

На правах рукописи



Ефремов Юрий Михайлович

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК И СТРУКТУРЫ
ЦИТОСКЕЛЕТА МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (зав. кафедрой – доктор биологических наук, академик РАН, М.П. Кирпичников).

Научный руководитель:

Шайтан Константин Вольдемарович

доктор физико-математических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Быков Виктор Александрович, доктор технических наук, профессор, зам. директора по науке Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-исследовательский институт физических проблем имени Ф. В. Лукина».

Воротеляк Екатерина Андреевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва.

Защита диссертации состоится «11» декабря 2014 года в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при биологическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.73, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан « » _____ 2014 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

 М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Всё большее количество экспериментальных фактов указывает на важную роль механических свойств клеток в процессе их жизнедеятельности. Традиционно в клеточной биологии функционирование клеток рассматривается с точки зрения потребления энергии, скорости деления, экспрессии генов, активности ферментов. В то же время, клетка является объектом с характерными механическими свойствами, определяющими её способность сопротивляться внешним силам или генерировать их. В ходе выполнения функций клетки подвергаются влиянию огромного количества внешних физических силовых воздействий, например, при сохранении формы и перемещении в пространстве (эритроциты, проходящие через узкие капилляры, или фагоциты, мигрирующие к зоне воспаления). Механические свойства играют одну из ведущих ролей в процессах взаимодействия клетки с субстратом, внеклеточным матриксом, другими клетками; в движении клетки как целого и отдельных её частей, в механизмах механочувствительности и механотрансдукции – преобразования механических сигналов в биохимические. Данные события особенно важны при развитии эмбриона, сокращении мышц, работе связок, перемещении клеток в кровеносных сосудах и тканях, при развитии злокачественных опухолей и метастазировании (Kamm et al., 2010).

Для описания механических свойств клеток используют модуль Юнга (обычный или комплексный), вязкость, времена релаксации напряжений и некоторые другие величины, используемые в механике сплошных сред. Их измерение является довольно трудной задачей ввиду малых размеров клеток (десятки микрометров), необходимости поддержания их жизнеспособности во время экспериментов, низких значений модулей Юнга (100 Па – 100 кПа). В последние годы для измерения механических свойств клеток было разработано несколько методов, одним из которых является атомно-силовая микроскопия (АСМ).

Возможность исследования живых объектов, находящихся в физиологическом окружении является важнейшим преимуществом АСМ перед другими методами микроскопии, в частности, перед электронной микроскопией. В настоящее время происходит постепенный переход от визуализации клеток при помощи АСМ к изучению их локальных механических свойств, а также к микро- и наноманипулированию. Изучение живых клеток может быть выделено в специальное направление АСМ из-за существующих технических и методических сложностей. Множество важных свойств клеток проявляются только в составе многоклеточного организма (например, в эмбрионе), однако методики работы на АСМ с такими

объектами практически отсутствуют. Многие вопросы обработки данных АСМ для расчета механических свойств клеток остаются нерешенными. В связи с этим, одной из поставленных здесь задач является развитие методик работы с живыми объектами – клетками и эмбрионами – с использованием АСМ.

Огромную и, возможно, ведущую роль в определении механических параметров клетки играет цитоскелет. При этом наибольший вклад в большинстве типов животных клеток вносит актиновый цитоскелет, представляющий собой структурированную трёхмерную сеть филаментов (Kamm et al., 2010). Он также отвечает за форму, подвижность клеток, внутриклеточный транспорт, играет роль в митозе.

Вопрос о том, каким образом перестройки цитоскелета приводят к изменению механических свойств клетки, остается открытым. В регуляции цитоскелета участвует большое количество различных биомолекулярных комплексов. В их число входят как белки, непосредственно участвующие в сборке/разборке и стабилизации актинового цитоскелета (актин-связывающие белки формин, Arp2/3, кофилин, миозин и другие), так и белки, определяющие их активность (Rho ГТФазы, ROCK и другие). В настоящее время есть данные о роли некоторых из этих белков в клеточной подвижности, но практически отсутствуют данные об их влиянии на механические свойства.

