

РАДИОЭЛЕКТРОНИКА И ПРИБОРОСТРОЕНИЕ

УДК 612.117:57.08

Е. С. ДРОЗД^{1,3}, МОХАММЕД САЛЕМ А. А.², О. С. СПИРИДОНОВА¹,
Н. С. КУЖЕЛЬ¹, С. А. ЧИЖИК¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МОРФОЛОГИЮ, МЕХАНИЧЕСКИЕ И АДГЕЗИОННЫЕ СВОЙСТВА РАКОВЫХ КЛЕТОК ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ А549

¹ Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси,

² Белорусский национальный технический университет,

³ Генуэзский университет

(Поступила в редакцию 28.08.2014)

Введение. В настоящее время активно проводятся исследования механических свойств отдельных клеток, в частности, модуля упругости [1–6]. Показано, что данный параметр является весьма информативным с точки зрения выявления ряда патологических состояний клеток [7]. В этой связи представляют значительный практический интерес разносторонние исследования влияния различных факторов на отдельные клетки, а также разработка методов оценки их эластических и адгезионных свойств как в норме, так и при определенных патологиях или внешних воздействиях (в том числе при взаимодействии с нанообъектами различной природы).

Представляется важным исследование влияния различных физических факторов на ряд важных характеристик клеток, таких как дифференцировка, пролиферация, клеточная гибель, старение, иммортализация и раковая трансформация. Одним из таких факторов является температура. Интерес к данному фактору связан с исследованиями в области клеточных технологий, в которых для прекращения делений клеток и индуцирования дифференцировки предварительно выращенные при 37 °С клеточные культуры переносили в термостат с пониженной температурой (30 °С). Этот методический подход основан на работе [8], продемонстрировавшей дифференцировку стволовых клеток тератокарциномы мыши при 31 °С. Культивирование клеток при пониженной температуре применяется также в производстве рекомбинантных белков [9].

Цель настоящей работы – визуализация и количественная оценка в статическом режиме атомно-силовой микроскопии (АСМ) морфологических неоднородностей, механических и адгезионных свойств клеток рака легких человека линии А549, культивированных при разных температурах.

Материалы и методы исследования. Использованы культивируемые *in vitro* клетки рака легких человека (линия А549). Их снимали с ростовой поверхности культурального сосуда с помощью трипсина и суспендировали в среде Игла с добавлением 10%-ной сыворотки эмбрионов телят и антибиотиков пенициллина и стрептомицина. Концентрацию клеток подсчитывали под микроскопом в камере Горяева.

Клеточную суспензию А549 разбавляли средой так, чтобы при внесении в культуральный сосуд приходилось 5000 клеток на 1 см² ростовой поверхности. Клетки вносили в культуральные сосуды с вложенными предметными стеклами, добавляли углекислый газ (5% СО₂) и культивировали трое суток при 37 °С в герметично закупоренных резиновыми пробками культу-

ральных сосудах. Через трое суток большинство клеток расплывалось на поверхности предметных стекол. Затем часть стекол (для исследования методом АСМ) с клетками линии А549 фиксировали в восходящих концентрациях этанола (24, 48 и 96%, по 1 мин в каждой из концентраций) и высушивали на воздухе. Остальные культуры линии А549 переносили в термостат при пониженной температуре (30 °С) и культивировали в течение дополнительных 11 сут. После 5 и 11 сут культивирования при 30 °С выполняли цифровое фотографирование клеточных культур, а на 11-е сутки клетки на вложенных стеклах фиксировали этанолом.

Исследование клеток методом АСМ осуществлялось при помощи специального экспериментального комплекса, совмещающего функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии, с использованием стандартных кремниевых зондов NSC11 («MikroMasch») с константой жесткости консоли 3 Н/м. Комплекс состоит из атомно-силового микроскопа NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) и оптической системы (BelОМО «ЛЭМТ», Беларусь). Последняя позволяет позиционировать острие иглы на определенной области исследуемого образца.

