

АСМ-ОЦЕНКА ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФИБРОБЛАСТОВ И СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ОБРАБОТАННЫХ ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

Н.И. Егоренков¹, М.Н. Стародубцева¹, И.Е. Стародубцев¹, Д.Р. Петренев¹,
Г.Б. Мельникова², Н.С. Кужель², Е.Э. Константинова²

¹Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь; marysta@mail.ru

²Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

При АСМ-исследованиях биологических клеток в контактном режиме сканирования используется предварительная их фиксация (глутаровым альдегидом, этанолом и др.) [1]. Фиксация, связанная с образованием химических связей между молекулами биополимеров (белков), изменяет свойства поверхностного слоя клеток. Как метод подготовки клеточных образцов химическая фиксация допустима при относительных (сравнительных) исследованиях нормальных и патологически измененных клеток. Ее последствия не должны качественно изменять свойства нативных клеток. Но изучение химических сшивок в поверхностном слое клеток является также самостоятельной проблемой, имеющей большое значение для понимания их функционирования.

Цель

Оценить АСМ-методом изменения физико-механических свойств (модуля упругости, силы неспецифической адгезии и силы трения между острием АСМ-зонда и поверхностью клетки, а также фрактальной размерности карт физико-механических свойств поверхности клетки) фибробластов и стволовых клеток человека, обработанных глутаровым альдегидом.

Материалы и методы исследований

В работе использованы культуры первичных фибробластов кожи человека (hFB, 3 пассажа) и стромальных стволовых клеток из жировой ткани человека (hMSC, 3 пассажа), полученные в НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет». Суспензию клеток наносили тонким слоем на поверхность чистых предметных стекол инкубировали в течение 18 часов, обрабатывали глутаровым альдегидом (37 °С), промывали и высушивали при комнатной температуре. Атомно-силовая микроскопия клеток проводилась в УО «Гомельский государственный медицинский университет» и ГНУ «Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова» на атомно-силовом микроскопе (АСМ) НТ-206 («МикроТестМашины», Беларусь). Измерения проводили в контактном режиме сканирования на воздухе в интервале температур 25—85 °С при относительной влажности окружающей среды 55±10%. Параметры сил трения (среднее значение и среднеквадратическое отклонение) оценивали, анализируя карты латеральных сил прямого и обратного направлений сканирования. Фрактальную размер-

ность рассчитывали с помощью разработанного нами программного комплекса на основе метода подсчета кубов. Осуществлен также мультифрактальный анализ поверхности клеток. Локальный модуль упругости и силы неспецифической адгезии оценивали методом статической силовой спектроскопии при температуре (22±5) °С.

Результаты и их обсуждение

При изучении микромеханических свойств фибробластов и стволовых клеток, обработанных глутаровым альдегидом, установлено увеличение фрактальной размерности карт латеральных сил, локального модуля упругости, силы неспецифической адгезии (острия АСМ-зонда к поверхности клеток), а также уменьшение сил трения (латеральных сил) при увеличении времени реакции клеток с глутаровым альдегидом (от 5 до 35 минут).

При изучении термомеханических свойств фибробластов и стволовых клеток, обработанных глутаровым альдегидом, установлено уменьшение скорости изменения сил трения при увеличении температуры испытаний с увеличением концентрации глутарового альдегида (0,5—1,5%). При этом имеет место уменьшение фрактальной размерности рельефа и средних значений сил трения (латеральных сил между острием АСМ-зонда и поверхностью клеток) независимо от температуры испытаний (25—85 °С). Предложена модель, объясняющую связь изменений АСМ-параметров поверхностного слоя клеток с изменениями физико-механических свойств поверхностного слоя клеток, вызванных действием глутарового альдегида.

Анализ физико-механических свойств изученных фибробластов и стволовых клеток от времени их реакции с глутаровым альдегидом, его концентрации, а также их термомеханических зависимостей свидетельствуют об увеличении жесткости поверхностного слоя клеток, что обусловлено ростом числа межмолекулярных сшивок в нем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (код проекта Б14-042).

1. Стародубцева, М.Н., Кузнецова Т.Г., Егоренков Н.И. Способы подготовки эритроцитов для исследования методами атомно-силовой микроскопии // Вестник Фонда фундаментальных исследований. — 2008, № 3, 42—51