АСМ-ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

AFM STUDIES OF CELL STRUCTURES IN BIOMEDICAL RESEARCH

Т.О.Плешакова[1], к.х.н., ст. науч. сотр., А.А.Валуева[1, 2], И.А.Иванова[1], Н.В.Поталдыкова[3], Д.В.Еникеев[3], Д.А.Галицкая[3], врач-уролог, Н.Е.Новикова[4], Ю.Д.Иванов[1], д.б.н., проф., заведующий лабораторией нанобиотехнологий / t.pleshakova@gmail.com

T.O.Pleshakova[1], Cand. of Sc. (Chemistry), A.A.Valuyeva[1, 2], I.A.Ivanova[1], N.V.Potaldykova[3], D.V.Enikeev[3], D.A.Galitskaya[3], urologist, N.E.Novikova[4], Yu.D.Ivanov[1], Doctor of Sc. (Biology), Prof., Head of Laboratory

DOI: 10.22184/1993-8578.2019.12.7-8.416.418

Получено: 01.10.2019 г.

АСМ была разработана как техника визуализации объектов, которая представляет трехмерное (3D) топографическое изображение и структурные детали образцов. Возможность работать в жидких средах и при температуре окружающей среды переместила АСМ в биологию и привела к анализу биомолекул и клеток на суб-/нанометровом разрешении. На сегодняшний день АСМ представляет собой мощную многофункциональную платформу для визуализации биологических образцов от одиночных молекул до живых клеток. Использование АСМ в качестве нанодиагностического устройства является новым направлением биомедицинских исследований.

AFM was developed as an object visualization technique that presents a three-dimensional (3D) topographic image and structural details of samples. The ability to work in liquid media and at ambient temperature moved the AFM to biology and led to the analysis of biomolecules and cells at sub-/nanometer resolution. Today, AFM is a powerful multifunctional platform for visualizing biological samples from single molecules to living cells. The use of AFM as a nanodiagnostic device is a new area of biomedical research.

По сравнению с оптической и просвечивающей электронной микроскопией преимуществами АСМ являются более упрощенная технология приготовления образцов без использования красителей и контрастов с солями тяжелых металлов, возможность визуализации в любой среде, включая воздух, вакуум или водные растворы. Указанные возможности открывают широкие перспективы для изучения живых и фиксированных клеток методом АСМ. Помимо режимов визуализации, для решения биомедицинских задач активно используются режимы силовой спектроскопии, основанные на регистрации кривых взаимодействия кантилевера АСМ и исследуемых образцов.

Lee и соавторы [1] впервые использовали АСМ для наблюдения морфологических изменений в митохондрии сердца крыс. Митохондрии тесно связаны с процессами некротической и апоптотической гибели клеток. Количественная оценка морфологических изменений в митохондриях были бы полезны для постановки степени поражения, а также для оценки защитных эффектов различных видов терапии. Авторы [1] исследовали митохондрии сердца, которые были выделены из сердец здоровых и больных ишемией особей. Поверхности нормальной митохондрии выглядели гладкими и не имели повреждений. А поверхности ишемических митохондрий были шероховаты. В другой работе [2] оценили

1 НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, Москва, Российская Федерация / Institute of Biomedical Chemistry.
2 Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева / D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia.
3 Институт урологии и репродуктивного здоровья человека (Сеченовский Университет) / I.M.Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
4 ГБОУ Школа № 1387, Москва, Российская Федерация / State budgetary educational institution of the city of Moscow "School No. 1387".

морфологические различия в митохондриях сердца и связали продолжительность и тяжесть ишемии с формой клеток на основе анализа топографических АСМ-изображений. Четыре параметра (площадь, периметр, длина и ширина) используются как морфологические различия между митохондриями от нормальных и ишемических сердец. В дополнение, используя осевое отношение и округлость митохондрий, авторы выделили группу с ишемией-реперфузией.

