УДК 539.25.086:616-006-018.1-072.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Е.С. Дрозд[1], С.А. Чижик[1], О.В. Квитко[2], И.И. Конева[2], Я.И. Шейко[2]

[1] Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси, ул. П. Бровки 15, Минск, Беларусь

[2] Институт цитологии и генетики НАН Беларуси, ул. Сурганова, 1/1, Минск, Беларусь

Введение

В настоящее время все больше внимания уделяется исследованию биологических объектов методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Методы АСМ применяются в прикладной вирусологии для исследования взаимодействий вирус – клетка, в микробиологии для идентификации бактерий, в цитологии для исследования различных клеток, а также ДНК, РНК, различных тканей и даже органов [1–3].

Изменение структурных и механических свойств клетки может приводить к возникновению и развитию некоторых заболеваний, например рака [4]. Поэтому изучение структурно-механических свойств мембран клеток позволит в будущем отличать больную клетку от здоровой.

В опухолевых клетках нарушена регуляция клеточного деления, что обусловливает их неудержимое размножение. Способность опухолевых клеток беспредельно размножаться передается в клеточных поколениях и проявляется не только в организме, но и в культуре опухолевой ткани, а также при трансплантации опухоли. Опухолевая ткань отличается от исходной ткани, из которой она произошла, по структуре, биохимическим, физико-химическим и другим признакам. Так, например, значительные изменения в опухолевых клетках претерпевает цитоскелет и входящие в него микротрубочки [5]. Тот факт, что при таком заболевании, как рак, изменяются механические свойства клеток, может потенциально служить в качестве биомаркера для выявления опухолевых клеток и оценки эффективности медикаментозной терапии.

С целью выявления особенностей строения мембраны опухолевых клеток проведено исследование структуры поверхности данных клеток, а также выполнена количественная оценка упругих свойств мембран.

Объекты и методы исследования

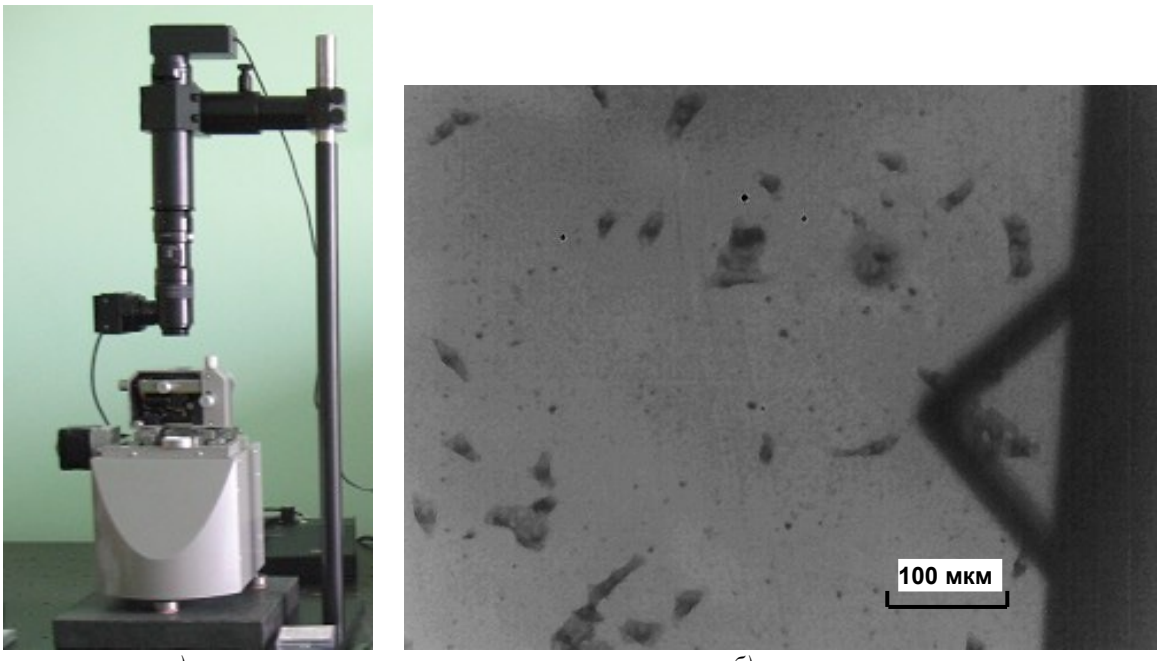
В работе использованы культивируемые in vitro клетки рака легкого (линия А549), полученные из Института цитологии и генетики НАН Беларуси. Для исследования опухолевых клеток методом АСМ культивируемые in vitro клетки снимали с ростовой поверхности культурального сосуда с помощью трипсина и суспендировали в среде «Игла» с добавлением 10 %-й сыворотки эмбрионов телят и антибиотиков – пенициллина и стрептомицина. Концентрацию клеток подсчитывали под микроскопом в камере Горяева. Клеточную суспензию разбавляли средой таким образом, чтобы при внесении в культуральный сосуд приходилось 1000 клеток на 1 см^2 ростовой поверхности. Клетки вносили в пластиковые чашки Петри с вложенными предметными стеклами и культивировали при 37 ^{o}C в CO_2-инкубаторе (5 % CO_2, влажность воздуха 95 %). После двух суток культивирования, когда большая часть клеток распластывалась на поверх-

