

Приложение А

к статье

Исследование геометрии рельефа мембраны клеток буккального эпителия человека методами атомно-силовой микроскопии

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

Севастопольский государственный университет, г. Севастополь

Методика приготовления образцов клеток буккального эпителия человека

В качестве объекта исследования выступали живые клетки буккального эпителия человека (далее – клетки) полученные методом жидкостной цитологии (рис. А1). Данный метод включал в себя следующие этапы: механический забор (соскоб) с внутренней поверхности щеки слизистой оболочки ротовой полости (рис. А2), промывание соскоба в фосфатном буфере (3.03 мМ фосфатного буфера с добавлением 2.89 мМ хлорида кальция объемом 5 мл, рН 7.0), помещение данной смеси в пробирку и сепарирование её содержимого в центрифуге в течении 5 мин с ускорением 1700g (5000 min^{-1}) (рис. А3), отбор из центрифужной пробирки аликвоты буферного раствора содержащего взвесь живых клеток буккального эпителия и её раскапывание на подложку. В качестве подложечного материала использовалась эпитаксиальная структура кремния р-типа проводимости р- р⁺- Si{111} с размером неровностей <20 нм. Для увеличения гидрофильных свойств и повышения адгезии поверхности кремниевая структура подвергалась обработке в парах гексаметилдисилазана.

После помещения капли аликвоты на эпитаксиальную поверхность кремния Si{111}, осуществлялось её подсушивание на воздухе при нормальном атмосферном давлении и температуре $T \leq 40 \text{ }^\circ\text{C}$ (рис. А4). Процесс удаления влаги из аликвоты контролировался визуально и по времени обычно не превышал 10 минут. Находящиеся в аликвоте живые клетки естественным образом осаждались на эпитаксиальную поверхность кремния и сохранялись на ней в таком виде в течении 3-4 часов после испарения основного количества влаги (рис. А5). На это указывали необратимые изменения в состоянии поверхности и морфологии их мембран происходившие, согласно проведенным исследованиям, после 3-4 часов пребывания клеток на воздухе, или более длительной >20 мин сушки при $T \leq 40 \text{ }^\circ\text{C}$ (рис. 1, с). Отметим, что используемый режим сушки оставлял на поверхности клеток адсорбционный слой буферного раствора толщиной порядка 100 нм, что поддерживало их жизнеспособность в течении относительно длительного пребывания на воздухе.



Рис. А1. Оптическое изображение окрашенной взрослой клетки буккального эпителия человека.

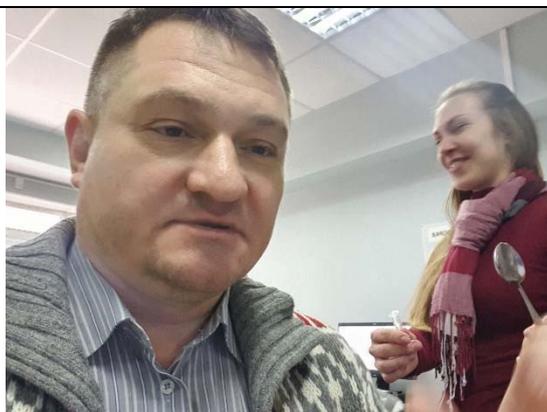


Рис. А2. Забор биологического материала для приготовления образцов клеток буккального эпителия человека.



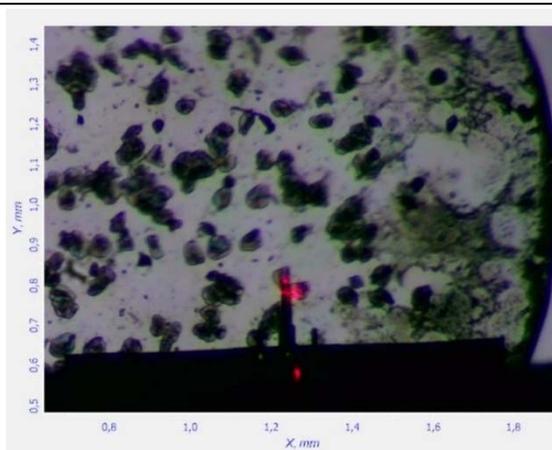
Рис. А3. Промывание соскоба в буферном растворе, помещение смеси в пробирку и её центрифугирование в течении 5 мин на 5000 оборотов/мин⁻¹.



Рис. А4. Подсушивание на прецизионной печи алиquotы на воздухе при нормальном атмосферном давлении и температуре $T \leq 40 \text{ }^\circ\text{C}$ в течении 10 минут.



a



b

Рис. А5. Оптические изображения образца с двумя каплями алиquotы на кремниевой поверхности $\text{Si}\{111\}$ – *a*) и увеличенный вид алиquotы содержащего взрослые живые клетки буккального эпителия человека расположенного под кантилевером на предметном столике АСМ – *b*).