

Г. Б. Мельникова, Н. С. Кужель, Е. Э. Константинова

ПОСТРОЕНИЕ КАРТ ЖЕСТКОСТИ ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Введение. Большое количество исследований проводится по изучению механических свойств клеточной мембраны с использованием как «живых клеток», так и фиксированных различными реагентами [1–4]. Структура клеточной мембраны является сложным объектом для изучения ее локальных механических свойств на наноуровне. В состав мембран входят белки, липиды и углеводы, определяющие основную структуру, которые посредством химических и межмолекулярных связей образуют группы элементов, отличающиеся по свойствам [5].

Исследование клеточной мембраны методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяет детально изучить свойства компонентов мембраны на наноуровне, получить информацию о физиологическом и функциональном состоянии клетки, установить структурные изменения, возникающие при различных патологиях [6].

При локальной оценке модуля упругости мембраны клетки в различных ее областях мы получаем усредненное значение данного параметра, что не всегда точно описывает изменения свойств клеточных компонентов. Интересным представляется построение карты жесткости клеточной мембраны на небольшой площади (до 2 мкм^2) путем записи силовых кривых.

Цель работы – с использованием метода атомно-силовой микроскопии определить значения модуля упругости и силы адгезии в различных областях поверхности клеток и путем построения карт жесткости провести анализ распределения локальных механических свойств мембран эритроцитов.

Материалы и методы. Построение карт жесткости эритроцитарной мембраны проводили на образцах фиксированных клеток крови. Для выделения эритроцитов венозную кровь пациентов, стабилизированную этилендиаминтетрацетатом калия, центрифугировали 3 мин при 90 g. Отделяли плазму, а полученный осадок трехкратно отмывали фосфатным буфером («Sigma», США). Затем 3 мкл суспензии эритроцитов фиксировали в 700 мкл 0,5%-го буферного раствора глутарового альдегида в течение 30 мин. После фиксации отделяли эритроциты центрифугированием в течение 3 мин при 90g. К полученному осадку добавляли 700 мкл фосфатного буфера, ресуспендировали и центрифугировали 3 мин при 90g, процедуру повторяли два раза. Затем к осадку добавляли 700 мкл дистиллированной воды, ресуспендировали и центрифугировали 3 мин при 90g, процедуру повторяли два раза. Далее осадок с клетками наносили на пластинки слюды размером $1 \times 1 \text{ см}$ и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч.

Тромбоциты выделяли путем центрифугирования венозной крови, стабилизированной 3,8%-м раствором цитрата натрия, в течение 10 мин при 200g. Полученную обогащенную тромбоцитами плазму фиксировали в 1,5 мл 0,5%-го буферного раствора глутарового альдегида в течение 30 мин. Тромбоциты отделяли от фиксатора путем центрифугирования суспензии в течение 10 мин при 2000g. Супернатант отбирали, а к осадку добавляли 700 мкл фосфатного буфера, ресуспендировали и центрифугировали 10 мин при 2000g, повторяли два раза. Затем к осадку добавляли 700 мкл дистиллированной воды, ресуспендировали и центрифугировали 10 мин при 2000g, процедуру повторяли два раза. Осадок с клетками наносили на пластинки слюды размером $1 \times 1 \text{ см}$ и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч [7].

Модуль упругости определяли с использованием стандартных кремниевых зондов NSC11 (Mikromash, Эстония) жесткостью 3 Н/м с радиусом закругления 60 нм в режиме работы АСМ (NT-206, Беларусь) – Spectroscan, в котором задается область сканирования и мат-

рица точек записи силовых кривых. Сетка области, в точках которой проводилась запись кривых индентирования, представлена на рис. 1. Расчет модуля упругости проводили по модели Герца [8], силы адгезии – на основании значений отклонения консоли при отрыве острия зонда от поверхности образца по модели Джонсона – Кеделла – Робертса [9].