ности предметных стекол, клетки фиксировали в восходящих концентрациях этанола (24, 48 и 96 % по 1 мин в каждой) и высушивали на воздухе.

Исследование опухолевых клеток осуществлялось при помощи специального экспериментального комплекса, совмещающего функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии (рис. 1, *а*), с использованием стандартных кремниевых зондов NSC11 («MikroMasch») в статическом режиме. Данный комплекс состоит из атомно-силового микроскопа NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) и оптической системы (БелОМО «ЛЭМТ», Беларусь). Данная система дает возможность осуществлять позиционирование острия иглы на определенной области исследуемого образца, а в данном случае – на клетке и даже на ее определенной области.

Результаты исследования

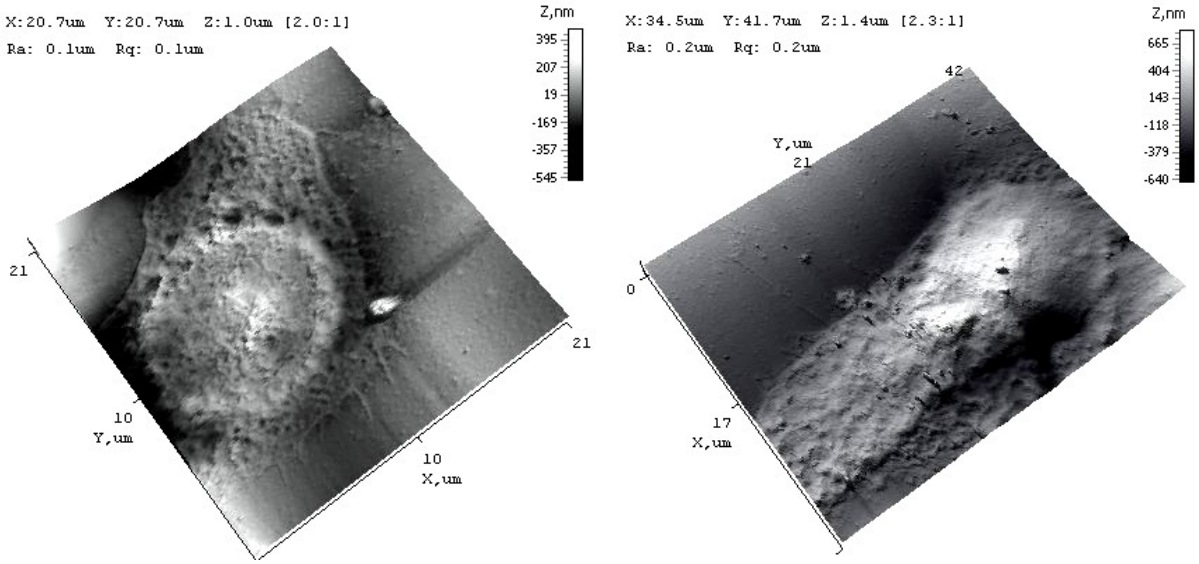
Изображения, полученные с помощью оптической системы, свидетельствуют о том, что в представленном образце опухолевые клетки отличаются как по форме, так и по размеру (рис. 1, *б*). С целью классификации клеток по форме были выделены два основных типа клеток: круглые и веретеновидные. Круглыми считаются клетки, у которых соотношения большего и меньшего диаметров меньше 0,5. В связи с этим необходимо уточнить, что форма клетки изменяется в процессе ее перемещения по ростовому субстрату [6]. Поэтому фактически исследовали не разные клеточные субпопуляции, а группы клеток, временно пребывающие в данной форме.