Механические свойства клеток являются уникальными показателями их состояния. В ряде исследований продемонстрирована взаимосвязь между механическими свойствами клеток и патогенезом, а также развитием заболевания [3–5]. АСМ использовался для характеристики ультраструктуры раковых клеток мочевого пузыря [6], а также для подтверждения отличия механических свойств здоровых клеток от раковых при раке молочной железы [7] или предстательной железы [8]. Различия в эластичности были обнаружены также между нормальными лимфоцитами и клетками Jurkat (линия лейкемических Т-лимфоцитов человека) [9, 10]. Общепринято, что в ответ на силовую стимуляцию раковые клетки обычно более мягкие, чем их здоровые, особенно в случае рака мочевого пузыря [11] T24, BC3726, рака простаты [8], рака груди [5]. Жесткость метастатических раковых клеток, выделенных из плевральных жидкостей пациентов с подозрением на рак легкого, груди или поджелудочной железы были более чем на 70% более мягкими, чем доброкачественные клетки [12]. Кроме того, различные состояния прогрессирования рака для клеток пищевода успешно коррелировали с характерными механическими свойствами: нормальные плоскоклеточные клетки более жесткие, чем метапластические клетки, и сами они более жесткие, чем их диспластические гомологи [13]. Предполагается, что изменение жесткости может быть непосредственно связано с уменьшением уровня актина в клеточном цитоскелете [14]. Таким образом, исследования показывают, что АСМ является потенциальным диагностическим инструментом для выявления рака. Подавляющее большинство упомянутых выше экспериментов выполнено с применением режима силовой спектроскопии и измерения силы взаимодействия (режим force volume).

Berquand и соавторы [15] представили результаты АСМ-характеристики злокачественных и модифицированных, менее злокачественных форм глиобластомы, U-251MG клеток. Глиобластома является наиболее распространенной и злокачественной формой рака мозга, которая обладает высокой устойчивостью к терапии, поскольку энцефалический барьер мало проницаем для лекарств. Для исследования были использованы два режима force volume (FV) и Peak Force Tapping (PFT). Оба режима являются количественными и простыми в использовании, но авторы [15] считают, что PFT представляется наиболее релевантным. На основе данных, полученных в FV- и PFT-режимах, показано, что клетки глиобластомы U-251MG примерно в три раза более мягкие и в два раза более деформируемые, в отличие от их рекомбинантных аналогов. Также показано, что при сопоставимой скорости сканирования измерения пиковой нагрузки были намного более точными и актуальными в случае PFT-режима. Авторы считают, что из-за того, что силовая кривая генерируется на каждый пиксель изображения, PFT обеспечивает от 60 до 70 раз больше точек данных, чем стандартный FV-режим. Поэтому на основе PFT-данных могут более подробно описываться параметры для различия здорового и больного состояния клеток.

Авторами [16] предложено использовать АСМ для расширения возможностей цитологической диагностики, поскольку метод за небольшое время (минуты) позволяет получить изображение поверхности клеток с разрешением порядка нескольких нанометров, а также получить объективные морфометрические показатели клеток. Цель исследования – определить роль АСМ в цитологической диагностике опухолей и опухолеподобных процессов различных локализаций. По результатам исследования авторы утверждают, что АСМ позволяет определить объективные дифференциально-диагностические критерии рака. Например, для клеток рака молочной железы характерно статистически значимое увеличение соотношения высоты ядра и цитоплазмы по сравнению с фиброаденомой. Этот параметр может служить объективным критерием дифференциальной диагностики фиброаденомы и рака молочной железы (при раке – 2,5±1,0 нм, при фиброаденоме – 1,8±0,4 нм, $p<0,05$). Также в этом исследовании проведены исследования и выделены диагностические признаки для папиллярного рака щитовидной железы, рака желудка, шейки матки.

Морфология раковых клеток, включая их форму, шероховатость поверхности и высоту, зависит от противоопухолевой лекарственной терапии. Морфологические изменения зависят как от типа раковых клеток, так и от типа лекарств, следовательно, эти изменения являются одним из способов оценки противоопухолевой