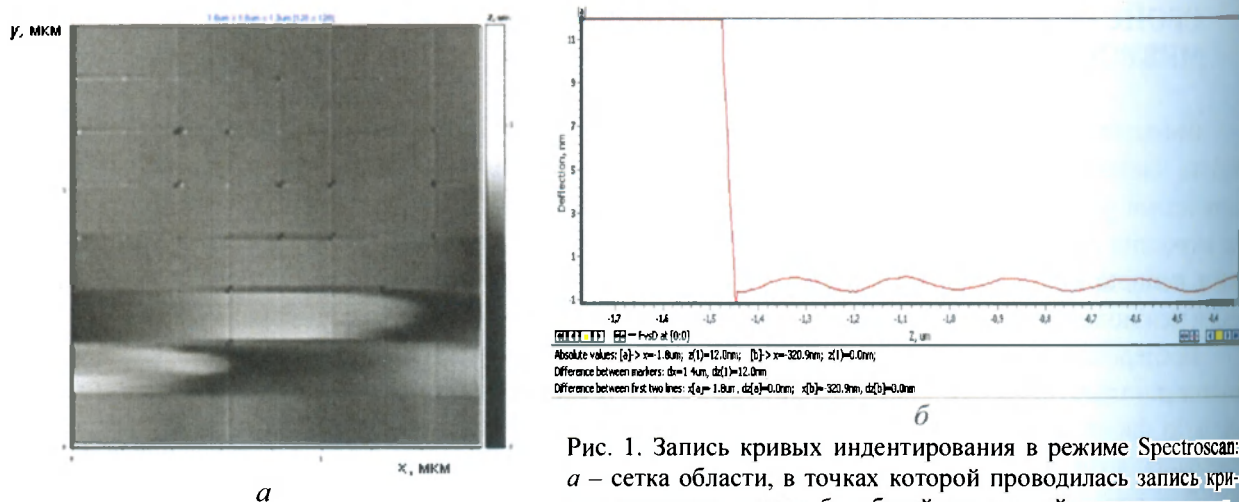


Рис. 1. Запись кривых индентирования в режиме Spectroscan: *a* – сетка области, в точках которой проводилась запись кривых индентирования; *б* – общий вид кривой индентирования

Результаты и их обсуждение. Определение локального модуля упругости проводили на периферической части клетки. При этом на небольшой заданной области (1x1 мкм) разброс значений локального модуля упругости составлял от 40 до 150 МПа. Наиболее характерное статистическое распределение модуля упругости представлено на рис. 2.

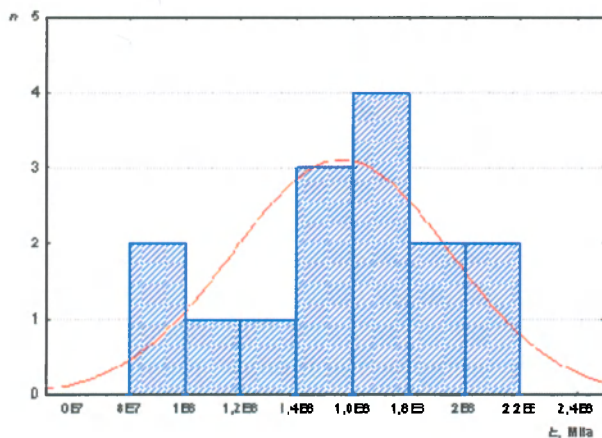


Рис. 2. Статистическое распределение локального модуля упругости для мембраны эритроцитов [n = 21]

Как известно, в состав мембраны эритроцитов входят белки, липиды, углеводы, образующие более крупные структурные единицы, каждая из которых обладает определенными механическими свойствами. Неоднородность структуры мембраны можно отметить и на изображениях топографии поверхности, полученных с помощью АСМ (рис. 3).

Представляет интерес более детальное изучение локальных механических свойств мембраны в различных областях клетки. Для этого было предложено определить локальный модуль упругости мембраны для области 1x1 мкм в 64 точках. В результате получено распределение для образца эритроцитов (рис. 4, *a*). Можно выделить три области значений E : от 60 до 80 МПа, от 80 до 100 МПа и от 100 до 120 МПа. Дальнейшее сопоставление изображения топографии мембраны эритроцитов с полученной картой модуля упругости позволяет дать предварительную оценку о свойствах структурного элемента мембраны клетки. Это наиболее актуально при изучении свойств мембраны клеток у пациентов с различными заболеваниями, так как по изменению среднего значения модуля упругости можно оценить наличие патологии или ее отсутствие.