а) *б)*

Рис. 1. Экспериментальный комплекс, совмещающий функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии (*а*) и изображение опухолевых клеток, полученное при помощи оптической системы (*б*)

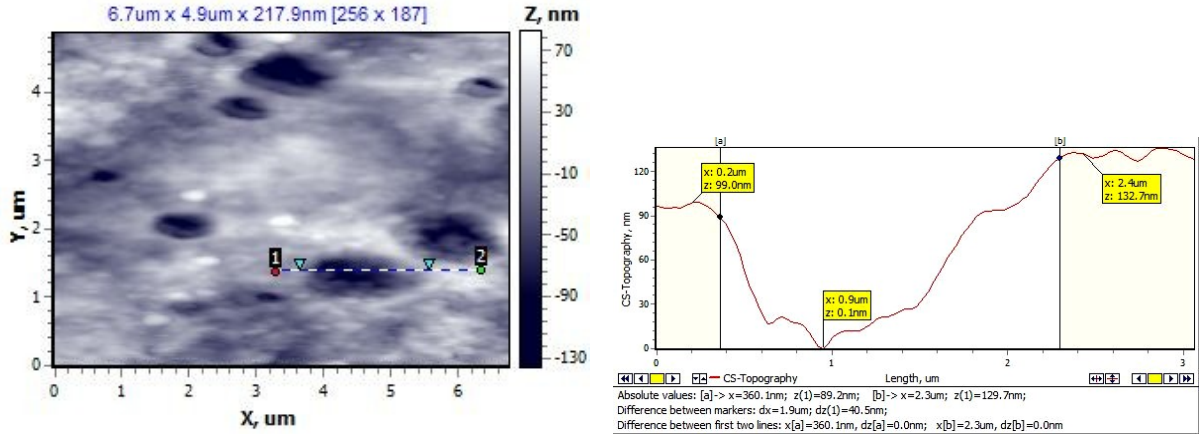
Получены изображения топографии поверхности мембран опухолевых клеток различной формы (рис. 2).



а) *б)*

Рис. 2. АСМ-изображение круглой опухолевой клетки, область сканирования 21x21 мкм (*а*), АСМ-изображение веретеновидной опухолевой клетки, область сканирования 42x34 мкм (*б*)

При уменьшении поля сканирования на поверхности мембраны были обнаружены поры (рис. 3), биологическая роль которых может заключаться в регуляции проницаемости клеточной мембраны. Проведена оценка диаметра и глубины выявленных пор.



а) *б)*

Рис. 3. Изображение поверхности опухолевой клетки: *а)* АСМ-изображение топографии поверхности опухолевой клетки, поле сканирования 5x7 мкм; *б)* профиль поперечного сечения поверхности мембраны

Поскольку клетки были разделены на две группы в зависимости от формы, оценка диаметра и глубины пор производилась для каждой группы в отдельности. Результаты этих исследований представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, среднее значение диаметра пор составило 590,61±49,56 нм, а средняя глубина – 74,65±12,34 нм (средний размер клеток линии А549 приблизительно 19,5x28,5 мкм). При сравнении клеток различной формы установлено, что диаметр и глубина у веретеновидных и круглых клеток достоверно не различаются.

Таблица 1

Оценка размера пор, выявленных при сканировании мембран клеток рака легкого в статическом режиме (X ± Sx)

Форма клетки	Число клеток	Диаметр клетки		Поры		
		D_2 (меньший), мкм	D_2 (больший), мкм	число пор в клетке	диаметр, нм	глубина, нм
По всем клеткам	11	19,51±6,36	28,51±4,95	15,45±2,66	590,61±49,56	74,65±12,34
Круглые	6	17,51±1,53	29,52±2,29	19,17±4,09	541,17±48,68	73,47±9,17
Веретеновидные	5	19,41±1,15	42,43±1,19*	10,41±2,25	626,87±87,77	77,34±26,69

Примечание. Различия достоверны по отношению к группе круглых клеток при уровне значимости * $p < 0,001$

Проведено исследование упругих свойств мембран опухолевых клеток методом силовой спектроскопии. Для расчета модуля Юнга использовалась модель Герца. На рис. 4 показан график зависимости модуля Юнга от глубины внедрения зонда. Представлялось целесообразным оценить упругость мембраны в различных частях клетки: в области ядра и на периферии.

