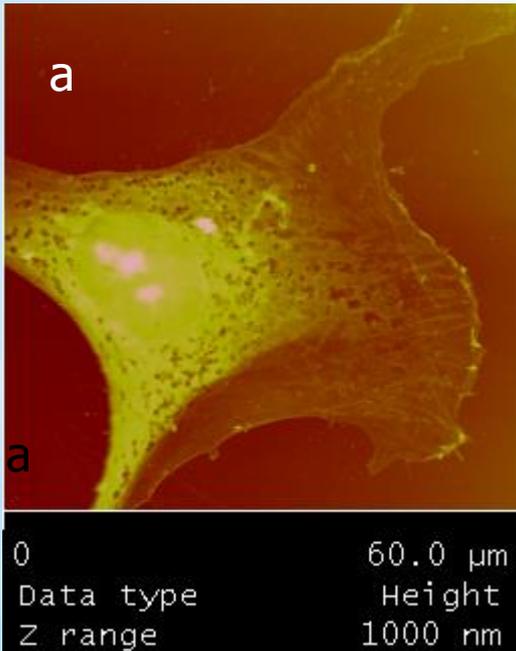
## ВВЕДЕНИЕ

Организация цитоскелета и локальные упруго-вязкие свойства цитоплазматической мембраны мезенхимальных стволовых клеток (МСК) были изучены с помощью флуоресцентной микроскопии и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Данная информация необходима для реализации многообещающего потенциала МСК для разработки новых методов лечения в регенеративной медицине, а также тканевой инженерии на их основе. Для исследования топографии поверхности мембраны МСК использовался атомно-силовой микроскоп Nanoscope (R) IIIa MultiMode. Для исследования упруго-вязких свойств мембраны МСК (локальной жесткости и адгезии) использовался метод модуляции силы АСМ. Для проведения АСМ-исследований МСК фиксировались 2% глутаровым альдегидом. Для исследования строения актинового цитоскелета и анализа системы микротрубочек проводили двойную иммунофлуоресцентную окраску МСК фаллоидином (Alexa Fluor 633-Phalloidin) и антителами к  $\alpha$ -тубулину (Alexa Fluor 488 anti- $\alpha$ -tubulin).

