

14.3

Реакции мембраны клеток буккального эпителия человека на внешние микромеханические раздражители

© Н.А. Торхов, М.П. Евстигнеев, А.А. Мосунов, В.А. Бучельникова

Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

E-mail: trkf@mail.ru, aamosunov@sevsu.ru

Поступило в Редакцию 14 февраля 2022 г.

В окончательной редакции 18 апреля 2022 г.

Принято к публикации 27 апреля 2022 г.

Исследована реакция мембраны живой клетки буккального эпителия человека на внешние микромеханические раздражители. Установлена зависимость величины реакции от уровня пассивной или активной стимуляции — уровня силового воздействия. Показано, что клетка может проявлять как активные, так и пассивные реакции на внешний микромеханический раздражитель, а также управлять уровнем воздействия адгезионных сил.

Ключевые слова: клетка буккального эпителия человека, мембрана, микромеханический раздражитель, упругость мембраны, силовая спектроскопия АСМ.

DOI: 10.21883/PJTF.2022.13.52735.19165

Функциональное состояние клеток буккального эпителия человека (далее клеток) обладает большой информативностью относительно влияния внешних факторов на организм человека, что делает их удобным биологическим объектом для прижизненной диагностики большинства социально значимых заболеваний [1–4]. В то же время объем экспериментальных данных о реакции клеточных мембран на внешние механические раздражители все еще крайне недостаточен. В одних случаях это связано с условиями проведения экспериментов, в других — с отсутствием современных диагностических методов, позволяющих в едином цикле измерений регистрировать полный комплекс микромеханических параметров живых биологических объектов (модуля Юнга E , коэффициента продольной упругости K , адгезионных сил F_{adh} и их работы A_{adh} , пластической Δh_{deform} и упругой Δz деформаций). Таким образом, основная задача заключается в разработке эффективных методов количественного контроля того, как клетки воспринимают [5–7] и преобразовывают [8,9] внешние механические сигналы.

В работе были исследованы живые клетки буккального эпителия человека, полученные методом жидкостной цитологии на эпитаксиальной поверхности кремния при нормальных условиях (рис. 1, *a, b*). Проверка жизнеспособности клеток методом исключения красителя (трипановый синий) спустя 2.5 h показала положительный результат: большая часть клеток была устойчива к красителю, что было обусловлено адсорбционным слоем буферного раствора (3.03 mM фосфатный буфер (pH = 7.0) с добавлением 2.89 mM хлорида кальция) толщиной ~ 100 nm, оставшимся на поверхности клеток после приготовления образцов. Состояние жизнеспособности клеток контролировалось и по их внешнему виду (рис. 1, *b* и *c*). На мембранах погибших клеток происходила коагуляция белка, проявляющаяся на раст-

ровом изображении в виде дендритов пептидогликана (рис. 1, *c*).

Реакции клеточных мембран на внешний микромеханический раздражитель исследовались на воздухе при нормальных условиях с использованием атомно-силового микроскопа (АСМ) NTEGRA SPECTRA, измерения проводились кантилевером НА_FM/W₂C (радиус закругления острия иглы 35 nm) на базе ЦКП „Молекулярная структура вещества“ Севастопольского государственного университета. Использовался метод силовой спектроскопии $F_z = F_z(z)$ контактного режима сканирования (режим постоянной силы $F_z = F_{const} \approx 20$ nN), в котором снимались кривые подвода (рис. 2, кривые 1) и отвода (рис. 2, кривые 2).

В качестве эталонных использовались спектры кривых подвода и отвода, снятых на свободной поверхности кремния (рис. 2, *a*). На них можно выделить некоторые особенности, соответствующие силам отталкивания (рис. 2, *a*, кривая 1, $+F_{VW1}$, участок BC, барьер ϕ_b) и силам притяжения (рис. 2, *a*, кривая 1, $-F_{VW2}$ и кривая 2, $-F_{VW3}$). Линейный участок DE в обоих случаях в соответствии с законом Гука ($F = Kz$, где K — коэффициент упругости, а z — координата) описывает упругое механическое взаимодействие кантилевера с мембраной при наличии сил отталкивания.

