

УДК 578.086+577.245

© 2005

О. П. Манджос, О. В. Карпов

## Вплив комплексного індуктора інтерферону на клітинну поверхню: дані атомно-силової мікроскопії

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. С. Малютюю)

*Atomic force microscopy is used to study the structure changes developing during the interaction of cell membranes with a new interferon type I inducer — molecular complex of single-stranded RNA with tilorone hydrochloride. Amplitude images have been obtained for piglet testicular cells (PTC) cultivated as monolayers on the glass surface. Significant changes of cell membranes have been shown to become more pronounced following the prolonged inducer incubation with cells. The data obtained are interpreted as a consequence of the former presumption concerning the specificity of a membrane deformation as the first stage of the interferon induction.*

Серед препаратів біологічно активних сполук природного походження, що знайшли широке застосування в терапії вірусних та онкологічних захворювань, є препарати інтерферонів (ІФН). Однак, незважаючи на численні дослідження всіх аспектів отримання та використання ІФН у клінічній практиці, деякі ключові питання, зокрема щодо експресії генів ІФН, залишаються невирішеними.

Експресія генів ІФН здійснюється внаслідок їх індукції, тобто позаклітинної активації. У випадку ІФН I типу ( $\alpha/\beta$ -ІФН) як індуктори можуть виступати віруси, дволанцюгові природні та синтетичні РНК, а також ряд низькомолекулярних синтетичних сполук [1]. При цьому механізм передачі сигналу від індуктора до регуляторних систем відповідних генів досі не встановлений. Зроблено припущення, що початковим етапом даного механізму може бути специфічна деформація поверхні мембран, яка виникає при контакті клітин з індуктором [2].

Метод атомно-силової мікроскопії (АСМ) [3] є одним з найбільш інформативних серед сучасних методів вивчення як структури клітинних мембран [4, 5], так і їх взаємодії з різноманітними лігандами [6]. Цей метод дозволяє досягти субнанометрового розрізнення на зображеннях біологічного матеріалу в межах від поодиноких біомолекул до інтактних клітин. До того ж, на відміну від електронної мікроскопії, за допомогою АСМ можна отримувати зображення живих клітин у розчинах, включаючи культуральні середовища, у повітрі, а також після відповідних гістологічних маніпуляцій [7–9]. З огляду на вказані властивості даного методу ми застосували його для вивчення впливу комплексного індуктора ІФН на поверхню клітинних мембран.

Досліди проводили на клітинах первинної трипсинізованої культури тестикул поросят (ПТП), отриманої з НДІ ветеринарії УААН. Клітини вирощували на накривних скельцях в 35-мм пластикових чашках Петрі ("Falcon", США). Культивування клітин проводили за загальноприйнятим методом [10], використовуючи живильне середовище 199 (НВП "Біо-Тест-Лабораторія", Україна) з додаванням 5–10% ембріональної сироватки телят ("Serwa"), 25 мМ 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазіноетансульфонової кислоти (HEPES) ("Serwa"), 10 мМ L-глутаміну та антибіотиків — пеніциліну і стрептоміцину або канаміцину в концентраціях 0,1% при 37 °С та 5% вмісті двоокису вуглецю в газовій фазі. При густині інокуляції  $10^5$  клітин/см<sup>2</sup> і тривалості вирощування 2 доби на склі формувався нещільний моношар клітин ПТП з окремими групами по 5–20 клітин, що полегшувало подальше позиціонування зонда на поверхні скла і сканування клітин.

Як індуктор ІФН використовували молекулярний комплекс одноланцюгова РНК — тилорон (МК), здатний індукувати ІФН I типу в умовах *in vitro* та *in vivo*, який готували згідно з [11]. Компонентами комплексу були РНК дріжджів (комерційний препарат, "Біохімреактив", Латвія) та тилорон гідрохлорид ("Sigma", США). Індуктор розчиняли в середовищі 199 до концентрації 25 мкг/мл і наносили на промитий цим же середовищем моношар клітин зразків, інкубуючи протягом відповідного інтервалу часу при 37 °С.

Зразки для АСМ готували згідно з [12]. Скельця з клітинними моношарами двічі промивали фосфатно-сольовим буфером (рН — 7,2) і занурювали на 15 хв у 2% розчин глютарового альдегіду в тому ж буфері. З метою попередження появи артефактів на поверхні клітин використовували розчини з температурою 37 °С. Дофіксацію клітинного моношару зразків проводили в свіжому 2% розчині глютарового альдегіду при 20 °С протягом 2 год з дворазовою зміною розчину, після чого зразки ретельно відмивали фосфатним буфером від залишків фіксатора і зневоднювали послідовним промиванням в сумішах вода — ацетон (50, 60, 70, 80%) та 100% ацетоні, а потім сушили декілька годин на повітрі при кімнатній температурі.

