

14.3

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

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

Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

E-mail: andrewmosunov@gmail.com

Поступило в Редакцию 11 ноября 2021 г.

В окончательной редакции 17 января 2022 г.

Принято к публикации 1 февраля 2022 г.

В рамках метода фрактальной геометрии проведен анализ формы броуновского рельефа поверхности оболочек клеток буккального эпителия человека. С использованием коэффициентов скейлинга η , ξ и фрактальной размерности D_f проведены оценки их фактических площадей $S_{c(fact)}$ и линейных характеристик l_f .

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, буккальный эпителий, фрактальное число.

DOI: 10.21883/PJTF.2022.07.52293.19074

Площадь внешних поверхностей клеток играет важную роль в их гомеостазе, а также в процессах стимуляции иммунной системы человека. Хорошо известно, что иммунная система человека реагирует не на количество, а на суммарную площадь поверхности инородных частиц и активируется при достижении ими определенного порогового значения, определяемого отношением полной площади поверхности частиц S_p к площади поверхности клетки $S_{c(fact)}$: $S_p/S_{c(fact)}$ [1,2]. При этом функциональные патологические изменения морфологии поверхности клеток буккального эпителия хорошо коррелируют с показателями нарушения гомеостаза организма человека в целом, что позволяет быстро и достаточно недорого оценить его состояние [3–7].

Кроме того, интенсивное развитие в настоящее время биомеханических наносистем подразумевает интеграцию человека с различными биомеханическими наноразмерными устройствами, что требует разработки методов изучения механических свойств организма человека на клеточном уровне. В частности, поверхность клеточной оболочки во многом определяет возможности ее механической фиксации и перемещения в среде или по внешней поверхности, а также способность инородных объектов, например нуль-мерных — квантовые точки (молекулы, фуллерены и др.), одномерных — квантовые нити (длинные органические молекулы, квантовые проволоки), двумерных и трехмерных — плоские и объемные нанобъекты, прикрепляться и перемещаться по ней [4]. В общем случае геометрические параметры рельефа клеточной мембраны необходимы для описания механизмов взаимодействия с ней различных внешних и внутренних объектов, их пройденного пути, импульса и скорости перемещения, совершаемой при этом механической работы, диссипации энергии, термодинамических потенциалов. Изучение подобных свойств клеток является основой для атомной и молекулярной наноинженерии (манипулирование нанобъектами, создание

микро- и наноструктурированных устройств) не только на поверхности, но и внутри клетки.

Несмотря на очевидные успехи в исследовании микромеханических свойств клеточных мембран [3,8–10], объем экспериментальных данных о форме и геометрии рельефа поверхности оболочек клеток буккального эпителия крайне недостаточен, и требуется дальнейшее изучение. Во многих случаях это связано с отсутствием необходимых подходов и методов исследования поверхностей живых биологических объектов на клеточном уровне.

Полученные методом жидкостной цитологии живые клетки буккального эпителия человека исследовались на воздухе при нормальных условиях на эпитаксиальной поверхности кремния Si{111} (рис. 1, а, см. также [дополнительные материалы, Приложение А](#)). Используемый режим сушки при приготовлении образцов позволял оставлять на поверхности клеток защитный адсорбционный слой буферного раствора толщиной порядка 100 нм. Этот слой предотвращал высыхание клеток и поддерживал их жизнеспособность в течение не менее 2.5 h пребывания на воздухе. Данный факт подтверждался методом исключения красителя (трипановый синий). Спустя 2.5 h большая часть клеток была устойчива к красителю.

Измерение рельефа поверхности клеточной оболочки осуществлялось с использованием атомно-силового микроскопа (АСМ) NTEGRA SPECTRA и кантилевера НА_FM/W₂C в контактном режиме сканирования (режим постоянной силы $F_z = F_{const} \approx 20$ нН) на базе ЦКП „Молекулярная структура вещества“ Севастопольского государственного университета (см. [дополнительные материалы, Приложение В](#)). Важной особенностью контактного метода является возможность прямого управления постоянным значением статической силы прижатия F_{const} . Это позволяет, в частности, работать с адсорбционными слоями различной толщины и природы.

