

МИКРОМЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОВЕРХНОСТИ ДЕГИДРАТИРОВАННЫХ КЛЕТОК КАК МАРКЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ НОРМЫ И ПАТОЛОГИИ

Стародубцева М. Н. *, Черенкевич С. Н. †

* Гомельский государственный медицинский университет
ул. Ланге, 5, 246000 г. Гомель, Республика Беларусь
marysta@mail.ru

† Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, 220030 г. Минск, Республика Беларусь
cherenkevich@bsu.by

Введение. Атомно-силовая (зондовая) микроскопия (АСМ) с ее многочисленными опциями является уникальным средством для изучения структуры и механических свойств поверхностей тел различной природы, в том числе биологических клеток. Микро- и наномасштабный характер получаемых с помощью атомно-силового микроскопа изображений (механических образов) поверхности является наиболее востребованным при исследовании клеток. В контактном режиме для анализа механических свойств поверхности образца используют опцию записи карт латеральных сил и опцию силовая спектроскопия. Опция латеральных сил (*torsion*) позволяет оценить не только средние значения и отклонения от средних значений механических (фрикционных) характеристик поверхности биологических клеток, но и картографировать их распределение по исследуемой поверхности. Размеры участков сканирования обычно выбираются в диапазоне от $0,5 \times 0,5$ мкм² до 5×5 мкм². Основными механическими характеристиками поверхности клеток при этом являются: средняя сила трения ($F_{тр}$) и отклонение от среднего значения сил трения ($R_{qтр}$), а также фрактальная размерность механического образа участка поверхности клетки (D_f). Опция силовой спектроскопии позволяет получать данные об упругих характеристиках поверхностного слоя клеток (например, определить кажущийся локальный модуль упругости, E), а также адгезионных характеристиках клетки (сила адгезии, F_a). Таким образом, с помощью АСМ можно охарактеризовать механические свойства поверхности биологической клетки ансамблем минимум из пяти характеристик: $F_{тр}$, $R_{qтр}$, D_f , E , F_a . Три характеристики, а именно локальный модуль упругости (E), средние силы трения ($F_{тр}$) и адгезии (F_a), характеризуют усредненные механические свойства поверхности на участке микронного масштаба, а две другие характеристики, то есть отклонения от средних значений сил трения ($R_{qтр}$) и фрактальная размерность (D_f) образа латеральных сил участка поверхности, характеризуют распределение механических свойств по участку поверхности. Нативные клетки, как правило, являются высокочувствительными к механическому воздействию, включая контакт с острием АСМ-зонда радиусом около 10–60 нм. На механический стресс клетка отвечает целым каскадом событий, ведущих, в том числе, к ее гибели (например, вследствие лизиса). В связи с этим для работы с биологическими клетками часто используется полуконтактный режим (*tapping mode*) АСМ. Контактный режим АСМ может быть с успехом использован, ес-

ли клетку предварительно подвергнуть химической фиксации (например, с помощью глутарового альдегида) или/и частичной дегидратации. В случае дегидратированных клеток обоснованной является относительная оценка механических свойств клеток (патологических или после воздействия ряда факторов) в сравнении со свойствами контрольных клеток.

Целью исследования являлась оценка эффективности использования ансамбля характеристик, получаемых с помощью АСМ в контактном режиме, для комплексного анализа механических свойств поверхности дегидратированных клеток млекопитающих.

Материалы и методы. В работе проведен анализ полученных с помощью АСМ данных для эритроцитов, нейтрофилов и фибробластов человека, а также тимоцитов крысы. Образцы клеток для АСМ-исследования готовили тремя способами: (1) наносили на специально подготовленные пластины и высушивали при комнатной температуре, (2) фиксировали глутаровым альдегидом (0,5–1,0)%, наносили на пластины и высушивали, (3) наносили на пластины и подвергали дегидратации с помощью растворов спирта разной концентрации. АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашины», Беларусь) в контактном режиме с использованием игл-зондов марки CSC38 («MicroMash»). Для оценки АСМ-характеристик ($F_{тр}$, $R_{qтр}$, D_f) проводили сканирование участков поверхности клетки в контактном режиме при температуре 15–25 °С; при близкой к физиологической температуре 35–45 °С, и в широком диапазоне температур (15–90°С) с использованием минитермоплатформы ТТ-01. Для оценки АСМ-характеристик (E , F_a) осуществляли запись кривой подвода-отвода острия АСМ-зонда относительно поверхности клетки. Расчет характеристик проводили с помощью программы «SurfaceXplorer».