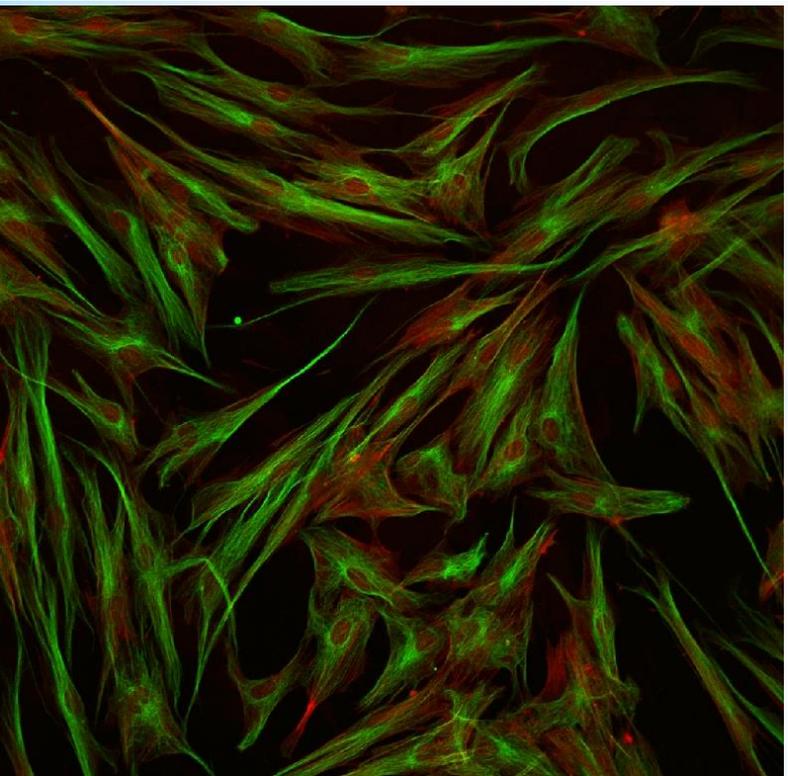
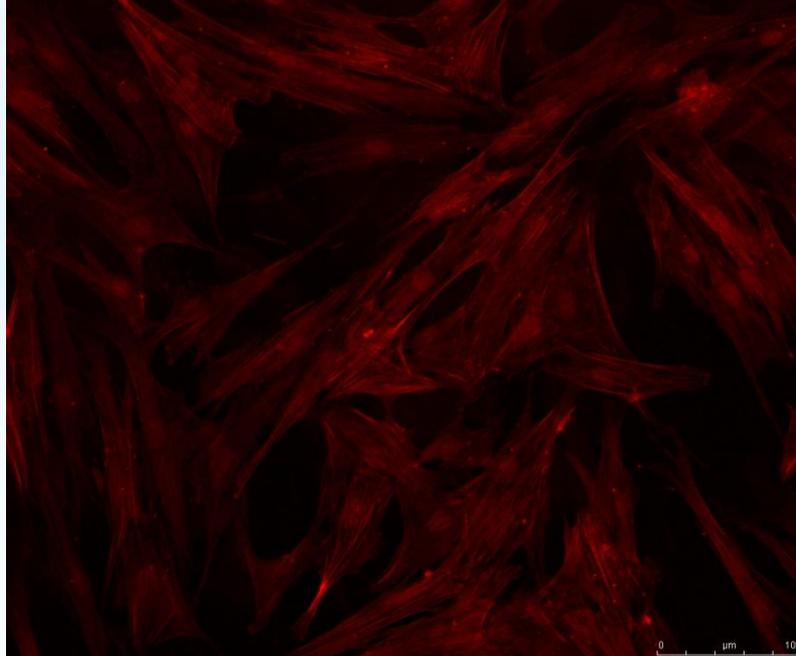
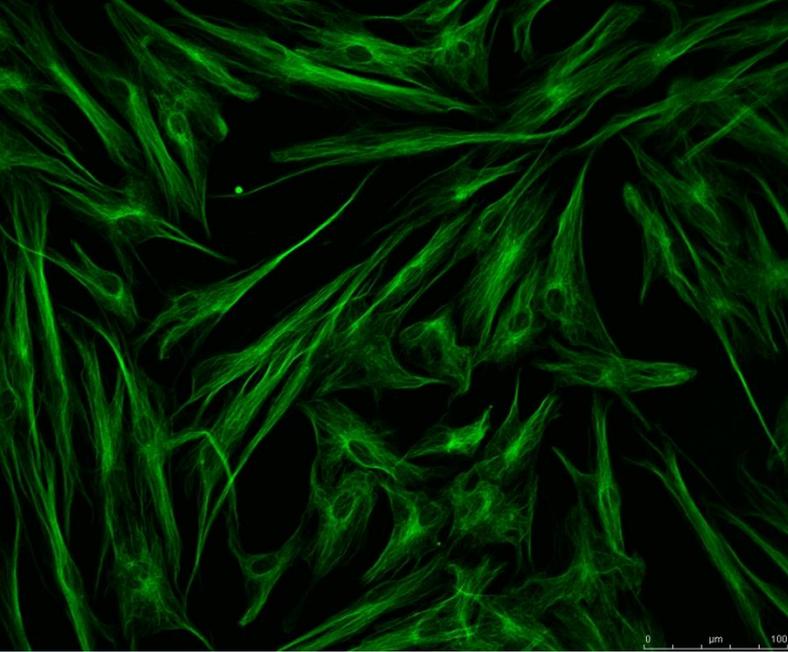


АСМ-изображения МСК, окно сканирования  
80x80 мкм<sup>2</sup>.