Было обнаружено, что в зависимости от величины силы исходного воздействия F_{const} ответная реакция живой клетки может проявлять как активную, так и пассивную реакцию мембраны на внешний микромеханический раздражитель. Как следует из поведения кривых отвода, на поверхности клеточной мембраны присутствовал довольно толстый ($\Delta z_a < 100$ nm) адсорбционный слой буферного раствора (рис. 2, *b*, вставка).

К первому (пассивному) типу можно отнести упругие (аналог участка DE на рис. 2, *a*) ответные

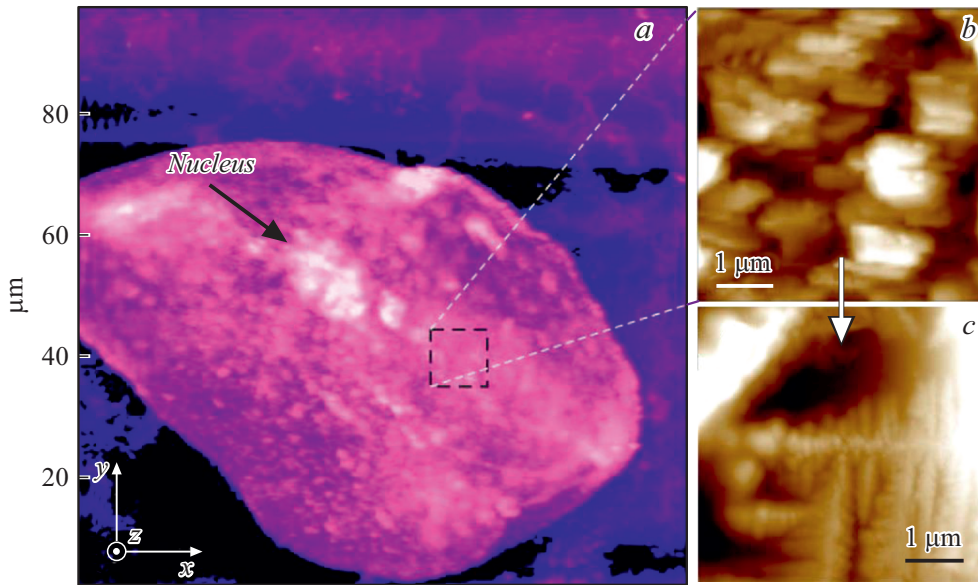


Рис. 1. Растровые 256×256 точек АСМ-изображения участков ($100 \times 100 \mu\text{m}$) рельефов $h(x, y)$ поверхности эпитаксиального $\text{Si}\{111\}$ с расположенной на ней взрослой живой клеткой буккального эпителия человека, полученные после проведения исследований методом силовой спектроскопии АСМ самой клетки (а), участка размером $5 \times 5 \mu\text{m}$ поверхности ее мембраны (b) и того же участка ($5 \times 5 \mu\text{m}$) мембраны уже неживой клетки после коагуляции ее белка спустя 30 min пребывания на воздухе при температуре 40°C (или > 4 h при комнатной температуре) (c).

реакции мембраны, вызванные внешним пассивным, т.е. незначительным, воздействием (рис. 2, b, случаи I и II), которые были обусловлены только ее упругими микромеханическими свойствами. В случае I при $F_{I, const1} = 4 \mu\text{N}$ упругая деформация составила $\Delta z_1 = 69 \text{ nm}$, а $K_1 = 65.7 \pm 0.2 \text{ N/m}$. В случае II при $F_{II, const1} = 6.2 \mu\text{N}$ упругая деформация составила $\Delta z_2 = 115 \text{ nm}$, а $K_2 = 67.4 \pm 0.15 \text{ N/m}$. На кривой подвода в непосредственной близости от поверхности наблюдалось отсутствие сил отталкивания (барьера ϕ_b), а на кривых отвода — возникновение адгезионных сил притяжения $F_{adh} \equiv F_{VW3} \approx -0.2 \mu\text{N}$ (аналог участка *BD*).

