

05

## Контактная атомно-силовая спектроскопия биологических тканей

© В.Г. Дедков, Е.Г. Дедкова

Российский университет дружбы народов, Москва  
Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный  
E-mail: ededkova@yandex.ru

Поступило в Редакцию 18 сентября 2009 г.

Впервые измерена величина сил адгезии нормальных и раковых клеток эпителия желудка человека к зонду атомно-силового микроскопа. Обнаружено значительное уменьшение (более чем на порядок величины) силы адгезии малигнизированных клеток и их контактной жесткости.

К числу важнейших применений атомно-силовой микроскопии (АСМ) в биологических исследованиях относится использование АСМ в качестве наномеханического сенсора, позволяющего изучать механические (упругие) и адгезионные свойства биоматериалов [1]. Так, авторами [2] было показано, что нормальные клетки эпителия человека имеют модуль Юнга, величина которого на порядок превышает модуль Юнга раковых клеток. Количественные экспериментальные данные по измерению адгезионных характеристик нормальных и раковых клеток, полученных методами АСМ, насколько нам известно, в литературе отсутствуют, хотя о наличии значительных изменений межклеточной адгезии опухолевых тканей известно достаточно давно [3].

В данной работе предпринята попытка изучения адгезионной способности поверхности опухолевой ткани на разных стадиях развития онкологического процесса. Для этого исследовались образцы малигнизированной ткани, полученные от больных, прооперированных по поводу рака желудка. Каждый образец был охарактеризован по принятой в клинической медицине системе TNT (Т — tumor, N — nodus, M — metastasis) [4]. В настоящее время рак желудка занимает одно из ведущих мест среди онкологических заболеваний. В частности, для мужского населения РФ среди прочих злокачественных опухолей рак желудка занимает второе место по частоте заболеваний, составляю-

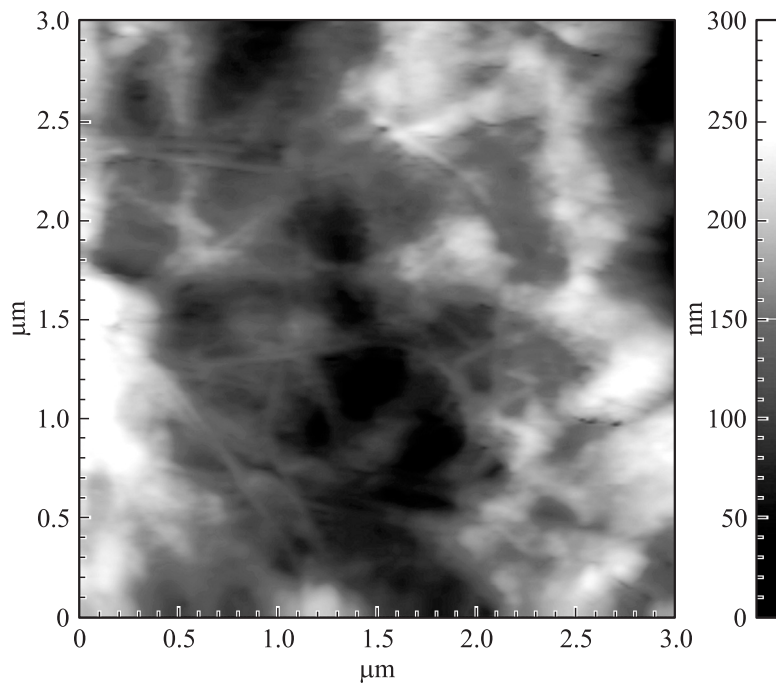
шей 14.7%. У женщин в РФ рак желудка встречается несколько реже. По частоте заболеваний он находится на третьем месте: 10.8% среди прочих злокачественных опухолей [5]. Ранняя диагностика и достоверный прогноз течения опухолевого процесса играют важнейшую роль при выборе тактики ведения больных онкологическими заболеваниями, поэтому возможность применения методов АСМ для изучения динамики малигнизации тканей представляет большой научный и практический интерес.

Для изучения сил адгезии нами использовался серийный зондовый микроскоп Solver Pro (компания „НТ–МДТ“). В качестве рабочей гипотезы мы выдвинули предположение о том, что опухолевая ткань имеет тем меньшую силу адгезии к зонду микроскопа, чем больше она склонна к метастазированию, т. е. чем на более поздней стадии развития находится опухоль.

