

РАДИОЭЛЕКТРОНИКА И ПРИБОРОСТРОЕНИЕ

УДК 539.25.086:57.08 577.352.3

*Н. С. КУЖЕЛЬ¹, Е. Э. КОНСТАНТИНОВА¹, С. А. ЧИЖИК¹,
НГУЕН ТИ МАЙ ХУОНГ², НГУЕН ТРОНГ ТИН²*

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

*¹Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: ekonst65@mail.ru,*

*²Институт прикладной физики и научных приборов Вьетнамской академии наук и технологий,
Ханой, Вьетнам, e-mail: nttinh@iapsi.vast.vn*

Представлен обзор литературных данных по применению метода атомно-силовой микроскопии для изучения биологических объектов. Показаны преимущества метода по сравнению с другими видами микроскопии. Описаны достижения в этой области, рассмотрены проблемы, возникающие при работе с биологическими клетками.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, биологические клетки, силовая спектроскопия, упругие свойства, адгезия.

N. S. KUZHAL¹, E. E. KONSTANTINOVA¹, S. A. CHIZHIK¹, NGUYEN THI MAY HUONG², NGUYEN TRONG TINH²

ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF BIOLOGICAL SUBJECTS

*¹A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: ekonst65@mail.ru,*

*²Institute of Applied Physics & Scientific Instrument, VAST, Hanoi, Vietnam,
e-mail: nttinh@iapsi.vast.vn*

A review of references on application of the atomic force microscopy for biological subjects' investigation is submitted. Advantages of this method in comparison with other types of microscopy are shown. Achievements in this area and the problems arising during the work with biological cells are described.

Keywords: atomic force microscopy, biological cells, force microscopy, elastic properties, adhesion.

Введение. Как показывают результаты проведенных к настоящему времени исследований в области атомно-силовой микроскопии (АСМ) биологических объектов, изучение живых клеток представляет наибольший интерес и является наиболее перспективным. В данной работе представлен обзор основных задач, которые стоят перед исследователями в области изучения живых биологических клеток с использованием АСМ, способы их решения, а также перспективы развития методов АСМ.

Один из самых распространенных подходов к изучению свойств клеток – их визуализация с помощью различных видов микроскопии, которые позволяют оценить размеры клеток, их морфологию, подвижность, поверхностные структуры. Однако каждый метод микроскопии имеет свои ограничения. Оптическая микроскопия остается основным методом исследования в биологии клеток. Это связано с тем, что главные методические приемы для исследования биологических объектов тщательнее отработаны, чем в других областях микроскопии. С помощью светового микроскопа можно изучать прозрачные или полупрозрачные объекты или фиксированные препараты, которые окрашиваются специальными красителями. Другим по значимости подходом является использование электронной микроскопии, которая по сравнению с оптической обеспечивает более высокое пространственное разрешение и поэтому незаменима в гистологи-

ческих и цитологических исследованиях. Для изучения биологических объектов с помощью электронного микроскопа необходимо наносить на них тонкий слой паров металла, а само исследование проводить в вакууме. Поэтому при проведении электронной микроскопии, как правило, имеют место артефакты, связанные с пробоподготовкой. В течение последних трех десятилетий для исследования биологических клеток получил распространение метод АСМ. С расширением его применения в биологических исследованиях связано появление термина «биологическая АСМ». В отличие от остальных описанных видов микроскопии результаты исследований с использованием данного метода не зависят от окраски объекта, а его применение не требует специфических условий для приготовления и исследования образца. Кроме морфологических характеристик клеток с помощью атомно-силового микроскопа можно изучать особенности локального силового взаимодействия зонда с поверхностью и на основании результатов таких исследований судить о локальных физических свойствах биологических образцов, таких как эластичность и адгезия [1].

