

УДК 577.35.085, 577.2:616-006

## Контактная атомно-силовая спектроскопия раковых клеток из эпителия желудка человека

В. Г. Дедков\*, Е. Г. Дедкова†

\* Кафедра теоретической физики

Российский университет дружбы народов

Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

† Московский физико-технический институт (МФТИ)

Институтский пер., д. 9, 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Россия

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

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, адгезия, малигнизация.

### 1. Введение

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 из эпителия человека имеют модуль Юнга, величина которого на порядок превышает модуль Юнга раковых клеток. Насколько нам известно, количественные экспериментальные данные АСМ по изменению адгезионных характеристик нормальных и раковых клеток в литературе отсутствуют, хотя о наличии значительных изменений межклеточной адгезии опухолевых тканей известно достаточно давно [3].

В настоящее время рак желудка занимает одно из ведущих мест среди онкологических заболеваний. В РФ, в частности, для мужского населения рак желудка среди прочих злокачественных опухолей занимает второе место по частоте заболеваний (14,7%). У женщин частота заболеваемости раком желудка находится на третьем месте: 10,8% среди прочих злокачественных опухолей [4]. Очевидно, что 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 значительный научный и практический интерес.

Целью данной работы является изучение 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 характеризовался по принятой в клинической медицине системе TNM (T — tumor, N — nodus, M — metastasis) [5].

### 2. Эксперимент и обработка результатов измерений

Для изучения сил адгезии использовался серийный зондовый микроскоп Solver Pro (“NT-MDT”). В качестве рабочей гипотезы было выдвинуто предположение о

---

Статья поступила в редакцию 25 мая 2010 г.

Авторы выражают благодарность коллективу государственной Мариинской больницы (г. Санкт-Петербург) за предоставленные образцы тканей. Работа выполнялась при частичной поддержке ГК 02.512.11.2238.

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 мкм, которые помещались на кремниевые или стандартные поликорковые 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. Результат удачного сканирования в случае образца опухолевой ткани демонстрирует рис. 1. Изображение участка поверхности нормальных тканей по внешнему виду мало чем отличается. Значительно более интересной является информация, получаемая в режиме контактно-адгезионной силовой спектроскопии.

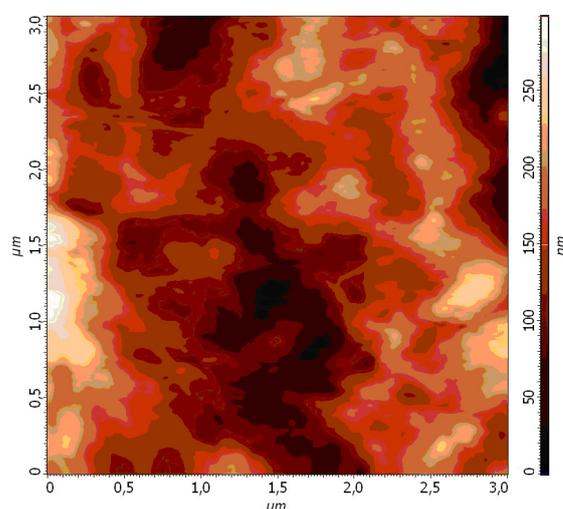


Рис. 1. АСМ-изображение участка опухолевой ткани из эпителия желудка человека в топографическом режиме

Нам удалось набрать достаточно большую статистику значений сил адгезионного отрыва мягких зондов типа CSG01 от нормальных и опухолевых тканей из эпителия желудка. При проведении этих измерений в ручном режиме регистрировалось изменение тока фотодиода микроскопа  $\Delta I$  в наноамперах при удалении образца от зонда по отношению к величине фототока в отсутствие контакта.

Необходимым условием для проведения количественного анализа сил адгезии на различных образцах является тщательная калибровка получаемых 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 исследуемого образца, при его отводе из-за сокращения пьезотрубки зонд остается на некоторое время «приклеенным» к образцу адгезионной силой, поэтому вертикальное перемещение 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 единицах использовалось соотношение  $\Delta F_a = \frac{k_c}{a}$ , в котором  $k_c$  — жёсткость балки кантилевера, а коэффициент  $a$  представляет калибровочную постоянную «фототок–перемещение», которая определялась по линейному участку контактной кривой подвода на поверхности жесткой подложки, свободной от биоткани:  $a = \frac{\Delta I}{\Delta Z}$ . Измерение коэффициента наклона  $a$  на эталонной поверхности также должно выполняться без изменения настройки фотодиода. В свою очередь, жёсткость балки необходимо контролировать независимым способом. В нашей работе для этого использовался стандартный алгоритм [6], а величина для применявшегося зонда оказалась равной 0,029 Н/м.