Результаты исследований. Компьютерные микрофотографии клеток линии А549 после 3-суточного культивирования при 37 °С (контрольный вариант), а также после дальнейшего культивирования при 30 °С представлены на рис. 1–4. Через 5 сут культивирования клеток рака легкого человека линии А549 при пониженной температуре отмечено появление соединенных друг с другом морфологически сходных клеток, образовавшихся в результате незавершенного митоза (рис. 2). После 11-суточного культивирования при 30 °С регистрировали появление клеток с множественными выростами цитоплазмы (рис. 2), что свидетельствует об усилении дифференцировочных процессов, а также наблюдали в большей части ростовой поверхности значительную гибель клеток. Поэтому препараты после фиксации этанолом было затруднительно применять для АСМ в связи с ограниченными возможностями поиска подходящих клеток в

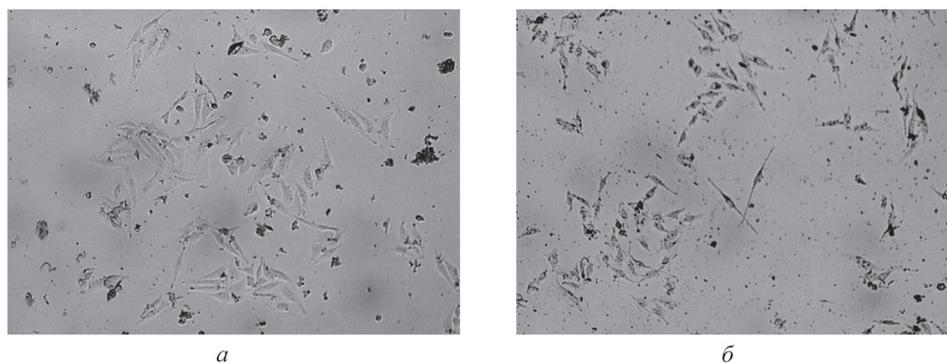


Рис. 1. Оптическое изображение живых (*a*) и фиксированных (*б*) клеток линии А549 после 3 сут культивирования при 37 °С

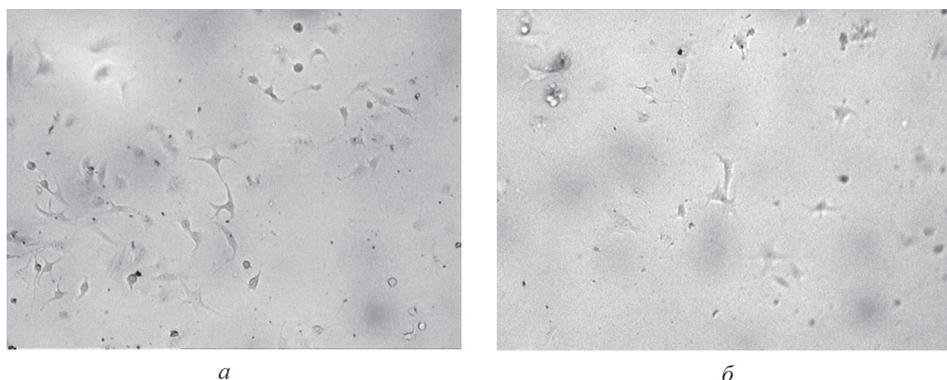


Рис. 2. Оптическое изображение клеток линии А549: *a* – после 3 сут культивирования при 37 °С и 5 сут культивирования при 30 °С (в центре – две сходные сестринские клетки, образовавшиеся в результате незавершенного митоза), *б* – после 3 сут культивирования при 37 °С и 11 сут при 30 °С (появляются клетки с множественными псевдоподиями)

используемой установке. По этой причине АСМ выполнено только для контрольного варианта и варианта культивирования в течение 8 сут при 30 °С. Таким образом, для изучения параметров клеток с использованием метода контактно-зондовой микроскопии целесообразно применять более высокую плотность посева клеток (например, 30000 клеток на 1 см²) либо уменьшать срок культивирования при пониженной температуре.