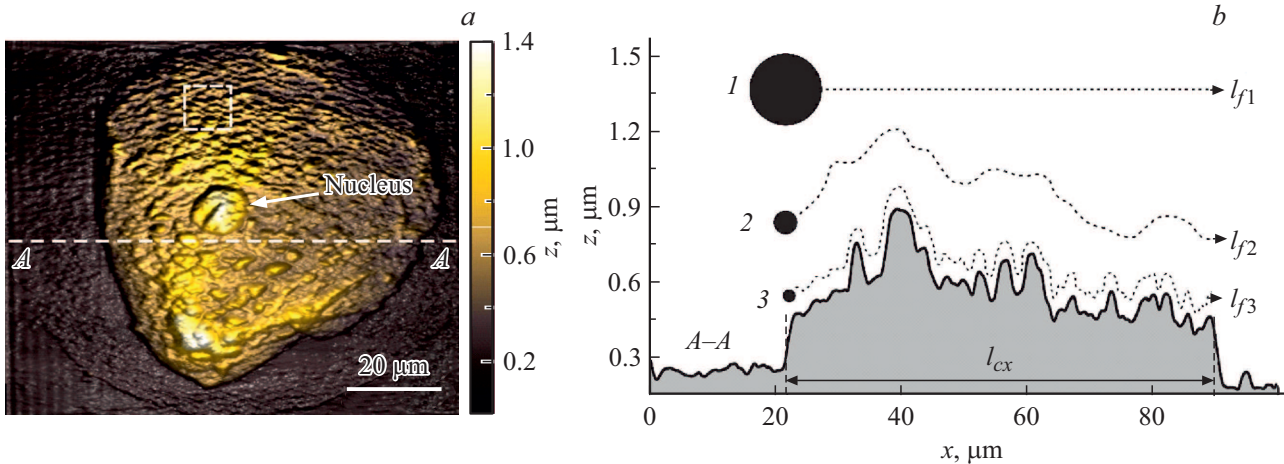


Рис. 1. *a* — растровое 3D-изображение рельефа $h(x, y)$ участка ($100 \times 100 \mu\text{m}$) поверхности эпитаксиального кремния Si{111} с расположенной на нем взрослой живой клеткой буккального эпителия человека, полученное контактным АСМ-методом сканирования в режиме постоянной силы; *b* — профиль $h(x)$ поперечного сечения рельефа А–А со схематичным представлением траекторий движения микрочастиц (1 — $5.00 \mu\text{m}$, 2 — $0.32 \mu\text{m}$) и наночастиц (3 — 100nm).

Подобный подход объединял преимущества „сухого“ [7] и „мокрого“ [11] методов сканирования.

Анализ параметров рельефа поверхности клеточной оболочки (фактической площади $S_{c(fact)}$ и длины профиля сечения l_f) осуществлялся в рамках математического аппарата фрактальной геометрии путем определения значений коэффициентов скейлинга η , ξ и фрактальной размерности D_f (см. дополнительные материалы, Приложение С) [12]. Для нахождения этих параметров использовался пакет программного обеспечения „Fractal analysis“ атомно-силового микроскопа NTEGRA SPECTRA производства NT-MDT, а также пакет векторной графики лицензионного программного обеспечения „Corel DRAW Graphics Suite X8“. Значения параметров η , ξ и D_f определялись из подсчета замкнутых контуров (см. нижнюю вставку на рис. 2, *a*), полученных после проведения процедуры трассировки неровностей рельефа (см. верхнюю вставку на рис. 2, *a*). Изменяя таким образом измерительный масштаб l в ξ раз, мы получали η вписанных друг в друга контуров, удовлетворяющих правилу топологического смешивания: контуры не пересекались между собой (нижняя вставка на рис. 2, *a*).

$$S_{c(fact)} = S_{c(x,y)} \left[\frac{l_i}{l_0} \right]^{D_f - D_T}, \quad l_f = l_{cx} \left[\frac{l_i}{l_0} \right]^{D_f - D_T}. \quad (1)$$

Согласно полученным результатам, поверхность мембраны клетки буккального эпителия человека не является гладкой, а имеет достаточно развитый броуновский рельеф $h(x, y)$, образованный хаотично расположенными складками, выступами и другими неровностями с вертикальными размерами до 500nm . Статистический анализ выявил нетривиальную зависимость средних значений неровностей рельефа $h(x, y)$ от способов его измерения — точки зрения внешнего наблюдателя (рис. 2, *b*). В этом случае гистограммы распределения

неровностей $N = N(h)$ рельефа (среднее значение $\langle h \rangle$ и дисперсии σ — среднеквадратического отклонения $\sqrt{\sigma^2}$ (стандартный разброс)) зависят не только от размеров измерительного масштаба l , но и от способов его получения.