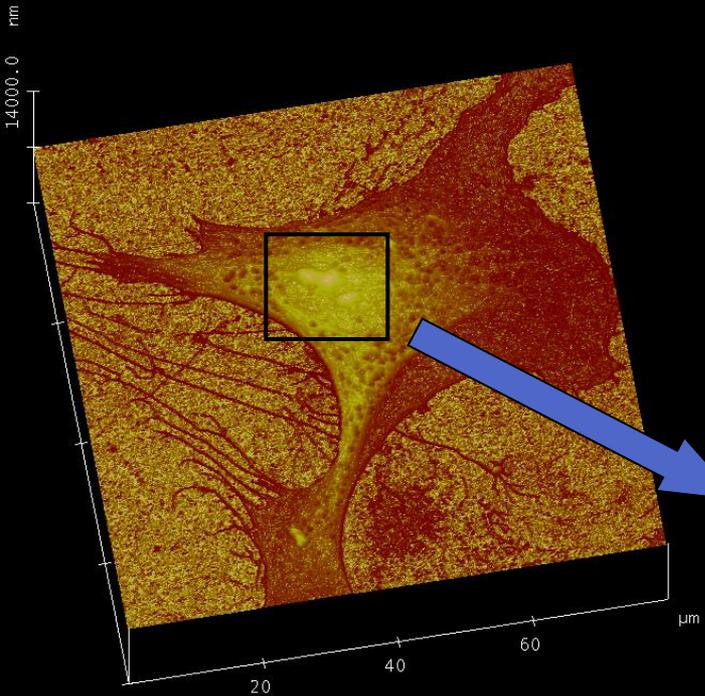
Возможности АСМ могут быть расширены за счет использования метода модуляции силы, который позволяет получать информацию об относительной разнице в эластичности поверхности клеток с разрешением в нанометровом масштабе. Метод модуляции силы позволяет количественно отображать механические свойства поверхности мембраны МСК, такие как адгезия и жесткость, одновременно с отображением топографии поверхности клеток.