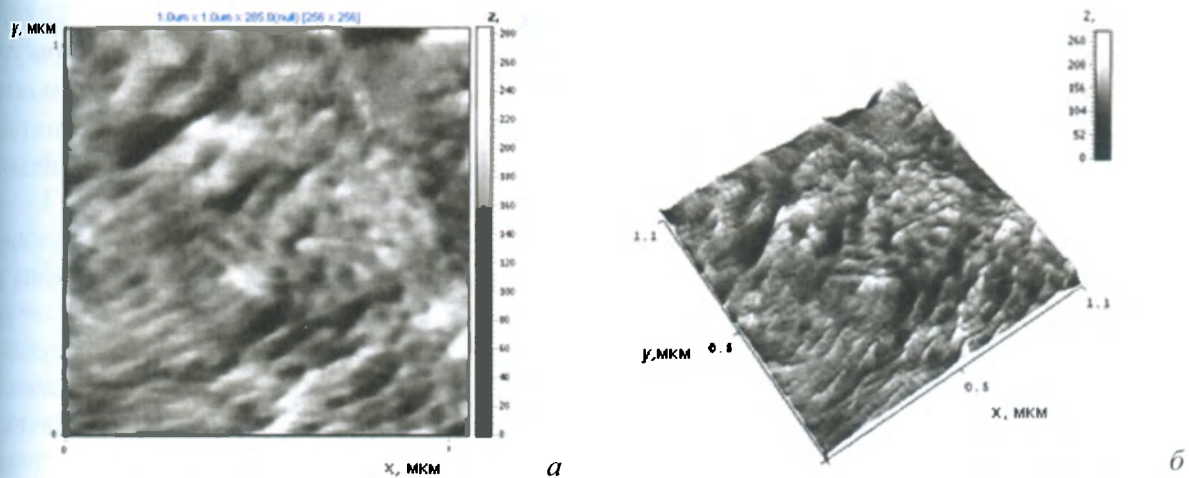


Рис. 3. Структура мембраны эритроцитов в режиме латеральных сил: *а* – топография поверхности; *б* – 3D-изображение

Карта распределения локальных значений силы адгезии представлена на рис. 4, б. Основную область представляют низкие значения силы адгезии (от 0 до 10 нН), что свидетельствует о гидрофобных свойствах мембран фиксированных клеток и, возможно, преобладании связанных функциональных групп компонентов мембраны с глутаровым альдегидом либо преобладании гидрофобных групп аминокислот молекул белка на поверхности мембраны.

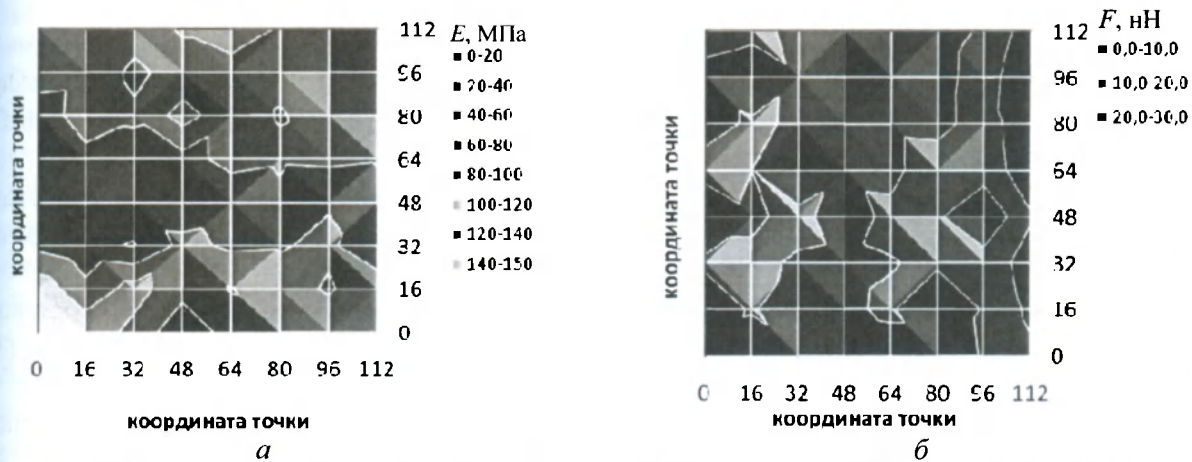


Рис. 4. Распределение значений модуля упругости (*а*) и силы адгезии (*б*) по поверхности площадью $1 \mu\text{m}^2$ для образца эритроцитов