Так, увеличение линейного измерительного масштаба l за счет увеличения линейных размеров квадратного участка от 5×5 до $20 \times 20 \mu\text{m}$ при постоянном разрешении 256×256 точек (пикселей) приводит к увеличению значений этих параметров (рис. 2, *b*, гистограммы 1–3). Несколько меньшее увеличение значений этих параметров происходит при увеличении l за счет уменьшения количества точек (пикселей) сканирования от 512 до 128 при постоянных линейных размерах $10 \times 10 \mu\text{m}$ (рис. 2, *b*, гистограммы 1'–3'). Напомним, что в глобальном приближении (классический случай) изменение размеров измерительного масштаба приводит к изменению дисперсии при постоянстве средних значений. Таким образом, сильная зависимость от начальных условий (состояние клетки и способ подготовки образца), зависимость значений параметров системы от точки зрения внешнего наблюдателя (размеров l) и свойство топологического смешивания являются необходимыми и достаточными признаками для отнесения рельефа оболочки клеток буккального эпителия к хаотическим системам. Для описания таких систем в настоящее время успешно применяется математический аппарат фрактальной геометрии [12].

Используя соотношения (1), связывающие геометрические параметры поверхности клеточной мембраны с ее коэффициентами скейлинга и фрактальной размерностью, можно найти значения $S_{c(fact)}$ и l_f . Из (1), в частности, следует, что частицы с размерами $\geq 5 \mu\text{m}$ не будут чувствовать неровности рельефа поверхности мембраны исследуемой клетки и будут преодолевать ее