Образцы тканей эпителия желудка получали из операционного материала *in situ* и далее замораживали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Хранение и транспортировка происходили при тех же условиях. Перед АСМ-исследованием из замороженного фрагмента ткани готовились срезы толщиной около  $10\ \mu\text{m}$ , которые помещались на кремниевые или стандартные поликоровые подложки, предварительно подвергнутые очистке спиртом и термообработке. Исследования проводились после полной разморозки препарата.

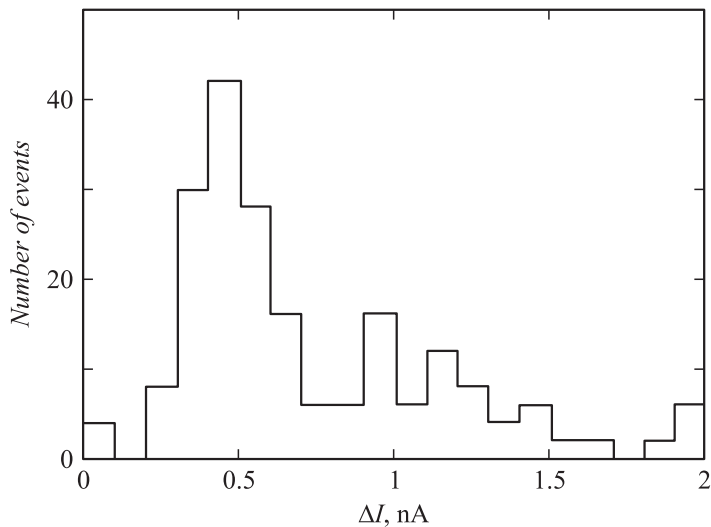
Ввиду значительных трудностей приготовления тонких срезов мягких тканей получение АСМ-изображений поверхности стандартными полуконтактными и контактными методиками достаточно сложно и не всегда осуществимо. Рис. 1 демонстрирует одну из удачных попыток в случае образца опухолевой ткани. Морфология участков нормальных тканей по внешнего виду мало чем отличается. Значительно более интересной является информация, получаемая в режиме контактно-адгезионной силовой спектроскопии. Нам удалось набрать достаточно большую статистику значений сил адгезионного отрыва мягких зондов типа CSG01 от нормальных и опухолевых тканей эпителия желудка. При проведении этих измерений в ручном режиме регистрируется изменение тока фотодиода микроскопа  $\Delta I$  в наноамперах при удалении образца от зонда по отношению к величине фототока в отсутствие контакта.

Необходимым условием количественного измерения сил адгезии на различных образцах является адекватная калибровка получаемых



**Рис. 1.** АСМ-изображение участка опухолевой ткани из эпителия желудка человека в топографической моде.

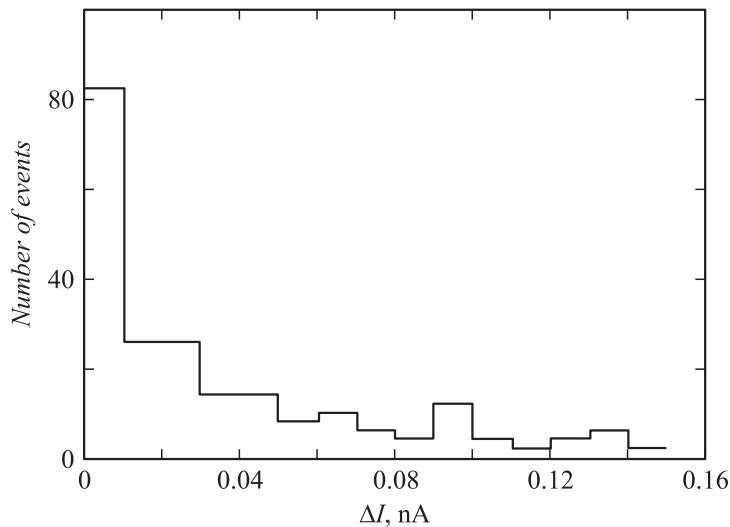
отрывных значений фототока. Для этой цели серии измерений на разных образцах должны выполняться последовательно одним и тем же зондом без изменения настройки тока фотодиода в случае замены образцов. Независимо от типа образца, при его отводе из-за сокращения пьезотрубки зонд остается на некоторое время „приклеенным“ к образцу адгезионной силой, поэтому вертикальная трансляция пьезосканера  $\Delta Z$  целиком трансформируется в деформацию балки кантилевера, изгибающейся в направлении движения сканера, что, в свою очередь, вызывает линейное приращение тока фотодиода  $\Delta I$ . При достижении критической силы адгезионного отрыва  $\Delta F_a$  зонд выходит из контакта, а регистрируемая величина изменения фототока  $\Delta I$  оказывается пропорциональной  $\Delta F_a$ . Для измерения величины силы адгезии в абсолютных



**Рис. 2.** Суммарная статистика адгезионных сил для нормальной ткани эпителия желудка человека. Для перевода значений фототока в nN данные оси абсцисс надо умножить на коэффициент 1.25 nN/nA.