Биологическая атомно-силовая микроскопия. До настоящего времени большинство АСМ-исследований проводились на фиксированных биологических объектах. Использование фиксированных образцов позволяет сохранить морфологию клеток, длительно хранить образцы и транспортировать их, получать воспроизводимые результаты. В качестве фиксирующих агентов используют различные спирты и альдегиды. Подготовка образцов также может проводиться с помощью высушивания на воздухе без применения фиксаторов. Любой метод фиксации искажает размеры клеток, но позволяет более точно визуализировать такие морфологические особенности, как наличие ядра и цитоплазматических гранул [2]. К настоящему времени получены АСМ-изображения разнообразных клеток, фиксированных различными методами, определены их механические свойства. Исследованы клетки крови, различные раковые клетки, культуры клеток, культивируемых *in vitro*, а также биологические ткани [3].

Материалы и методы исследования. Забор крови пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) осуществлялся при поступлении в рентгеноперационную до проведения стентирования или в реанимацию до проведения тромболизиса. У практически здоровых лиц (группа контроля) забор крови производили натощак через 10–12 ч после приема пищи, в качестве антикоагулянта использовали 3,8 %-ный раствор цитрата натрия в соотношении 1:9. Образцы клеток для АСМ-исследований готовили по методике [4].

Исследование геометрии, структуры поверхности и упругих свойств мембраны красных клеток крови осуществляли при помощи специализированного экспериментального комплекса NT-206 (производства ОДО «Микротестмашины», Беларусь), совмещающего функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии. Использовали стандартные кремниевые зонды NSC11 («MikroMasch» Co., Эстония). При исследовании первоначально регистрировали оптическое изображение клеток на стеклянной подложке. Затем с помощью системы микропозиционирования при оптическом контроле положения зонда в плоскости образца выбирали участок для АСМ-измерений.

Для оценки упругих свойств мембраны клеток применяли метод статической силовой спектроскопии [4]. Функция силовой спектроскопии является стандартным режимом работы атомно-силового микроскопа. Суть ее состоит в реализации контактного деформирования исследуемого объекта острием зонда и в измерении зависимости силы взаимодействия зонда с поверхностью образца от расстояния между ними. Радиус закругления острия составлял около 60 нм (определяли путем сканирования тестового образца), а коэффициент жесткости консоли – 3 Н/м (согласно спецификации производителя зондов).

Результаты и обсуждение. Примеры АСМ-изображений эритроцитов пациентов с ОКС и практически здоровых лиц представлены на рис. 1, а, б.

В результате исследований упругих свойств эритроцитов получены следующие данные. Значения модуля упругости эритроцитов у пациентов с ОКС находились в пределах от $(57,5 \pm 6,6)$ до $(88,2 \pm 9,05)$ МПа (в группе контроля – от $(72,3 \pm 3,1)$ до $(81,4 \pm 3,9)$ МПа). Распределения значений модуля упругости в группах представлены на рис. 2, а, б.

При этом значения силы адгезии у пациентов с ОКС находились в пределах от 22,2 до 33,3 нН (в группе контроля – от 23,5 до 27,2 нН). В результате анализа полученных данных установлено, что модуль упругости эритроцитов при ОКС ниже, а сила адгезии на поверхности красных клеток крови выше, чем у практически здоровых лиц, что свидетельствует о дестабилизации мембран эритроцитов у пациентов с ОКС. Полученные данные согласуются с результатами исследования деформируемости эритроцитов с использованием метода фильтруемости клеточной суспензии через поры диаметром 3 мкм. В [5] показано, что индекс ригидности эритроцитов пациентов с острыми формами ишемической болезни сердца ниже, чем у практически здоровых лиц. Полученные результаты указывают на возможность использования измеряемых с помощью АСМ модуля упругости и силы адгезии эритроцитов в качестве маркёров обострения течения ишемической болезни сердца на доклинической стадии развития процесса.