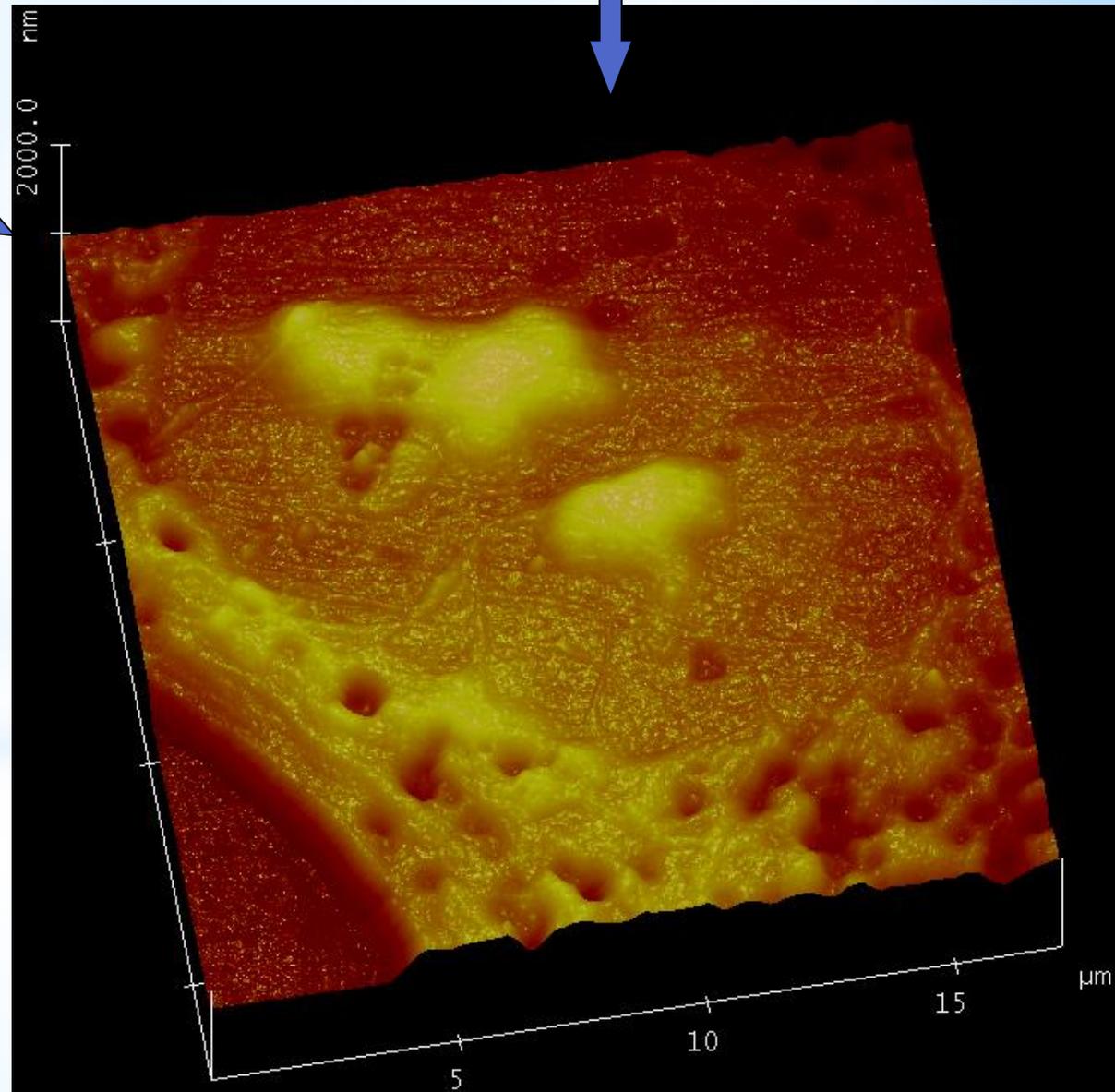
АСМ-изображения МСК: а - топография, б - адгезия, в - жесткость. Более темные участки на изображении адгезии соответствуют низкому ее значению. Более темные участки на изображении жесткости соответствуют низкому ее значению.