единицах нужно использовать соотношение  $\Delta F_a = \frac{k_c}{\alpha} \Delta I$ , в котором  $k_c$  — жесткость балки кантилевера, а коэффициент  $\alpha$  представляет калибровочную постоянную „фототок–перемещение“, которая может быть определена по линейному участку контактной кривой подвода на поверхности жесткой подложки, свободной от биоткани:  $\alpha = \Delta I / \Delta Z$ . Измерение коэффициента наклона  $\alpha$  на эталонной поверхности также необходимо проводить без изменения настройки фотодиода. В свою очередь, жесткость балки должна контролироваться независимым способом. В нашей работе для этого использовался стандартный алгоритм [6], а величина  $k_c$  для применявшихся зондов оказалась близка к 0.03 N/m.

Оценку контактной жесткости образца  $k_s$ , пропорциональной его модулю упругости, можно сделать из условия  $B = \Delta F / \Delta I = \text{const}$  в случае линейных контактных участков нагрузочных зависимостей, соответствующих разным образцам, но также при неизменной калибровке тока фотодиода. В этом случае на жесткой эталонной подложке  $B = k_c / \alpha$ , а на мягком образце биоткани  $B = (\alpha')^{-1} k_c k_s / (k_c + k_s)$ ,



**Рис. 3.** То же, что на рис. 2 для опухолевых тканей. Коэффициент перевода в силу адгезии равен  $1.38 \text{ nN/nA}$ .

где  $\alpha$  и  $\alpha'$  — соответствующие коэффициенты наклона контактных линий. Приравнявая оба выражения, получим формулу для расчета контактной жесткости  $k_s = k_c \alpha' / (\alpha - \alpha')$ .

Суммарная статистика измерений сил адгезии нормальных и опухолевых образцов тканей показана на рис. 2, 3. Данные об отдельных образцах приведены в таблице. Как следует из рисунков, величина сил адгезии раковых клеток к зонду CSG01 более чем на порядок

Результаты измерений

Образец	$\langle \Delta I \rangle, \text{ nA}$	$\langle \Delta F_a \rangle, \text{ nN}$	$k_s, \text{ N/m}$
нормальный	0.77	0.96	0.03
$T_{2-3}N_xM_x$	0.063	0.087	0.002
$T_3N_xM_0$	0.06	0.083	0.002
$T_3N_xM_1$	0.038	0.052	—
$T_4N_3M_1$	0.042	0.058	—

меньше, чем в случае нормальных клеток. Таким образом, процесс агглютинации раковых клеток, увеличивающих их взаимную адгезию [3], сопровождается ее резким уменьшением по отношению к инородным телам (в нашем случае — к поверхности кремниевого зонда CSG01). Численные данные таблицы свидетельствуют также об уменьшении силы адгезии для клеток, находящихся на более поздней стадии развития опухолевого процесса (последние две строки таблицы). В свою очередь, данные последнего столбца подтверждают вывод [2] о значительном уменьшении модуля упругости раковых клеток.

Авторы выражают благодарность коллективу государственной Мариинской больницы (Санкт-Петербург) за предоставленные образцы тканей.

Работа выполнена при частичной поддержке ГК 02.512.11.2238.

## Список литературы

- [1] *Butt Y.-J., Cappella B., Cappi M.* // Surf. Sci. Rep. 2005. V. 59. P. 1.
- [2] *Weisenhorn A.L., Khorsandi M., Kasas S., Gotzos V., Butt H.-J.* // Nanotechnology 1993. V. 4. P. 106.
- [3] *Bell J.I.* // Mathematical modeling. North–Holland, 1083. P. 3.
- [4] *Хирургические болезни* / Под ред. М.И. Кузина. 2-е изд. М.: Медицина, 2000. С. 12.
- [5] *Аксель Е.М., Давыдов М.И.* Злокачественные новообразования в России и в странах СНГ в 2002 г. М.: Медицина, 2004. С. 110.
- [6] *Sader J.E.* // J. Appl. Phys. 1998. V. 84. P. 64.