Актуальность работы также связана с открытием различий в жесткости нормальных и опухолевых клеток (Cross et. al., 2007, Swaminathan et. al., 2011). Низкий модуль Юнга (модуль упругости или просто жесткость) – новый недавно обнаруженный маркер многих опухолевых клеток, который в некоторых случаях коррелирует с метастатическим потенциалом (Guck et al, 2005; Lekka et al., 2012). Предположительно, особые механические свойства опухолевых клеток играют важную роль в метастатических процессах, когда происходит активная миграция клеток в тканях, интравазация и экстравазация, для чего также требуется активное изменение структуры цитоскелета (Friedl and Wolf, 2003). Строение и регуляция актинового цитоскелета в опухолевых и нормальных клетках сильно отличаются, что, возможно, связано с изменениями в экспрессии и активности регуляторных белков (Olson and Sahai, 2009). С учетом того, что цитоскелет представляет собой многоуровневую и подвижную систему, объяснение механизмов регуляции его структуры и сопоставление таких механизмов в нормальных и опухолевых клетках является чрезвычайно сложной задачей. В частности, остаются неясными особенности регуляции многих ключевых белков, отвечающих за состояние актинового цитоскелета в опухолевых клетках, и их влияние на механические свойства клеток. Изучение эффектов различных ингибиторов и активаторов этих

белков с помощью АСМ и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) может помочь установить регуляторные пути, ведущие к появлению фенотипа опухолевой клетки.

Цели и задачи исследования

Цель работы состоит в установлении роли актинового цитоскелета в определении механических свойств клеток; установлении влияния трансформации и различных воздействий, приводящих к изменению актинового цитоскелета, на механические свойства различных клеточных линий и эмбрионов.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику измерения механических свойств с помощью АСМ на модельных объектах – полиакриламидных гелях, сравнить ее с классической реологией.

2. Получить с помощью АСМ и проанализировать изображения живых клеток в жидкости, измерить их механические свойства в различных состояниях.

3. Определить взаимосвязь между структурой актинового цитоскелета и механическими свойствами нормальных и трансформированных клеток.

4. Исследовать влияние различных биохимических воздействий, приводящих к изменению структуры актинового цитоскелета, на механические свойства нормальных и трансформированных клеток.

5. Разработать методику для исследования клеток в составе организма на примере эмбрионов *Xenopus laevis* с помощью АСМ, получить изображения живых и фиксированных эмбрионов на разных стадиях, определить влияние полимеризации актина на механические свойства эмбрионов.

Научная новизна

Впервые были измерены механические свойства ряда клеточных линий, а также эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* на разных стадиях развития с помощью АСМ.

Обнаружено влияние степени конфлюентности клеточной культуры на модуль Юнга клеток. Показана корреляция модуля Юнга клеток с количеством фибриллярного актина, измеренного с помощью проточного цитофлуориметра. Для различных типов клеток обнаружено логнормальное распределение значений модулей Юнга и количества фибриллярного актина.

И для нормальных, и для опухолевых клеток показана применимость модели структурного (конструкционного) демпфирования со степенной зависимостью для описания зависимости комплексного модуля Юнга от частоты.

Впервые сопоставлено влияние ингибиторов формина (SMIFH2) и Arp2/3 комплекса (СК-666), а также трипсинизации на механические свойства нормальных и опухолевых клеток.

Впервые получены изображения поверхности фиксированных и живых эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* с помощью АСМ, изучено действие лизофосфатидной кислоты на их механические свойства.

Практическая значимость

Практическая значимость работы состоит в том, что разработанные методические подходы по измерению механических свойств клеток и эмбрионов потенциально могут быть использованы в дальнейшем в медицине, например, в диагностических целях.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены и обсуждены на восьмом и десятом международном симпозиуме аспирантов “Horizons in Molecular Biology” (2011, 2013 – Геттинген); семинаре европейского общества молекулярных биологов (ЕМВО) “Physical biology of cancer” (2013 – Кандиоло); первом междисциплинарном симпозиуме «Молекулярная онкология: от лаборатории к медицине» (2012 – Киев); третьей, четвертой, пятой и шестой международных конференциях «Современные достижения бионаноскопии» (2009, 2010, 2011, 2012 - Москва); четвертом международном форуме по нанотехнологиям «RusNanoTech-2011» (2011 – Москва); международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2012 – Москва).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них статей в журналах, соответствующих перечню ВАК РФ – 6, тезисов докладов и материалов конференций 9.