Под влиянием фиксации происходит конденсация клеток – они становятся компактнее (рис. 1). В то же время на фиксированных препаратах можно наблюдать изменения морфологии клеток при их культивировании в условиях пониженной температуры (рис. 1, б, 3).

С помощью оптической микроскопии обнаружены клетки с длинными выростами цитоплазмы, а также распластанные клетки с увеличенной площадью при пониженной температуре. На фиксированных стеклах также наблюдали клетки с множественными псевдоподиями. Это свидетельствует о том, что под влиянием пониженной температуры происходят процессы дифференцировки клеток, а также, по-видимому, клеточного старения.

Исследование топографии поверхности и модуля упругости образцов проводилось методом АСМ в контактном режиме сканирования стандартным кремниевым зондом NSC11 (жесткость консоли зонда $k = 3$ Н/м), радиус закругления которого составлял порядка 50 нм. На рис. 4, а представлены изображения топографии поверхности контрольного образца клеток.

Далее проводилась оценка структуры поверхности клеток после 8 сут экспонирования при пониженной температуре (30 °С) (рис. 4, б).

Средние значения модуля упругости для клеток линии А549 на глубине внедрения 20 нм составляют $(2,01 \pm 0,07)$ МПа, при этом у данных клеток спустя 8 сут культивирования при пониженной температуре модуль упругости составляет $(1,98 \pm 0,11)$ МПа. Следовательно, значительных изменений в эластичности клеток не обнаружено.

Проведена оценка адгезии контрольного образца клеток линии А549 и клеток после 8 сут культивирования при пониженной температуре (30 °С) методом АСМ, который позволяет измерять силы, возникающие между острием зонда и исследуемой поверхностью. Для этого используются зависимости перемещения от изгиба консоли (кривые подвода-отвода), получаемые при проведении процедуры статической силовой спектроскопии.

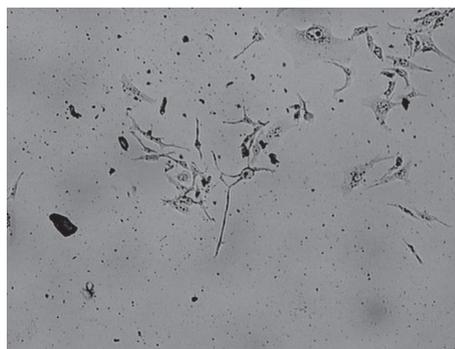


Рис. 3. Оптическое изображение клеток линии А549 после 3 сут культивирования при 37 °С и 8 сут культивирования при 30 °С (фотография фиксированных клеток)

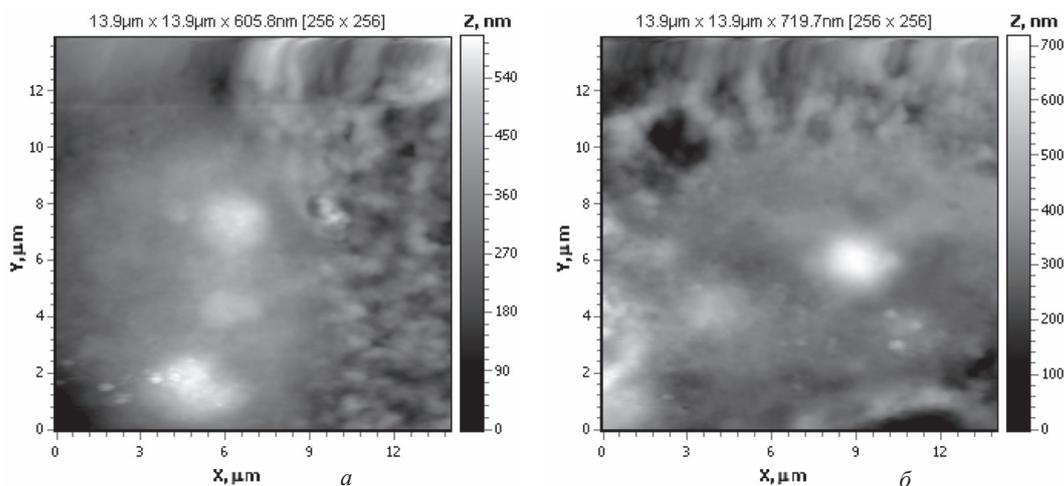


Рис. 4. АСМ-изображение клетки линии А549 (размер поля сканирования 14х14 мкм²): а – контрольный образец, б – образец, культивированный при пониженной температуре 30 °С