Второй (активный) тип ответных реакций возник при активной, т.е. более сильной, исходной стимуляции клеточной мембраны ($6 < F_{III, const1} < 21 \mu\text{N}$, при $F_{III, const1} = 10.1 \mu\text{N}$ упругая деформация составила $\Delta z_3 = 220 \text{ nm}$, а $K_3 = 80.2 \pm 1.18 \text{ N/m}$, рис. 2, b, случай III) и сопровождался активным сопротивлением мембраны, на что указывали отклонение от линейной зависимости (рис. 2, b, случай III, пунктирная прямая) и загиб вверх нелинейного участка кривой подвода. Появление незначительных пластических деформаций Δh_{deform} сопровождалось совершением работы, на что указывало появление гистерезиса между кривыми подвода и отвода (участок *DE*, рис. 2, b, случай III, кривые 1 и 2). Кривая отвода в этом случае проходит несколько ниже, но в относительной близости от кривой подвода, а клеточной мембране требовался минимум энергии для восстановления своего исходного состояния и возвращения кривой отвода на прежнюю траекторию. При этом

начинало появляться вырождение исходного значения $F_{III, const}$ в $F_{III, const1}$ и $F_{III, const2}$ (рис. 2, b, вставка).

Следует отметить, что качественное (не количественное) сходство в поведении кривых подвода и отвода наблюдали авторы [3] (но без их описания) при исследовании методом силовой спектроскопии АСМ эластичности локальных участков ($20 \times 20 \mu\text{m}$) мембран кишечных клеток человека *Caco-2*.

Третий (пассивный) тип ответных реакций возник при дальнейшем повышении уровня исходной стимуляции клетки более $F_{const} \geq 21 \mu\text{N}$ и сопровождался уже уменьшающимся сопротивлением мембраны — пассивным сопротивлением (рис. 2, b, случай IV, кривая 1). Согласно кривой подвода, повышение уровня исходного силового воздействия F_{const} также приводило к отклонению от линейной зависимости, но нелинейный участок (аналог участка *DE*) в этом случае отклонялся от линейной зависимости не вверх, а вниз (рис. 2, b, случай IV, пунктирная прямая). При этом увеличении размеров пластических деформаций $\Delta h_{deform4} = \Delta z_4 - z_{deform4} = 101 \text{ nm}$ ($\Delta z_4 = 321 \text{ nm}$, а $K_4 = 84.5 \pm 0.22 \text{ N/m}$) сопровождалось не увеличивающимися, а уменьшающимися внешними силовыми воздействиями, обусловленными пассивной реакцией клеточной мембраны. Иными словами, при уровне исходного силового воздействия $F_{const} > 21 \mu\text{N}$ мембрана клетки буккального эпителия человека уже не способна оказывать заметного сопротивления внешнему воздействию.

Из поведения кривых отвода видно, что в случаях III и IV силовых воздействий при постепенном уменьшении нагрузки начиная с определенного уровня