Зображення клітинних поверхонь отримували на мікроскопі NanoScope III (Digital Instruments, США) в безконтактному режимі з використанням стандартних кремнієвих зондів NSG-11 (NT-NTD, Росія). Обробку даних проводили з використанням програми WSxM 4.0 Develop 4.5, 2003 (Nanotech Electronica S. L.), розробленої для скануючої зондової мікроскопії.

Відомо, що фіксація поверхні клітин за допомогою глютарового альдегіду підвищує жорсткість клітинної стінки і збільшує розрізняльну здатність методу АСМ [13]. Це особливо важливо для спостереження змін, які можуть викликати окремі молекули на мембрані. Крім того, поверхня клітин має значні нерівності у вигляді вигинів цитоплазматичної мембрани та елементів цитоскелета. Тому для виділення дрібних флуктуацій, що можуть утворитися при адсорбції індуктора на поверхні клітин, ми використали прийом фільтрації даних. Для цього за допомогою спектрального Фур'є-фільтра було видалено низькочастотні



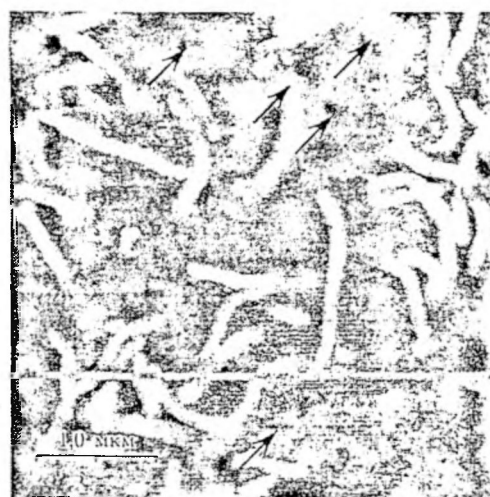
a



б



в

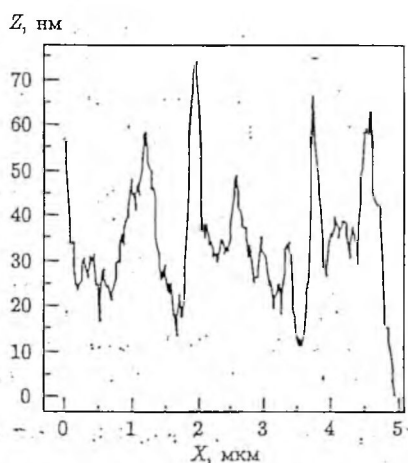


г

Рис. 1. Зображення поверхні клітин ПТП: а — без індуктора (контроль), б — через 15 хв, в — через 30 хв, г — через 60 хв взаємодії клітин з МК

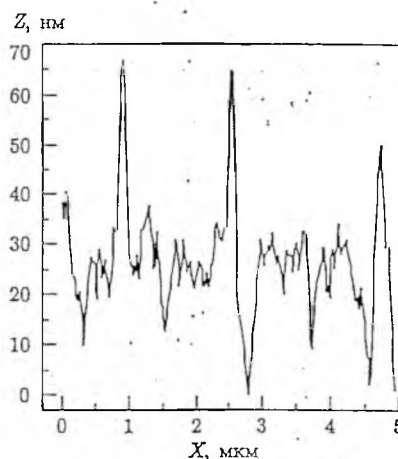
складові спектра, що підвищило контрастування високочастотних компонентів. На рис. 1 наведено перетворені зображення поверхонь клітин ПТП розміром  $5 \times 5$  мкм без та при інкубації з індуктором протягом 15, 30 та 60 хв. На рис. 1, в чорними стрілками відмічено виступи, природу яких ми пов'язуємо з адсорбованими молекулами МК. На рис. 1, г стрілками позначено інвагінації, що можуть виникати при проходженні дволанцюгових фрагментів МК крізь клітинну стінку. Видимі на цьому ж рисунку довгі світлі нитки являють собою мікротрубочки — неодмінні деталі цитоскелета.

З метою кількісної характеристики зображень, одержаних за допомогою АСМ, проводили горизонтальні перерізи через усі зображені клітинні поверхні та розраховували по кожному з профілів (рис. 2). При цьому найнижчу шорсткість виявила клітинна поверхня з часом інкубації клітин з індуктором, що дорівнював 30 хв. Така шорсткість може пояснюватися значною кількістю адсорбованих часток МК (див. рис. 1, в).