Результаты и обсуждение. Клеточная поверхность, точнее поверхностный слой клетки, свойства которого можно исследовать с помощью АСМ-методов, представляет собой слоистый композитный материал, состоящий из трех основных слоев: внешний слой – гликокаликс; плазматическая мембрана и внутренний слой, содержащий кортикальный цитоскелет. Установлено, что основной вклад в определяемые АСМ-методом механические характеристики дегидратированных клеток вносит изменение свойств кортикального цитоскелета (двумерной актин-спектриновой сети у эритроцитов и трехмерной дендритоподобной актиновой структуры у лейкоцитов и фибробластов). Полученные данные показывают статистически значимые различия в АСМ-характеристиках для клеток, обработанных (опытная выборка) и необработанных (контрольная выборка) различными веществами, изменяющими функциональное состояние клеток, включая функциональное состояние цитоскелета (пероксинитрит, цитохалазин, лидокаин), а также для клеток в норме и при различных патологических состояниях организма (сахарный диабет, онкология, старение, инфекционные заболевания). Установлено, что при температурах, превышающих физиологические значения, АСМ-характеристики поверхности дегидратированных клеток существенно зависят от температуры экспе-

римента [1]. Показано, что целесообразно проводить либо сравнение значений АСМ-характеристик для клеток в различных функциональных состояниях в достаточно узких диапазонах температур (комнатных или физиологических), где АСМ-характеристики существенно не меняются с температурой, либо проводить сравнение изменения значений характеристик с температурой в широком диапазоне температур: от 25–30°C до 80–85°C. Исследования показали, что сложный характер изменений структуры кортикального цитоскелета клеток при развитии патологического состояния клеток или целого организма, целесообразно оценивать, используя не одну или две АСМ-характеристики, как, например, в случае механического маркера раковых клеток предлагается использовать только локальный модуль упругости (E) [2], а несколько (ансамбль) характеристик ($F_{тр}$, $R_{qтр}$, D_f , E , F_a). Так, анализ зависимостей АСМ-характеристик от концентрации агента, изменяющего структуру клеточного композита, (например, пероксинитрита) показывает различную чувствительность параметров к концентрации агента.

Таким образом, атомно-силовая (зондовая) микроскопия является информативным современным методом исследования свойств поверхностного слоя (оболочек) биологических клеток, а также их изменений, связанных с патологическими процессами и воздействием в экспериментальных целях различных физических и химических факторов. Она позволяет получать набор механических характеристик, с помощью которого возможно объективно оценивать свойства биологических клеток и значения которых можно рассматривать в качестве маркеров клеточной нормы или патологии.

Литература

1. Starodubtseva M. N., Yegorenkov N. I., Nikitina I. A. *Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy* // Micron. – 2012. – Vol. 43, No. 12. – P. 1232 – 1238.
2. Lekka M., Pogoda K., Gostek Ju., Klymenko O., Prauzner-Bechcicki Sz., Wiltowska-Zuber Jo., Jaczewska Ju., Lekki Ja., Stachura Z. *Cancer cell recognition – mechanical phenotype* // Micron. – 2012. – V. 43, No. 12. – P. 1259 – 1266.

ПЛЕНОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ ПОКРЫТИЯ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИМПЛАНТАТОВ ОТ МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ

Тапальский Д. В. *, Осипов В. А. *, Сухая Г. Н. *, Ярмоленко М. А. †,
Рогачев А. А. †, Рогачев А. В. †, Круль Л. П. ††

* Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь
tapalskiy@gmail.com

† Гомельский государственный университет им. Ф.Скорины, Гомель, Беларусь
†† Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Введение. Бактериальные инфекции являются серьезными осложнениями при использовании имплантатов в травматологии и ортопедии. Один из вариантов решения проблемы является нанесение на поверхности имплантатов антибактериальных покрытий, препятствующих адгезии бактерий и формированию микробных биопленок в месте имплантации и сохраняющих свой антибак-