активности препаратов. Например, с использованием АСМ исследованы морфологические изменения, вызванные препаратом для химиотерапии паклитаксел, в клетках аденокарциномы эндометрия человека (Ishikawa cells) и клетках цервикальной карциномы человека (HeLa cells) [17, 18]. Оба типа клеток также обрабатывали цисплатином (цитотоксический препарат), и результаты сравнивали с результатами лечения паклитакселом. Мембраны Ishikawa cells были серьезно повреждены паклитакселом через 24 ч, и наблюдались очевидные апоптотические изменения, включая агрегацию. Для HeLa cells также наблюдались подобные изменения, но менее значительные. При этом жесткость Ishikawa cells значительно уменьшались при обработке паклитакселом, а в случае HeLa cells, жесткости обработанных клеток через 6 и 12 ч были больше, чем у необработанных клеток. Однако, когда клетки обрабатывались цисплатином, более значимые изменения наблюдались для HeLa cells. Клетки HeLa, обработанные цисплатином, имели овальную форму и их поверхность была очень шероховатой [17]. Высота клеток была уменьшена из-за разрыва ядра после воздействия цисплатина. А в случае клеток Ishikawa cells высота клеток также уменьшалась после обработки цисплатином, но их поверхность была менее повреждена, о чем свидетельствовали небольшие изменения в шероховатости.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Lee G.** et al. Characterization of mitochondria isolated from normal and ischemic hearts in rats utilizing atomic force microscopy // Micron. 2011. Vol. 42. № 3. P. 299–304.
2. **Lee G.** et al. Quantitative and qualitative analysis of heart mitochondria for evaluating the degree of myocardial injury utilizing atomic force microscopy // Micron. 2013. Vol. 44. P. 167–173.
3. **Yamazaki D.**, **Kurisu S.**, **Takenawa T.** Regulation of cancer cell motility through actin reorganization // Cancer Sci. 2005. Vol. 96, № 7. P. 379–386.
4. **Suresh S.** Biomechanics and biophysics of cancer cells // Acta Mater. 2007. Vol. 55. № 12. P. 3989–4014.
5. **Cross S.E.** et al. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells // Nanotechnology. 2008. Vol. 19. № 38. P. 384003.
6. **Chen B.**, **Wang Q.**, **Han L.** Using the atomic force microscope to observe and study the ultrastructure of the living biu-87 cells of the human bladder cancer // Scanning. 2004. Vol. 26. № 4. P. 162–166.
7. **Moreno-Flores S.** et al. Stress relaxation and creep on living cells with the atomic force microscope: a means to calculate elastic moduli and viscosities of cell components // NANOTECHNOLOGY. 2010. Vol. 21. № 44. P. 445101.
8. **Faria E.C.** et al. Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using AFM // Analyst. 2008. Vol. 133. № 11. P. 1498–1500.
9. **Cai X.** et al. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study // Micron. 2010. Vol. 41. № 3. P. 257–262.
10. **Li M.** et al. Imaging and measuring the rituximab-induced changes of mechanical properties in B-lymphoma cells using atomic force microscopy // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. Vol. 404. № 2. P. 689–694.
11. **Lekka M.** et al. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy // Eur. Biophys. J. 1999. Vol. 28. № 4. P. 312–316.
12. **Jonas E.A.** Molecular participants in mitochondrial cell death channel formation during neuronal ischemia // Exp. Neurol. 2009. Vol. 218. № 2. P. 203–212.
13. **Fuhrmann A.** et al. AFM stiffness nanotomography of normal, metaplastic and dysplastic human esophageal cells // Phys. Biol. 2011. Vol. 8. № 1. P. 015007.
14. **Ketene A.N.** et al. The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures // Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med. 2012. Vol. 8. № 1. P. 93–102.
15. **Berquand A.** et al. Expression of Tumor Suppressors PTEN and TP 53 in Isogenic Glioblastoma U-251MG Cells Affects Cellular Mechanical Properties – An AFM-Based Quantitative Investigation [Electronic resource] // JJAP Conference Proceedings. 2013. – URL: https://journals.jsap.jp (accessed: 05.01.2018).
16. **Славнова Е.Н.** et al. Применение метода атомно-силовой микроскопии в цитологической диагностике опухолей различных локализаций // Онкохирургия. 2013. № 1. P. 82.
17. **Kim Y.** et al. Quantitative Analysis with Atomic Force Microscopy of Cisplatin-induced Morphological Changes in HeLa and Ishikawa Cells // J. Nippon Med. Sch. 2012. Vol. 79. № 5. P. 320–326.
18. **Kim K.S.** et al. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells // PLOS ONE. 2012. Vol. 7. № 1. P. e30066.

BIO TECH WORLD

XVIII МЕЖДУНАРОДНАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХПРОМ & АНАЛИТИКА

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

- Аналитика
- БИОФарма
- Функциональные продукты питания
- БИОЛаб
- БИОСофт
- БИОМед
- БИОАгро
- БИОВенчур, БИОФранчайзинг, Стартапы, Кластеры, Технопарки
- Промышленная биотехнология
- Лабораторная мебель БИОЛабДрайв

XVIII МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

ОСНОВНЫЕ ПОТОКИ ФОРУМА

- Фундаментальные вопросы биотехнологии
- Геномная инженерия
- Биотехнология и медицина
- Биофарма
- Биоинформатика
- Сельское хозяйство
- Life science

2020

27-29 МАЯ
МОСКВА
ГОСТИНЫЙ ДВОР

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

RED GROUP
+7 (495) 780-41-09
+7 (495) 722-20-74
info@biomos.ru
www.biomos.ru