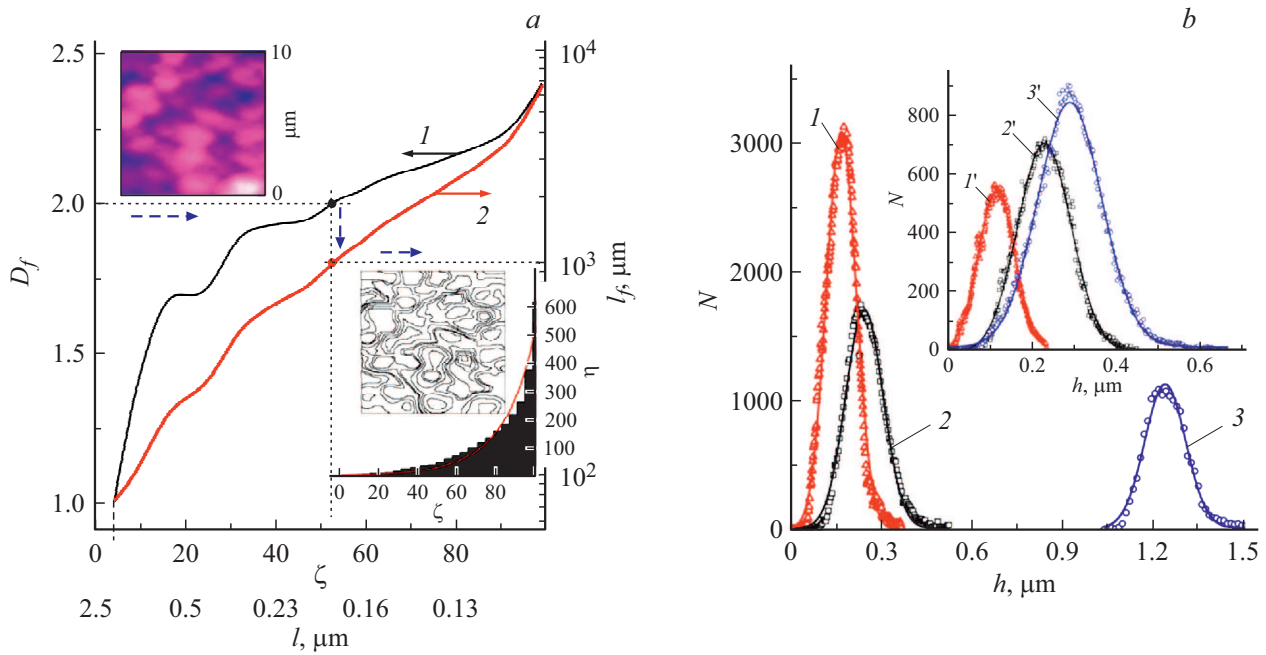


Рис. 2. *a* — зависимости фрактальной размерности D_f (1) и фактической длины пройденного пути $l_f = l_f(D_f)$ (2) от значений коэффициента скейлинга ξ . Под значениями ξ указаны соответствующие им значения l для исследуемого участка. На верхней вставке представлена топология исследуемого участка ($10 \times 10 \mu\text{m}$), на нижней — его контурное изображение с экспоненциальной аппроксимацией (сплошная линия) „чертовой“ лестницы $\eta = 1.628 \exp(\xi/17.527)$. *b* — типичные гистограммы $N = N(h)$ распределения неровностей рельефа квадратного участка поверхности мембраны живой клетки буккального эпителия человека в зависимости от способа измерения при постоянном разрешении 256×256 пикселей и различных линейных размерах: 1 — $5 \times 5 \mu\text{m}$, 2 — $10 \times 10 \mu\text{m}$, 3 — $20 \times 20 \mu\text{m}$. На вставке — гистограммы распределения при постоянном размере ($10 \times 10 \mu\text{m}$) участка и различном разрешении: 1' — 512×512 пикселей, 2' — 256×256 пикселей, 3' — 128×128 пикселей.

по прямолинейной траектории с $D_f = D_T = 1$ длиной $l_f = l_{cx} \approx 68.6 \mu\text{m}$, практически совпадающей с проекцией профиля сечения рельефа l_{cx} на основание ($0;x$) (рис. 1, *b*, траектория 1). Важной точкой на зависимости $D_f = D_f(l)$ является точка с $D_f = 2$, соответствующая значению $l \approx 200 \text{ nm}$ (рис. 1, *b*, траектория 2). Частицы с такими размерами будут воспринимать рельеф оболочки как двумерную поверхность с $D_f = 2$ ($l_i = 68.6 \mu\text{m}$, $l_0 = 0.2 \mu\text{m}$, $D_T = 1$), а для ее преодоления им понадобится пройти в среднем $l_f \approx 23\,530 \mu\text{m}$. Частицы размером менее $\sim 200 \text{ nm}$ будут чувствовать практически все неровности рельефа поверхности и перемещаться по мембране как по трехмерной фрактальной поверхности с $D_f > 2$, что приведет к существенному увеличению их пути. Например, для частицы размером $l \leq 100 \text{ nm}$ $D_f = 2.40$ ($l_i = 68.6 \mu\text{m}$, $l_0 = 0.1 \mu\text{m}$, $D_T = 1$) этот путь может превышать $l_f > 641\,472 \mu\text{m}$ (рис. 1, *b*, траектория 3). Согласно (1), фактическая площадь верхней поверхности оболочки исследуемой клетки более чем в 13.6 раза превысила площадь ее проекции $S_{c(x,y)} \approx 4848.33 \mu\text{m}^2$ и для $l = 0.1 \mu\text{m}$ ($l_i = 68.6 \mu\text{m}$, $D_T = 2$, $D_f = 2.40$) составила $S_{c(fact)} \approx 66\,088 \mu\text{m}^2$.

Экспериментальные исследования процессов перемещения частиц по поверхности клеточной мембраны подтверждают эти выводы. На рис. 3 представлено изображение края клетки буккального эпителия человека,

граничащего с поверхностью кремниевой подложки, содержащей большое количество адсорбированных микро- ($< 2 \mu\text{m}$) и наночастиц ($> 30 \text{ nm}$). Наблюдаемые нано- и микрочастицы образовывались на кремниевой подложке при высыхании буферного раствора. Исследование фазового состава показало, что поверхность мембран при этом была свободна от таких частиц. По всей вероятности, это объяснялось присутствием на мембране защитного слоя буферного раствора.