Наряду со многими преимуществами фиксированных образцов, важным является возможность изучения клеток и тканей в их нативном состоянии, а также оценка изменений их свойств по ходу различных процессов, протекающих на клеточном уровне. Для этих целей необходимо проводить АСМ-исследования живых клеток в жидкой среде, близкой к естественной и наиболее полно обеспечивающей поддержание всех процессов жизнедеятельности. В отличие от фиксированных препаратов при проведении АСМ живых биологических клеток возникает проблема прикрепления объекта исследования к подложке, так как большинство клеточных культур не фиксируются достаточно устойчиво, как необходимо для АСМ-исследований. Увеличить адгезию клеток можно с помощью обработки подложки полилизинном [6] или желатином [7]. Для повышения степени спонтанной адгезии клеток крови можно использовать растворы с повышенным содержанием ионов кальция (раствор Хенкса), так как адгезия является кальцийзависимым механизмом [2]. Принимая во внимание большую функциональную значимость прямого исследования живых клеток с высоким разрешением, развитие методик АСМ для этих биологических объектов является чрезвычайно важным.

Данные, полученные с помощью методов АСМ, могут использоваться для оценки метастатического потенциала раковых клеток. Установлено, что раковые клетки, способные образовывать метастазы, имеют более низкие значения модуля упругости их мембран и силы адгезии, чем немалигнифицированные [8, 9]. Возможно, пониженная жесткость и высокая эластичность помогают метастазирующим клеткам перемещаться во внутритканевых полостях, проходить через внутриклеточный матрикс и стенки сосудов. Отмечено, что измеряемая с помощью АСМ жесткость может являться биомаркёром для диагностики трансформации клеток на ранней стадии развития раковой опухоли [10]

С использованием метода динамической силовой спектроскопии проведена оценка интегральных механических свойств мембран клеточных органелл, а также упругости сразу двух мембранных слоев ядер и митохондрий. Силовую спектроскопию проводят обычно над центральной областью клетки, так как ее края имеют низкую высоту (1 мкм и менее), что приводит к возникновению эффекта подложки. Последний проявляется таким образом, что если мягкий тонкий объект находится на более твердой подложке, то при индентировании измеренные значе-

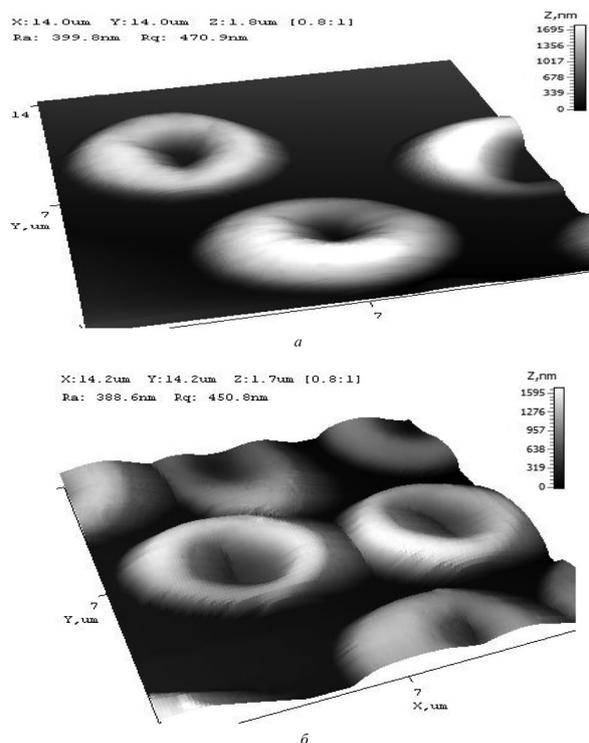
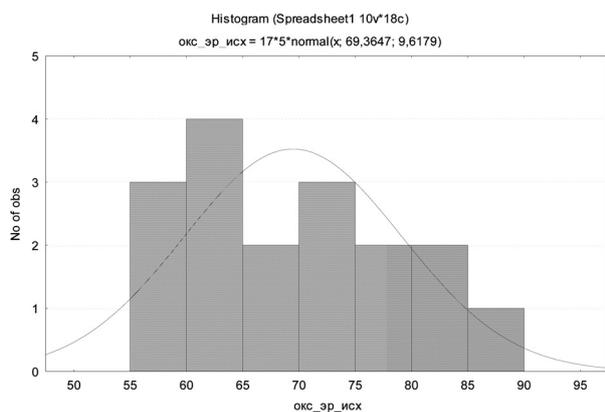
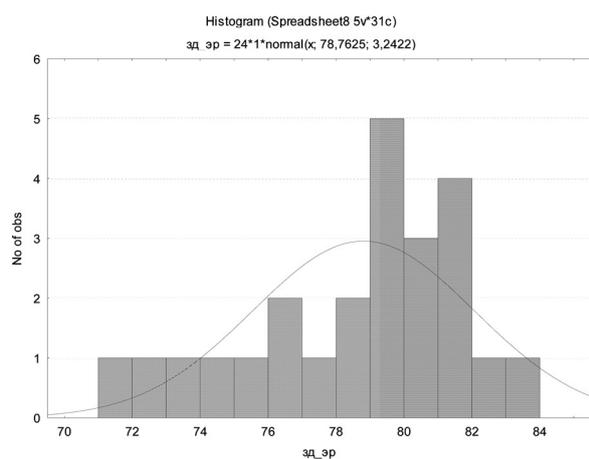