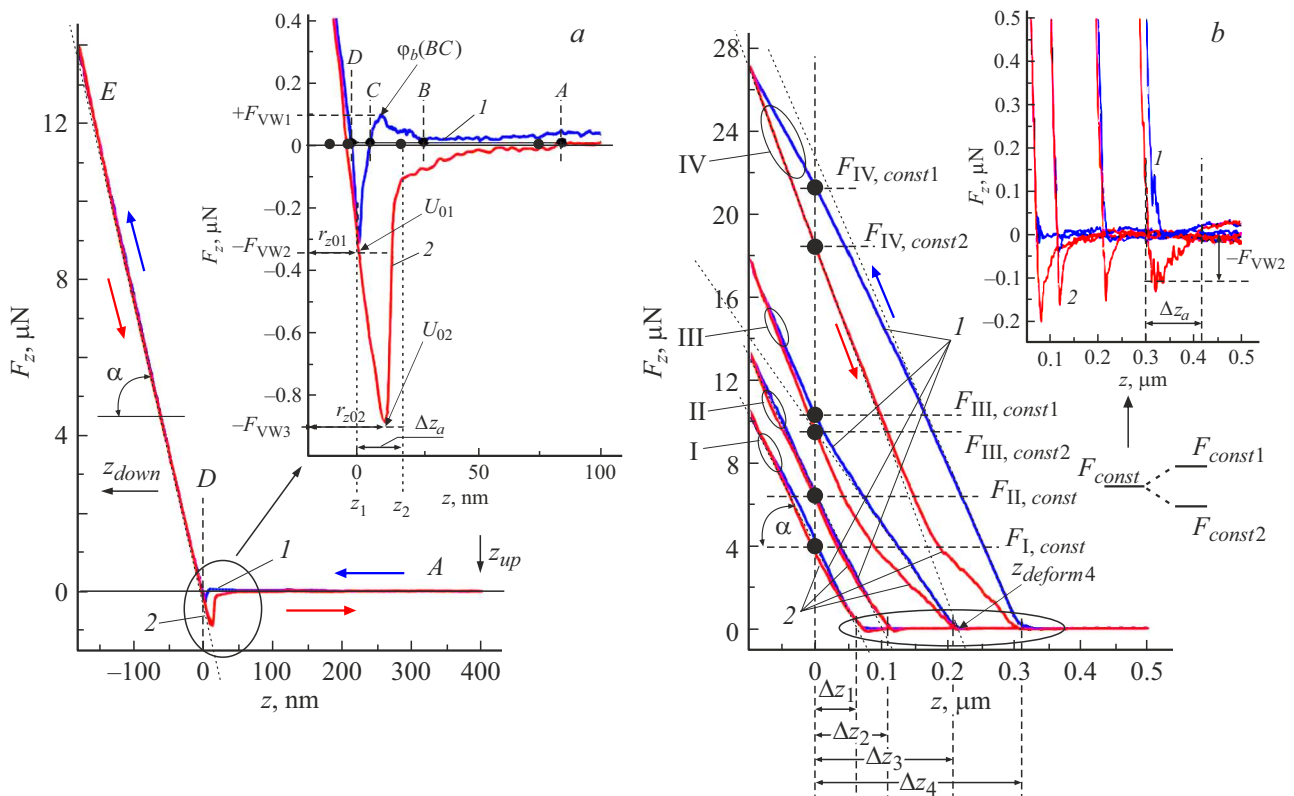


Рис. 2. Кривые подвода (1) и отвода (2) (метод силовой спектроскопии АСМ), снятые на эпитаксиальной поверхности кремния (a) и на поверхности мембраны клетки буккального эпителия человека при следующих значениях исходного силового воздействия: I — $F_{I, const1} = 4 \mu\text{N}$, II — $F_{II, const1} = 6.2 \mu\text{N}$, III — $F_{III, const1} = 10.1 \mu\text{N}$, IV — $F_{IV, const1} = 21.6 \mu\text{N}$ (b). На вставках представлены более подробные изображения в области адсорбционного слоя.

ния внешнего воздействия ($F_{(III,IV) const} \approx 5 \mu\text{N}$) клеточная мембрана начинает самостоятельно восстанавливать свою форму (рис. 2, b, кривые 2). Так, в обычном классическом варианте постепенное снятие нагрузки с пластически деформированного тела должно было бы привести кривую отвода в точку $z_{deform4}$, определяющую размер пластической деформации $\Delta h_{deform4}$ (рис. 2, b, случай IV, кривая 2). На самом деле, как следует из поведения кривой отвода, например, при $F_{IV, const} < 5 \mu\text{N}$ она возвращается на свою исходную траекторию, а мембрана начинает восстанавливать свои механические и геометрические свойства. При повторном снятии кривых подвода и отвода все повторялось аналогичным образом. Понятно, что такая нетривиальная ответная реакция мембраны на внешнее механическое воздействие не может быть сведена к простому механическому процессу и требует расхода внутренних энергетических и информационных ресурсов клетки. Отсутствие проколов на АСМ-изображениях, полученных после проведения силовых воздействий, указывает на то, что мембрана при проведении силовых воздействий не повреждалась (рис. 1, b).