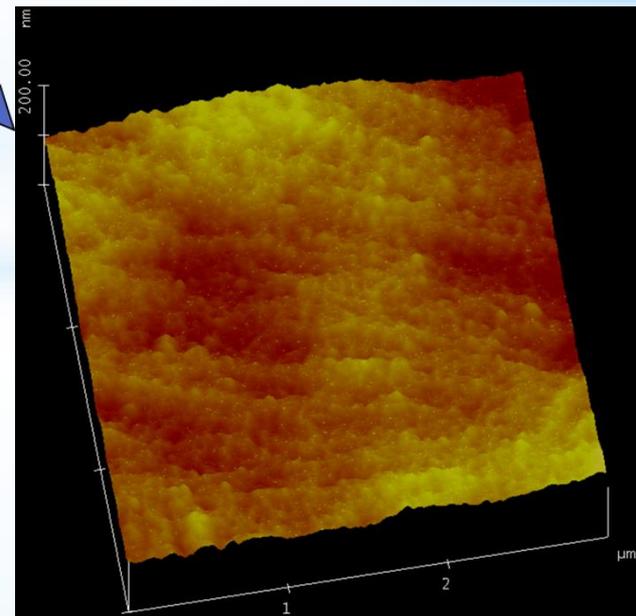
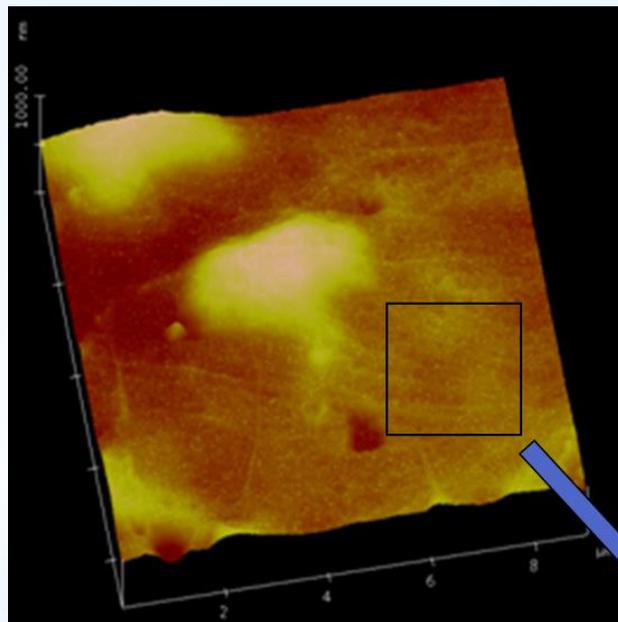
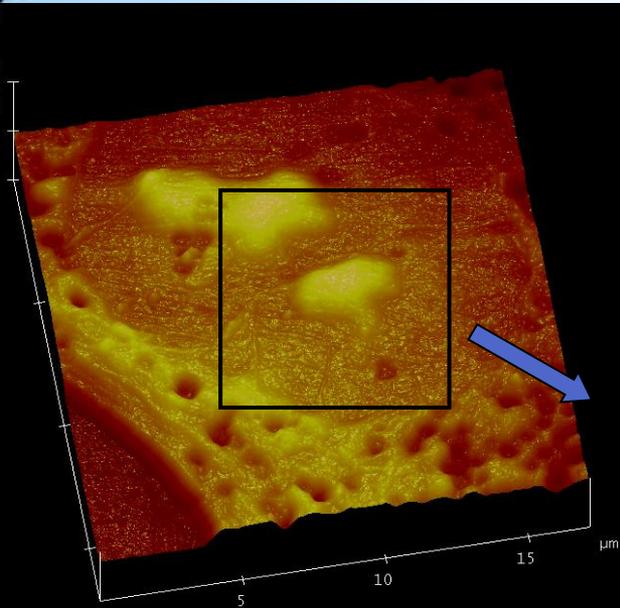


Для исследования строения актинового цитоскелета и анализа системы микротрубочек проводили двойную иммунофлуоресцентную окраску МСК фаллоидином (Alexa Fluor 633-Phalloidin) и антителами к  $\alpha$ -тубулину (Alexa