Как следует из этого рисунка, наиболее крупные ($> 1 \mu\text{m}$) частицы (например, частицы 1 и 2 на рис. 3, *a*) первыми достигают поверхности клетки и начинают перемещаться по ней. Об этом свидетельствует повышенная концентрация таких частиц на поверхности мембраны — градиент концентрации по отношению к кремниевой подложке. При этом на поверхности подложки практически отсутствуют (за исключением частиц 1 и 2 на рис. 3, *a*) частицы с размерами более одного микрометра: все они не только находятся на поверхности мембраны, но и успели сформировать там достаточно большие скопления (обведенные штриховыми линиями области на рис. 3). Данные выводы хорошо согласуются с изображением фазового контраста: наночастицы размером менее 400 nm практически все остались на поверхности кремниевой подложки, в то время как более крупные частицы почти все располагаются на

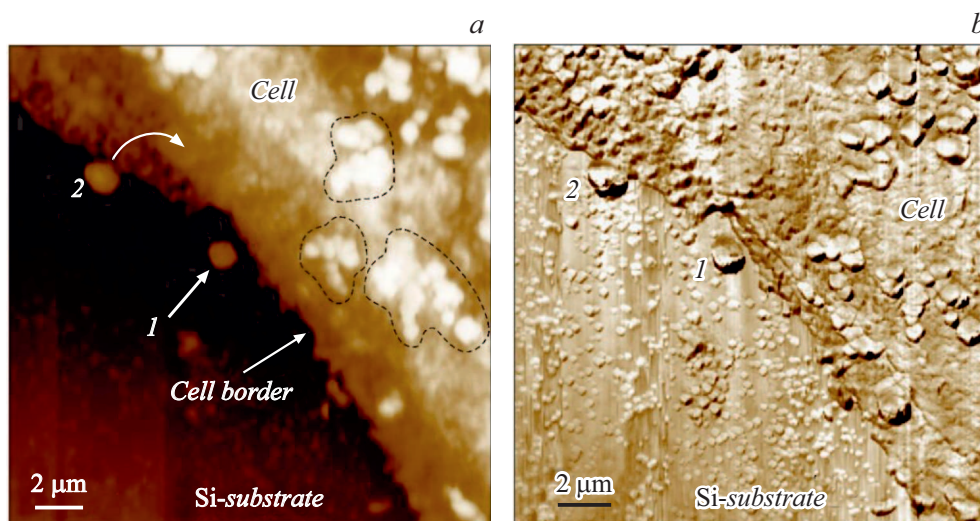


Рис. 3. АСМ-изображения участка ($20 \times 20 \mu\text{m}$) поверхности края клетки буккального эпителия человека, расположенной на кремниевой подложке с адсорбированными на ней микро- и наночастицами (а), и его фазового контраста (b).

клеточной мембране (рис. 3, b). В частности, пока частица 1 размером $\sim 1 \mu\text{m}$ приближается к поверхности мембраны, другая (аналогичная) частица 2 уже достигла ее поверхности.

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 институционального 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 Российской Федерации. 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] A.S. Shanbhag, J.J. Jacobs, J. Black, J.O. Galante, T.T. Glant, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **342**, 205 (1997).

- [2] A. Poliakov, V. Pakhaliuk, V.L. Popov, *Front. Mech. Eng.*, **6** (4), 16 (2020). DOI: 10.3389/fmech.2020.00004
- [3] E.N. Aybeke, S. Ployon, M. Brulé, B. De Fonseca, E. Bourillot, M. Morzel, E. Lesniewska, F. Canon, *Langmuir*, **35** (39), 12647 (2019). DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b01979
- [4] Н.Н. Беляева, Л.П. Сычева, В.С. Журков, *Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека: методические рекомендации* (М., 2005).
- [5] А.Г. Прошин, Н.А. Дурнова, В.Н. Сальников, М.Н. Курчатова, Н.В. Сальников, *Вестн. РЕАВИЗ*, № 1(37), 74 (2019).
- [6] A. Kubiak, T. Zieliński, J. Pabijan, M. Lekka, *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (22), 8786 (2020). DOI: 10.3390/ijms21228786
- [7] 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).
- [8] H. Tejada-Mora, L. Stevens, M. Gröllers, A. Katan, E. van de Steeg, M. van der Heiden, *Biophys. J.* (Posted September 10, 2019). DOI: 10.1101/761627
- [9] A.A. Wagh, E. Roan, K.E. Chapman, L.P. Desai, D.A. Rendon, E.C. Eckstein, C.M. Waters, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **295** (1), L54 (2008). DOI: 10.1152/ajplung.00475.2007
- [10] R.G. Bailey, R.D. Turner, N. Mullin, N. Clarke, S.J. Foster, J.K. Hobbs, *Biophys. J.*, **107** (11), 2538 (2014). DOI: 10.1016/j.bpj.2014.10.036
- [11] 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** (1), 46 (2016). DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.08.025
- [12] Е. Федер, *Фракталы* (Мир, М., 1991).