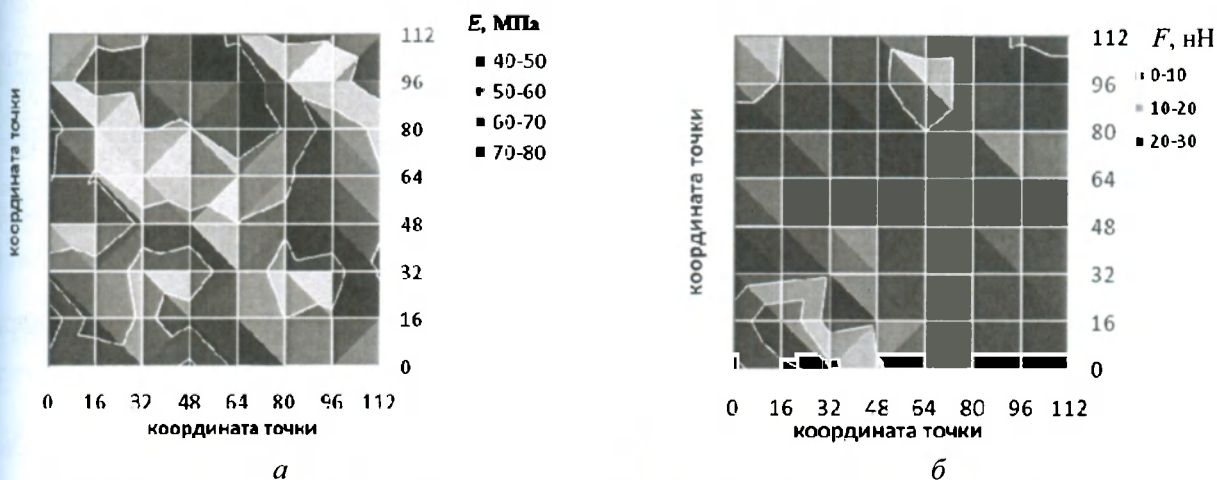


Рис. 5. Распределение значений локального модуля упругости (*а*) и силы адгезии (*б*) по поверхности площадью $1 \mu\text{m}^2$ для образца тромбоцитов

Более однородна по свойствам структура поверхности мембраны тромбоцитов. В данном случае значения E , как правило, изменяются от 50 до 70 МПа (рис. 5, а). Также присутствует область низких значений 40–50 МПа, но ее доля незначительна. Ее наличие может быть связано с неоднородностями в подмембранном пространстве клеток тромбоцитов. Аналогично значениям силы адгезии эритроцитов, значения F для тромбоцитов составляют от 0 до 10 нН (рис. 5, б).

Определение изменений свойств структурного элемента мембраны позволяет установить, на каком уровне происходят нарушения функционирования клеточной мембраны и дать предварительную оценку о наличии определенного заболевания.

Заключение. Получены карты локальных механических свойств мембраны эритроцитов и тромбоцитов. Показано, что значения модуля упругости и силы адгезии для клеточной мембраны не является постоянной величиной, а изменяется в зависимости от расположения структурных элементов мембраны и от изменения морфологии клетки. Преимущество получения карт жесткости – более детальный анализ свойств мембраны клетки, что позволяет не только установить наличие заболевания, но и определить его на стадии развития на основании изменений свойств структурных элементов.

Литература

1. Пестовский, Ю. С. Изучение влияния способа фиксации на морфологические параметры клеток крови как задача для студенческого практикума по нанотехнологии / Ю. С. Петровский // *Всероссийский журнал научных публикаций*. – 2013. – № 4 (19). – С. 71–73.
2. Стародубцева, М. Н. АСМ-исследование эритроцитов, кренированных активными формами азота / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // *Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : VII Международный семинар*. 1–3 ноября 2006 г. Минск, 2006. – С. 148–152.
3. Гетманенко, Н. Ю. Атомно-силовой микроскоп как инструмент исследования структуры поверхности эритроцитов / Н. Ю. Гетманенко, Е. Н. Галайченко, Н. Н. Рожницкий // *Восточно-европейский журнал передовых технологий*. – 2009. – № 4/10 (40). – С. 7–10.
4. Горшкова, Е. Атомно-силовая микроскопия клеток крови человека / Е. Горшкова, С. Плескова, Э. Михеева // *Наноиндустрия. Нанотехнологии для медицины*. – 2012. – № 4 (34). – С. 50–53.
5. Черницкий, А. П. Структура и функции эритроцитарных мембран / А. П. Черницкий, А. В. Воробей. – Минск : Наука и техника, 1981. – 216 с.
6. Atomic force microscopy-based microreology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines / J. Rother, H. Noding, I. Mey [et al.] // *Open Biol.* 4: 140046. – P. 1–7.
7. Influence of polymeric nanoparticles solution on the structure and mechanical properties of RBCs estimated by AFM method / G. B. Melnikova, N. S. Kuzhel, E. E. Konstantinova [et al.] // *5th Eurosummer school on biorheology and symposium on micro and nanomechanics and mechanobiology of cells, tissues and systems*. Varna, Bulgaria, 1–5 September 2015. – P. 33–34.
8. Micromechanical properties of elastic polymeric materials as probed by scanning force microscopy / S. A. Chizhik, Z. Huang, V. V. Gorbunov [et al.] // *Langmuir*. – 1998. – No. 14. – P. 2606–2609.
9. Свириденко, А. И. Механика дискретного фрикционного контакта / А. И. Свириденко, С. А. Чижик, М. И. Петроковец. – Минск : Наука и техника, 1990. – 272 с.