Fluor 488 anti- $\alpha$ -tubulin). Микрофиламенты имеют линейную форму и в основном локализованы над ядром. Микротрубочки образуют радиальную сеть, охватывают большие участки цитоплазмы и часто имеют искривленную форму.

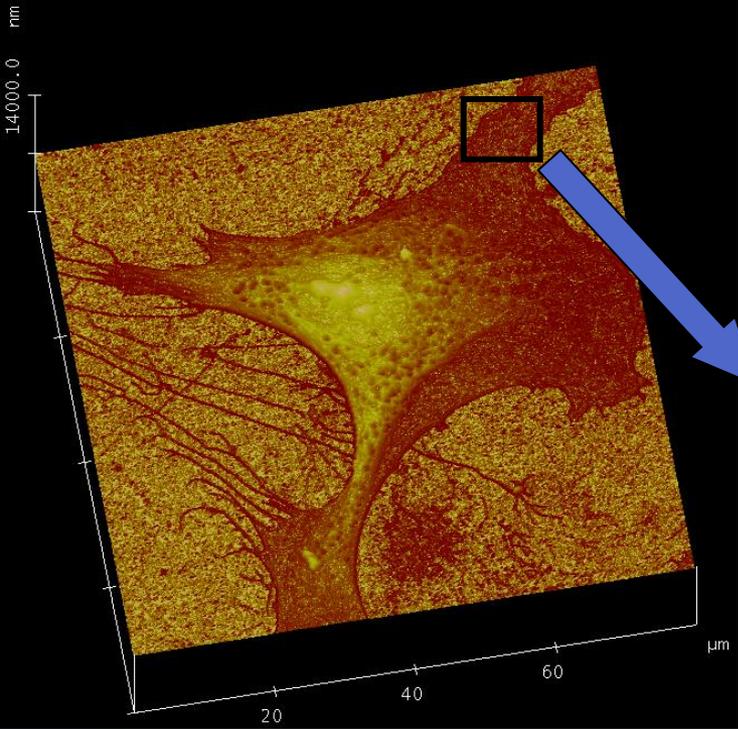


АСМ-изображение области ядра МСК  
при окне сканирования 17x17 мкм<sup>2</sup>.