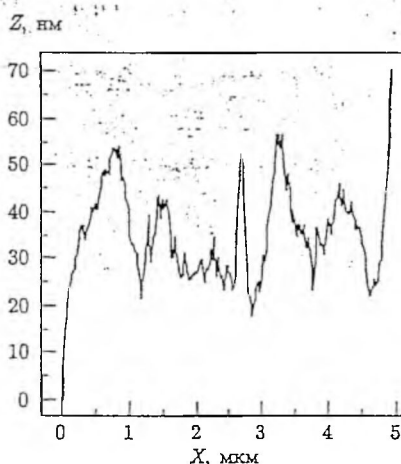
Шорсткість, нм	13,1722
Середня висота, нм	34,1372
Найвища точка, нм	73,7971
Середній нахил, нм/мкм	-0,00370957

а



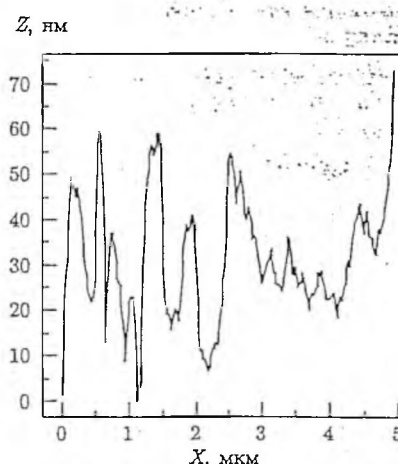
Шорсткість, нм	10,6908
Середня висота, нм	26,5073
Найвища точка, нм	66,7274
Середній нахил, нм/мкм	-0,0227731

б



Шорсткість, нм	10,0168
Середня висота, нм	35,0546
Найвища точка, нм	70,5248
Середній нахил, нм/мкм	0,0130739

в



Шорсткість, нм	13,187
Середня висота, нм	31,5009
Найвища точка, нм	72,8801
Середній нахил, нм/мкм	0,0124404

г

Рис. 2. Профілі поверхонь клітин ПТП, проведених у нижній частині зображень рис. 1

Загалом одержані нами дані дозволяють зробити висновок про те, що взаємодія клітин з комплексним полінуклеотидним індуктором викликає значні морфологічні зміни клітинної поверхні. Таке явище, в свою чергу, передбачалося висунутою раніше гіпотезою щодо зв'язку індукції ІФН I типу зі специфічною деформацією клітинної мембрани під дією індуктора [2]. Таким чином, відмічений нами за допомогою АСМ феномен можна розглядати як один з доказів реалізації постульованого механізму індукції.

Автори висловлюють вдячність канд. фіз.-мат. наук П. М. Литвину за можливість проведення роботи на обладнанні Інституту фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України.

1. Ho M. Induction and inducers of interferon // Interferon 1. General and applied aspects / Ed. A. Billiau. – Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1984. – P. 79–124.
2. Карпов А. В. A possible general mechanism of the signal transfer switching on the  $\alpha/\beta$ -interferons expression. I. The local cell membrane deformation as the first induction stage // Biopolymers and cell. – 1998. – 14. – С. 1–6.
3. Binnig G., Quate C. F., Gerber C. Atomic force microscope // Phys. Rev. Lett. – 1986. – 56. – P. 930–933.
4. Engel A. Biological applications of scanning probe microscopes // Ann. Rev. Biophys. Chem. – 1991. – 20. – P. 79–108.
5. Bustamante C., Keller D. Scanning force microscopy in biology // Phys. Today. – 1995. – 48. – P. 32–38.
6. Kaasgaard T., Mouritsen O. G., Jorgensen K. Lipid domain formation and ligand-receptor distribution in lipid bilayer membranes investigated by atomic force microscopy // FEBS Lett. – 2002. – 515. – P. 29–34.
7. Haeberle W., Hoerber J. K. H., Binnig G. Force microscopy on living cells // J. Vac. Sci. and Technol. – 1991. – В9. – P. 1210–1213.
8. Haydon P. G., Lartius R., Parpura V., Marchese-Regona S. P. Membrane deformation of living cells using atomic force microscopy // J. Microsc. – 1996. – 182. – P. 114–120.
9. Матюжина Т. Г. Исследование эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии // Клин. лабор. диагностика. – 1999. – 6. – С. 13–16.
10. Культуры животных клеток / Под ред. Д. Фрешни. – Москва: Мир, 1989. – 332 с.
11. Карпов А. В., Жолобак Н. М. Изучение интерферогенных свойств комплексов дрожжевая РНК – тилорон в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – 40. – С. 20–23.
12. Микроскопическая техника / Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – Москва: Медицина, 1996. – С. 240–252.
13. Hoh J. H., Schoenenberger C.-A. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy // J. Cell Sci. – 1994. – 107. – P. 1105–1114.