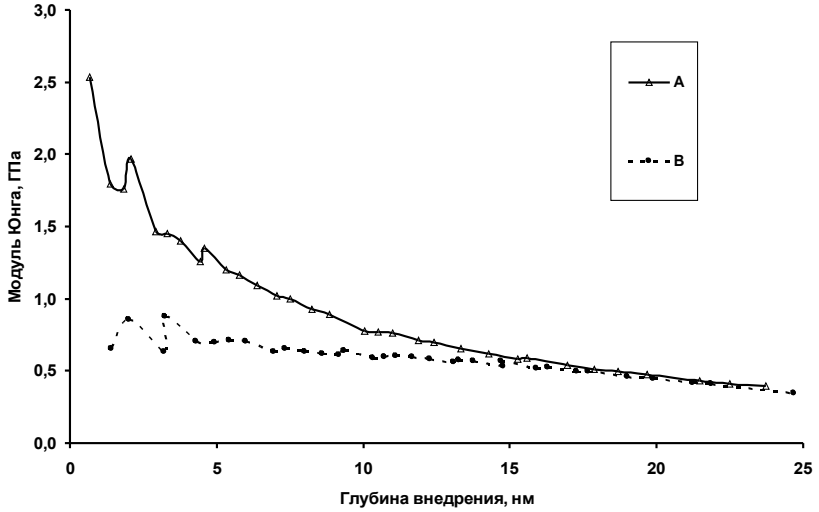


Рис. 4. График зависимости модуля Юнга от глубины внедрения зонда:
A – безъядерная часть клетки; B – центральная часть клетки над ядром

Результаты исследования показали, что на малых глубинах внедрения значения модуля Юнга в безъядерной области клетки больше, чем над ядром. Возможно, в пределах тонкой периферической зоны клетки сказывается влияние твердой подложки. В этом случае для достоверной оценки упругих свойств мембраны следует при интерпретации экспериментальных результатов использовать более сложные модели контактной механики, характеризующие деформирование слоистых систем.

Следует также отметить, что при глубине внедрения более чем 20 нм достоверных различий между модулем упругости в различных областях клетки не выявлено.

Выводы

В результате проведенного исследования установлено, что на поверхности мембраны присутствуют поры, причем их диаметр не зависит от формы опухолевой клетки. Это позволяет в дальнейших исследованиях не разделять на фракции популяцию клеток по форме при изучении параметров пор. Показано, что при малых глубинах внедрения зонда значения модуля Юнга больше в безъядерной области клетки по сравнению с областью над ядром.

Предполагается проведение дальнейших исследований мембранных пор и вязкоупругих свойств клеточных мембран опухолевых клеток.

Работа частично финансировалась в рамках ГКПНИ «Нанотех», задание 1.04.

Литература

1. Kasas S., Thomson N. H., Smith B. L., Hansma P. K., Miklossy J., Hansma H. G. Biological Applications of the AFM: From Single Molecules to Organs. John Wiley & Sons, Inc. 1997. Vol. 8. Pp. 151–161.
2. Ohta Y., Okamoto H., Okuda T., Horiuchi T. The atomic force microscope: a new tool for artificial organ research. J. Artif Organs. 1999. Vol. 2. Pp. 131–134.
3. Radmacher M. Studying the Mechanics of Cellular Processes by Atomic Force Microscopy // Methods in cell biology. 2007. Vol. 83. Pp. 91–189.
4. Lee G.Y.H., Lim C.T. Biomechanics approaches to studying human diseases // Trends Biotechnol. 2007. Vol. 25 (3). Pp. 111–118.
5. Патологическая физиология: Учеб. для студентов мед. вузов / Н.Н. Зайко, Ю.В. Быць, А.В. Атаман и др.; Под ред. Н.Н. Зайко и Ю.В. Быця. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2002. 644 с.
6. Шейко Я.И., Квитко О.В., Конева И.И., Тюриков А.П. Анализ пролифирации и дифференцировки нормальных (стареющих) фибробластов человека и мыши с помощью прижизненной видеомикроскопии // Докл. НАН Б. 2002. Т. 46 (1). С. 90–94.