Процедура оценки силы адгезии выполнялась зондом NSC11, радиус закругления зонда 50 нм. Расчет контактной силы адгезии проводили по формуле

$$F_a = kZ_{back}$$

где F_a – сила адгезии, Z_{back} – изгиб консоли зонда при отрыве острия от образца, нм.

Исследования показали, что сила адгезии контрольного образца составила $(14,12 \pm 0,91)$ и $(15,97 \pm 1,41)$ нН для клеток после 8 сут культивирования при пониженной температуре (30°C). Следовательно, у клеток под влиянием пониженных температур наблюдается тенденция к увеличению силы адгезии острия зонда к поверхности мембраны.

Заключение. По сравнению с культурой клеток линии A549, выращенной при 37°C , последующее их экспонирование при пониженной температуре (30°C) в течение 5 и 8 сут приводит к появлению клеток с удлинёнными цитоплазматическими выростами. При пониженной температуре отмечается также появление соединённых друг с другом морфологически сходных клеток, образовавшихся в результате незавершённого митоза. В результате 11-суточного культивирования клеток линии A549 при 30°C появляются клетки с множественными псевдоподиями, что свидетельствует об индуцировании процессов дифференцировки. Также наблюдается значительная гибель клеток. Исследование клеток линии A549 рака легких человека с помощью АСМ при культивировании клеток при 30°C в течение 8 сут показало, что понижение температуры процесса не приводит к достоверным изменениям механических свойств данных клеток. Кроме того, можно утверждать, что у клеток под влиянием пониженных температур наблюдается тенденция к увеличению силы адгезии поверхности мембраны к острию зонда.

Литература

1. Sen Sh., Subramanian Sh., Discher D. E. // Biophysical J. 2005. Vol.89. P. 3203–3213.
2. Wagh A. A., Roan E., Chapman K. E. et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Psiol. 2008. Vol. 295. P. L54–L60.
3. Mustata M., Ritchie K., McNally H. A. // J. of Neuroscience Methods. 2010. Vol. 186, issue 1. P. 35–41.
4. Maciaszek J. L., Andemariam B., Lykotrafitis G. // J. Strain Analysis. 2011. Vol. 46. P. 368–379.
5. Kiss R., Bock H., Pells S. et al. // J. of Biomechanics Engineering. 2011. Vol.133. P. 1–9.
6. Cross S. E., Jin Yu-Sh., Tondre J. et al. // Nanotechnology. 2008. Vol.19. P. 384003–384011.
7. Lee G. Y. H., Lim C. T. // Biomechanics approaches to studying human diseases, Trends Biotechnol. 2007. Vol. 25. P. 111–118.
8. Cremisi C., Duprey P. // J. Cell Physiol. 1986. Vol. 129. P. 230–236.
9. Kumar N., Gammell P., Meleady P. et al. // BMC Biotechnol. 2008. Vol. 8. P. 42.

E. S. DROZD, MOHAMMED SALEM A. A., O. S. SPIRIDONOVA, N. S. KUZHEL, S. A. CHIZHIK

INVESTIGATION OF CULTIVATION TEMPERATURE EFFECT ON SURFACE TOPOGRAPHY AND MECHANICAL PROPERTIES OF A HUMAN LUNG CANCER CELL LINE A549

Summary

The results of study the effect of temperature on the culture surface topography and mechanical properties of human lung cancer cell line A549 by atomic force microscopy are presented. It is shown that lowering the temperature of cultivation does not lead to significant changes in the mechanical properties of A549 cells, but the cells under the influence of low temperatures tend to increase the adhesive force between the probe tip to the membrane surface.