При наличии надёжно измеренных линейных контактных участков нагрузочных зависимостей «фототок–перемещение», соответствующих разным образцам, оценки контактной жёсткости  $k_c$ , пропорциональной их модулям упругости, можно сделать из условия  $B = \frac{\Delta F}{\Delta I} = \text{const}$  (при неизменной калибровке тока фотодиода). В этом случае на жёсткой эталонной подложке будем иметь  $B = \frac{k_c}{a}$ , а на мягком образце биоткани  $B = \frac{k_c k_s}{(k_c + k_s) a'}$ , где  $a$  и  $a'$  — соответствующие коэффициенты наклона контактных линий. Приравняв оба выражения, получим формулу для расчета контактной жёсткости:  $k_s = \frac{k_c a'}{a - a'}$ .

### 3. Результаты

Суммарная статистика измерений сил адгезии образцов нормальных и онкологических тканей показана на рис. 2, 3 (гистограммы 1 и 2).

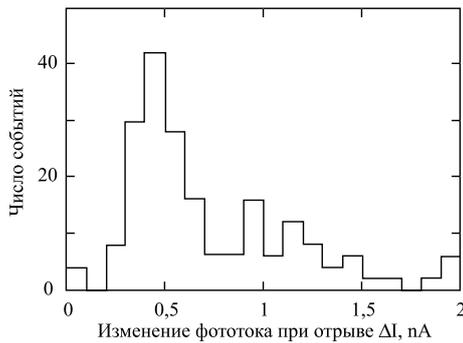


Рис. 2. Суммарная статистика адгезионных сил для нормальной ткани из эпителия желудка человека. Коэффициент перевода значений фототока в нА по оси абсцисс — 1,25 нН/нА

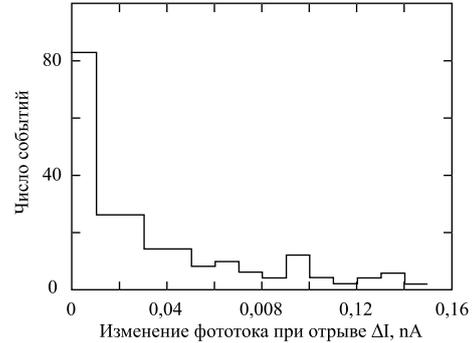


Рис. 3. Суммарная статистика адгезионных сил для метастазированных тканей. Коэффициент перевода значений фототока в нА в силу адгезии равен 1,38 нН/нА

Данные об отдельных образцах приведены в табл. 1. Во втором и третьем столбцах приведены средние значения отрывных величин фототока и сил адгезии, а в третьем — значения контактной жёсткости. Как следует из рис. 2 3, величина сил адгезии раковых клеток к зонду CSG01 более чем на порядок 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 табл. 1 свидетельствуют также об уменьшении силы адгезии для клеток, находящихся на более поздней стадии развития опухолевого процесса (последние две строки таблицы). Кроме того, данные последнего столбца подтверждают вывод авторов работы [2] о значительном уменьшении модуля упругости раковых клеток.

Таблица 1

## Результаты измерений

Образец	$\langle \Delta I \rangle$ , nA	$\langle \Delta F_a \rangle$ , nN	$k_s$ , 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	—

## Литература

1. *Butt Y.-J., Cappella B., Cappl M.* Force Measurements with the Atomic Force Microscope: Technique, Interpretation and Applications // *Surf. Sci. Rep.* — 2005. — Vol. 59. — Pp. 1–110.
2. *Weisenhorn A. L., Khorsandi M., Kasas S.* Scanning Force Microscopy Corrected for nm-Scale Simple Elasticity // *Nanotechnology.* — 1993. — Vol. 4. — Pp. 106–110.
3. *Bell J. I.* Mathematical Modeling. — Amsterdam: North-Holland, 1983.
4. *Аксель Е. М., Давыдов М. И.* Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2002 г. — М.: Медицина, 2004.
5. Хирургические болезни / под ред. М. И. Кузина. — 2-е издание. — М.: Медицина, 2000.
6. *Sader J. E.* Frequency Response of Cantilever Beams Immersed in Viscous Fluids with Applications to the Atomic Force Microscope // *J. Appl. Phys.* — 1998. — Vol. 84. — Pp. 64–76.

UDC 577.35.085, 577.2:616-006

## Atomic Force Spectroscopy of Human Stomach Epithelium

V. G. Dedkov\*, E. G. Dedkova†

\* *Theoretical Physics Department  
Peoples' Friendship University of Russia  
6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia*

† *Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT),  
9, Institutskii per., 141700, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

For the first time, we have measured adhesion forces between normal and malignant tissues extracted from human stomach epithelium and the tip of an atomic force microscope. We have found a significant decrease (more than by an order of value) of the adhesion forces of malignant cells, and their contact stiffness, as well.

**Key words and phrases:** atomic-force spectroscopy, adhesion, malignizatio.