Личный вклад автора

Основная экспериментальная работа (разработка методики обработки силовых кривых, приготовление полиакриламидных гелей, модификация кантилеверов, написание скриптов, все АСМ-эксперименты) и обработка полученных данных выполнены автором самостоятельно. Эксперименты на реометре проводились под руководством Д.Д. Хайдаповой. Подготовку образцов клеток культуры СМГ для АСМ и конфокальной микроскопии выполнил Е.В. Дзюбенко, первичных мышинных фибробластов – И.М. Зурина. Подготовку эмбрионов *Xenopus Laevis* для АСМ и СЭМ выполнила Е.А. Пухлякова. Эксперименты по конфокальной микроскопии и

проточной цитофлуориметрии клеток были выполнены совместно с К.С. Кудряшовой и О.В. Воронцовой. Постановка задач и выбор стратегии их решения, обсуждение результатов проводились вместе с Д.В. Багровым, А.А. Докруновой, О.С. Соколовой, А.Ю. Александровой и К.В. Шайтаном.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 143 страницах, содержит 55 рисунков и 4 таблицы и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложений и списка цитированной литературы, который включает 274 цитируемых источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** сформулированы основные цели и задачи исследования, обоснована его актуальность и практическая значимость.

Обзор литературы. В этом разделе подробно рассмотрены имеющиеся данные о механических свойствах животных клеток. Приведены данные о различных клеточных компонентах, влияющих на её механические свойства (мембрана, ядро, цитоскелет), наибольшее внимание уделено актиновому цитоскелету и регуляции его состояния. Представлены механические модели животной клетки, описывающие её как сплошную среду или основанные на анализе отдельных структур клетки. Рассмотрены методы анализа механических свойств клеток, в том числе АСМ. Подробно разобраны методические проблемы получения и анализа данных АСМ для оценки механических характеристик исследуемых объектов. Описаны имеющиеся данные об особенностях строения цитоскелета и механических свойствах опухолевых клеток. Рассмотрены особенности исследования эмбрионов с помощью АСМ.

Материалы и методы.

Клеточные линии и эмбрионы

В качестве объектов исследования использовались астроциты из органотипической культуры спинальных ганглиев (СМГ) эмбрионов цыплят, эмбриональные фибробласты мыши, различные линии клеток рака простаты (PC3, DU145, LNCaP, в качестве контроля Vero), иммортализованные мышечные фибробласты линии 10(3) и их трансформированные производные 10(3)RAS, линия фибробластов легких человека MRC5 и их производные, полученные путем опухолевой трансформации вирусом SV40: MRC5-V1 и MRC5-V2; линии фибробластов кожи человека 1036 и линия клеток фибросаркомы HT-1080. В работе также исследовали зародышей шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* Daudin),

полученных методом оплодотворения *in vitro*. Эмбрионы закрепляли в лунках в агаровом донышке (2% раствор агарозы) на дне чашки Петри.

Метод АСМ

В данной работе АСМ (Solver Bio Olympus, НТ-МДТ) использовали для получения изображений клеток, а также для измерения механических характеристик гелей, клеток и эмбрионов методом силовой спектроскопии (регистрация силовых кривых). Ее проводили как с использованием обычных кантилеверов, так и с использованием кантилеверов, модифицированных микросферами. Обычные кантилеверы обеспечивают лучшее пространственное разрешение при картировании модуля упругости, но меньшую точность в определении его значений. Также острое иглы может повредить клетку из-за высокого локального давления зонда на поверхность.