Практически полное отсутствие барьера ϕ_b на кривых подвода в случаях III и IV свидетельствует об отсутствии гидрофобности у мембраны. Отрицательные

участки на кривых отвода в приповерхностной области указывают на наличие адгезионных сил притяжения $-F_{VW3} \approx -0.16 \mu\text{N}$ (аналог участка BD на вставке к рис. 2, a). Данный факт свидетельствует об относительно низкой гидрофильности и практически полном отсутствии гидрофобности исходного состояния клеточной мембраны. Низкая смачиваемость по отношению к подложке позволяет клетке более свободно перемещаться во внешней среде, а отсутствие гидрофобности — свободно преодолевать силы поверхностного натяжения.

Таким образом, было установлено, что клетки буккального эпителия человека могут проявлять не только пассивные, но и самопроизвольные активные реакции на внешний микромеханический раздражитель, а также управлять уровнем воздействия адгезионных сил.

Финансирование работы

Исследования выполнены при финансовой поддержке Севастопольского государственного университета (идентификатор проекта 42-01-09/90/2020-1).

Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам ин-

ституционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Одобрение на исследования с забором буккального эпителия получено Этическим комитетом СГУ (исследование № 3; 15 июля 2021 г.). Буккальный эпителий собирали в соответствии с правилами проведения исследований на человеческом материале в РФ. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] М.А. Пальцев, И.М. Кветной, В.О. Полякова, С.С. Коновалов, О.М. Литвякова, Н.С. Линькова, Н.Н. Севостьянова, А.О. Дурнова, Г.Х. Толибова, Молекулярная медицина, № 4, 18 (2012).
- [2] А.Г. Прошин, Н.А. Дурнова, В.Н. Сальников, М.Н. Курчатова, Н.В. Сальников, Вестн. мед. ин-та „РЕАВИЗ“, № 1, 74 (2019).
- [3] A. Kubiak, T. Zieliński, J. Pabijan, M. Lekka, Int. J. Mol. Sci., **21**, 8786 (2020). DOI: 10.3390/ijms21228786
- [4] E.N. Aybeke, S. Ployon, M. Brulé, B. De Fonseca, E. Bourillot, M. Morzel, E. Lesniewska, F. Canon, Langmuir, **35**, 12647 (2019). DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b01979
- [5] R.G. Bailey, R.D. Turner, N. Mullin, N. Clarke, S.J. Foster, J.K. Hobbs, Biophys. J., **107**, 2538 (2014). DOI: 10.1016/j.bpj.2014.10.036
- [6] M. Lasalvia, S. Castellani, P. D'Antonio, G. Perna, A. Carbone, A.L. Colia, A.B. Maffione, V. Capozzi, M. Conese, Exp. Cell Res., **348**, 46 (2016). DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.08.025
- [7] J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Grabulosa, X. Trepal, B. Fabry, R. Farré, D. Navajas, Biophys. J., **84**, 2071 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)75014-0
- [8] F.M. Ohnesorge, J.K.H. Horber, W. Haberle, C.-P. Czerny, D.P.E. Smith, G. Binnig, Biophys. J., **73**, 2183 (1997). DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78250-X
- [9] H. Tejada-Mora, L. Stevens, M. Gröllers, A. Katan, E. van de Steeg, M. van der Heiden, *AFM based elasticity of intestinal epithelium correlate with barrier function under drug action*, preprint (2019). DOI: 10.1101/761627