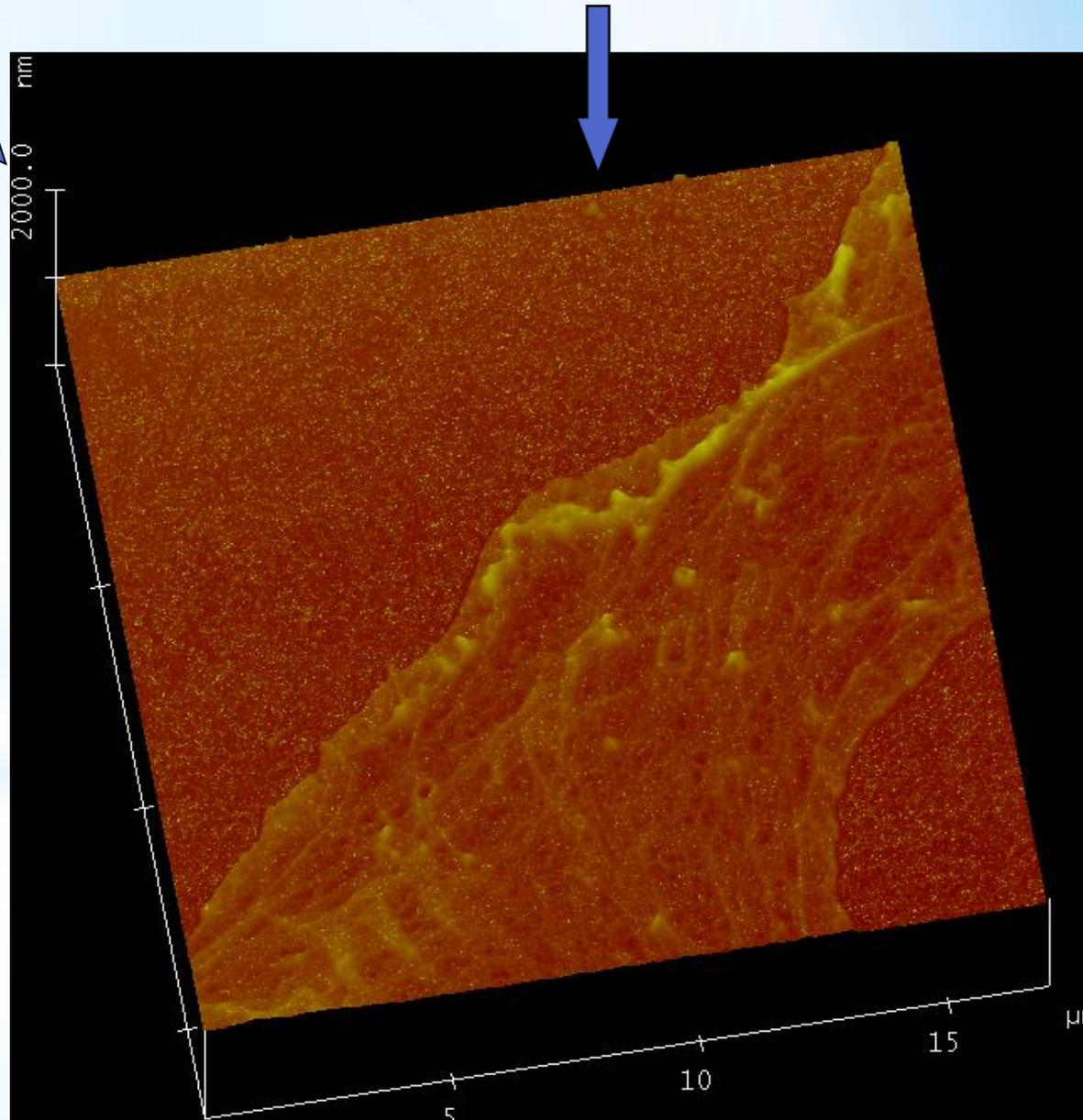


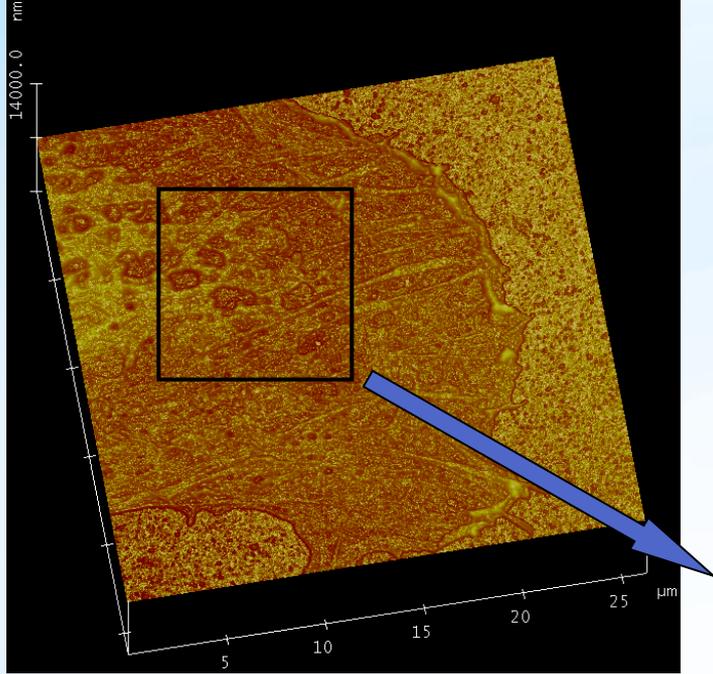


При уменьшении окна сканирования над ядром МСК визуализируется зернистая структура удлинённых пучков актиновых волокон с размером гранул от 20 до 100 нм. АСМ-изображения демонстрируют множество параллельных пучков актина, простирающихся по всей ядерной области. Область вокруг ядра выглядит как сетка из параллельных пучков актиновых волокон.