Рис. 1. Примеры изображений эритроцитов пациента с ОКС через 2 ч от начала обострения состояния (а) и практически здорового человека (б)



a



б

Рис. 2. Распределение значений модуля упругости эритроцитов в группах пациентов с ОКС (*a*) и практически здоровых лиц (*б*)

его закругления он может касаться клетки, не внося изменений в ее морфологию, либо проникать внутрь клетки, вследствие чего могут иметь место обратимые или необратимые изменения клеточной мембраны. Поэтому представлено большое количество результатов исследований с использованием различных модификаций кантилевера.

Изучение биологических объектов с помощью метода АСМ еще находится на стадии разработки методик и подходов к правильной интерпретации полученных результатов. Клетка является сложной гетерогенной сбалансированной системой, отвечающей на любое внешнее воздействие, что усложняет получение и обработку данных. Поскольку результаты, получаемые с помощью метода силовой спектроскопии, основаны на анализе кривых подвода и отвода, получаемых в процессе индентирования, то они зависят от модели, на основе которой проводится данный анализ. Одни авторы для описания локального деформирования клеток индентором применяют модель Герца при использовании закругленного зонда либо ее модификацию Шеддона при применении зонда конусной формы [14]. Другие авторы предпочитают модель Джонсона–Кендала–Робертса (ДКР), учитывающую адгезионные силы [15]. Вопрос остается открытым, так как эти модели разрабатывались для однородных материалов, они не всегда отражают объективную картину, их использование имеет ограничительные условия. Исследование биологических клеток как гетерогенных систем требует расчета новых моделей.

Заключение. Применение АСМ для исследования биологических клеток позволяет значительно расширить круг задач, решаемых в области биологии и биофизики клетки. В настоящее время имеет место тенденция к переходу от визуализации клеток к изучению их локальных ме-

ния модуля упругости для объекта окажутся выше, чем в действительности. С помощью данного метода исследованы синаптические мембраны в составе синаптосом. На их поверхности выявлены структуры, отличающиеся механическими свойствами от окружающих их участков мембраны, являющимися, возможно, поросомами [11].

Высокое разрешение метода АСМ позволяет наблюдать организацию цитоскелета живой клетки в среде культивирования. Можно оценить его целостность с помощью метода силовой спектроскопии, поскольку локальный модуль упругости в местах нахождения микрофибрилл цитоскелета значительно выше [7].

Измерение морфологических параметров клеток в ответ на биохимические [12] и физические [13] воздействия дает информацию о протекании внутриклеточных процессов. С помощью АСМ продемонстрировано действие магнитного поля на клетки [13]. Показано, что после воздействия поля с магнитной индукцией 2 Т с частотой 50 Гц на клетки лимфобластомы уменьшается высота клетки над подложкой, растет количество углублений на поверхности. Данные морфологические изменения могут свидетельствовать о наличии функциональных отклонений (например, в клеточной подвижности).