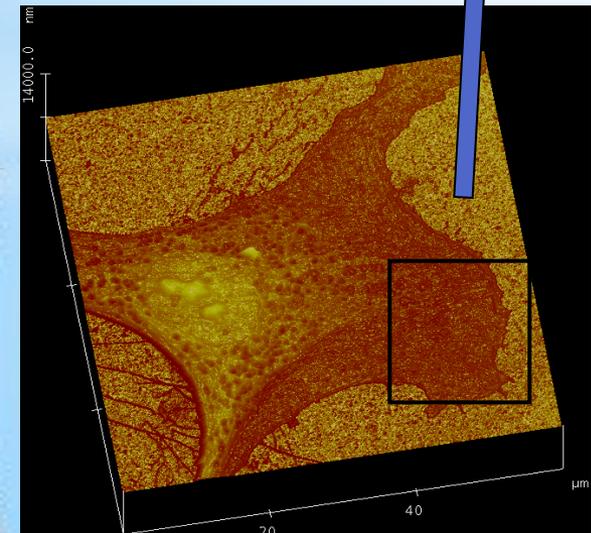
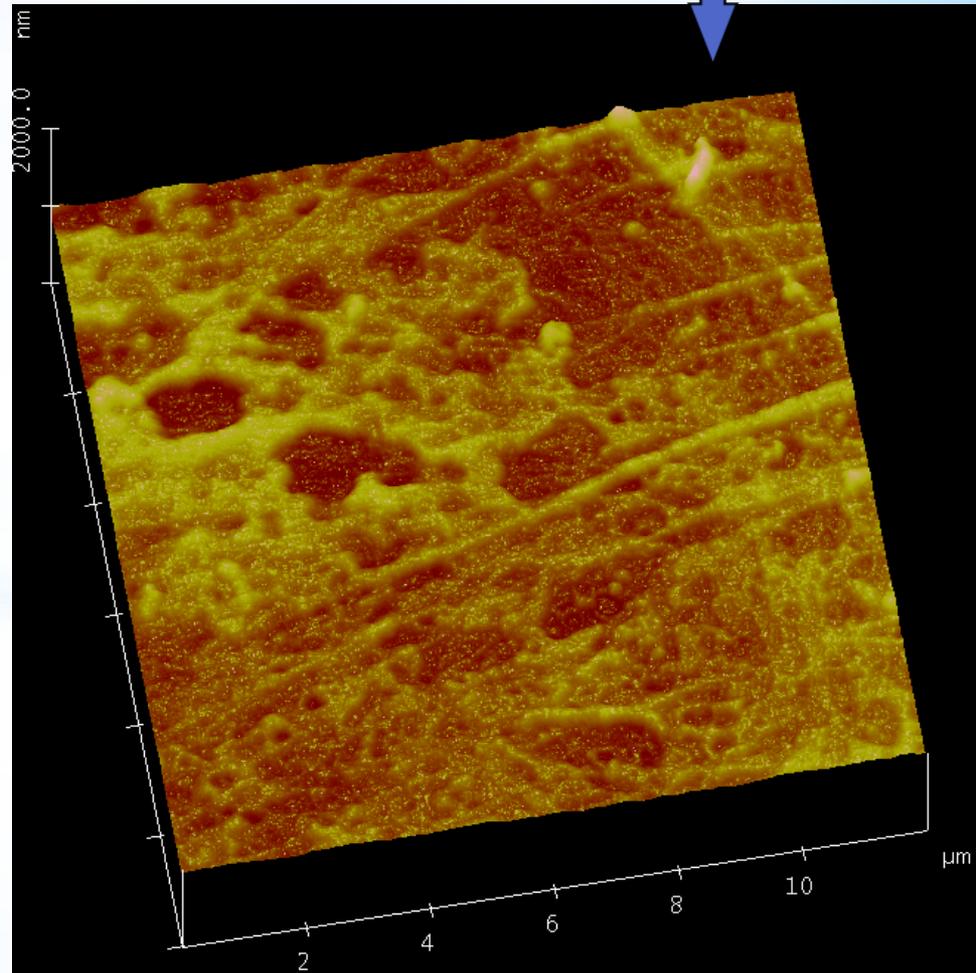


АСМ-изображение области ламеллиподия  
МСК при окне сканирования 17x17  $\mu\text{m}^2$ .





При уменьшении окна сканирования над ламеллиподием МСК визуализируется ортогонально соединенная актиновая сеть.



## ВЫВОДЫ

- ❑ Метод модуляции силы АСМ в сочетании с флуоресцентной микроскопией открывает новые возможности для исследования связи упруго-вязких свойств мембраны МСК с организацией цитоскелета.
- ❑ Для проведения АСМ-исследований МСК была разработана методика их иммобилизации в различных экспериментальных условиях для изучения морфологии и вязко-упругих свойств плазмолеммы.
- ❑ С помощью АСМ определено, что высота МСК над ядром колеблется от 400 нм до 1 мкм, а толщина ламеллиподий изменяется от 150 до 340 нм. Ламеллиподии содержат ортогонально соединенные сети актина на периферии МСК. Размер гранул актиновых волокон над ядром варьирует от 20 до 100 нм.
- ❑ Контраст адгезионных сил на АСМ-изображениях показал, что ядро обладает большей адгезией и меньшей жесткостью по сравнению ламеллиподием .