В научной литературе много внимания уделяется процессам взаимодействия зонда с образцом. В зависимости от формы и радиуса

ханических свойств. Анализ тенденций развития биологической АСМ показывает, что данный метод имеет большой потенциал для исследований биологических клеток, результаты которых могут быть использованы для решения большого круга задач, в том числе и практического применения метода в медицине, фармакологии, создании биотехнологий.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Ф14В-013) и Вьетнамской Академии наук и технологий (грант VAST. NTQT. Belarus.01/14-15).

Список использованной литературы

1. *Миронов, В. Л.* Основы сканирующей зондовой микроскопии: учеб. пособие для студентов старших курсов высш. уч. завед. / В. Л. Миронов. – Н. Новгород, 2004. – С. 74–75.
2. *Пестовский, Ю. С.* Изучение влияния способа фиксации на морфологические параметры клеток крови как задача для студенческого практикума по нанотехнологии / Ю. С. Пестовский // Всерос. журн. науч. публикаций. – 2013. – № 4. – С. 71–72.
3. **Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation** / L. Sirghi [et al.] // *Europ. Biophys. J.* – 2008. – Vol. 37, N 6. – P. 935–945.
4. Регуляция механических свойств эритроцитов донорами оксида азота / Е. В. Шамова [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 23–25 июня 2010 г.: в 2 ч. / редкол.: И. Д. Вологовский [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2010. – Ч. 2, т. 2. – С. 151–153.
5. Состояние системы микроциркуляции и показатели гемореологии при острых и хронических формах ИБС / Е. Э. Константинова [и др.] // *Акт. вопр. кардиологии: сб. науч. тр.* – Минск, 1997. – Вып. 1. – С. 127–130.
6. *Mazia, D.* **Cells adhesion probing for atomic force microscopy indentation** / D. Mazia, G. Schatten, W. Sale, // *Cell Biology.* – 1975. – Vol. 66, N 9. – P. 198–200.
7. *Ефремов, Ю. М.* Исследование распределения и механических свойств цитоскелета астроцитов в среде культивирования методом атомно-силовой микроскопии / Ю. М. Ефремов // *Acta Naturae.* – 2011. – Vol. 3, N 3. – P. 96–102.
8. Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines / J. Rother [et al.] // *Open Biology.* – 2014. – N 4: 140046. – P. 1–7.
9. *Дедков, В. Г.* Контактная атомно-силовая спектроскопия биологических тканей / В. Г. Дедков // *Письма в ЖТФ.* – 2010. – Т. 36, вып. 3. – С. 76–81.
10. *Lekka, M.* Cancer cell recognition-Mechanical phenotype / M. Lekka // *Micron.* – 2012. – Vol. 43. – P. 1259–1266.
11. *Кузнецова, Т. Г.* Исследование структурно-функциональных свойств клеточных мембран методами атомно-силовой микроскопии / Т. Г. Кузнецова. // *Мед. журн.* – 2005. – № 3. – С. 80–81.
12. **Shape and Volume of Living Aldosterone-Sensitive Cells Imaged with the Atomic-Force Microscope** / S. W. Schneider [et al.] // *Atomic Force Microscopy: Biomedical methods and Applications* –Humana Press– 2004. – P. 255–279.
13. *Grimaldi, S.* Lymphoblastoid Cells Exposed to Low-Frequency Magnetic Fields / S. Grimaldi, M. Gurasole, Cricenti // *Atomic Force Microscopy: Biomedical methods and Applications.* – Humana Press, 2004. – P. 323–339.
14. Atomic force microscopy probing of cell elasticity / T. G. Kuznetsova [et al.] // *Micron.* – 2007. – Vol. 38. iss. 8. – P. 824–833.
15. *Мохаммед Салем, А. А.* Методические аспекты определения модуля упругости высокоэластичных материалов и биологических клеток методом силовой спектроскопии / А. А. Мохаммед Салем // *Механика машин, механизмов и материалов.* – 2015. – № 2 (31). – С. 80–84.

Поступила в редакцию 18.05.2016