Модификацию кантилеверов осуществляли следующим образом. Специальные кантилеверы без игл (CSG11 tipless, НТ-МДТ) под контролем оптического микроскопа подводились сначала на двухкомпонентный эпоксидный клей, затем на отдельно лежащие на подложке полистироловые микросферы (диаметр ≈ 9 мкм). Через сутки, после затвердевания клея, модифицированным кантилевером сканировали калибровочную решетку для измерения точного радиуса микросферы (рис. 1). Использование модифицированных микросферами кантилеверов позволяет снизить локальное давление на клетку в ходе индентирования. Также уменьшается число силовых кривых, которые необходимо снять для сопоставления средних значений модулей Юнга больших популяций клеток.

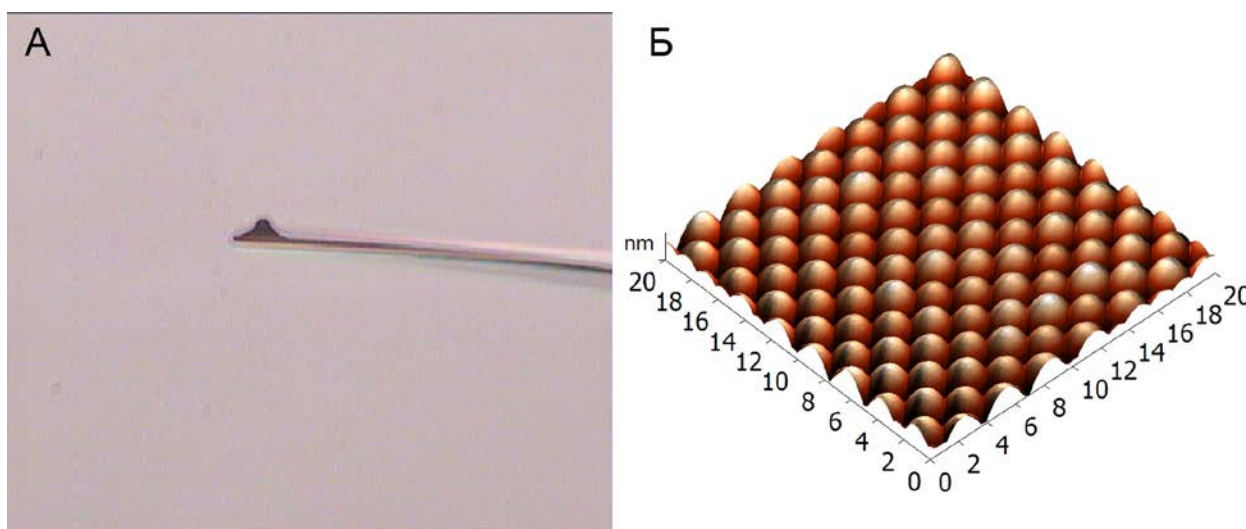


Рисунок 1. (А) – Кантилевер после приклеивания полистироловой микросферы (диаметр 9 мкм). (Б) – изображение калибровочной решетки, полученное с использованием модифицированного кантилевера для измерения радиуса микросферы.

Для измерения вязкоупругих свойств после индентации зондом на заданную глубину на пьезотрубку подавали синусоидальное напряжение вдоль вертикальной оси. Амплитуда колебаний составляла 10-20 нм, частоты варьировались в диапазоне 0,1 – 220 Гц. Регистрировали сигналы смещения пьезотрубки и отклонения кантилевера.

Проверка разработанных алгоритмов получения и обработки данных АСМ проводилась путем сравнения значений жесткостей полиакриламидных гелей (ПААГ) со значениями, полученными на реометре. Были приготовлены ПААГ с различными концентрациями мономеров, тонкие образцы (толщина до 200 мкм) для АСМ и толстые образцы (толщина 1-2 мм) для реометра.

Для определения структуры цитоскелета (количества филаментов, плотности их расположения и т.п.) использовали конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (КЛСМ). Окрашивание актина осуществляли фаллоидином, конъюгированным с флуорофором. КЛСМ является общепризнанным методом качественного и количественного анализа строения цитоскелета. Типичное разрешение КЛСМ в плоскости объекта 0,15-0,25 мкм и 0,5-1 мкм по оси Oz позволяет различать как стресс-фибриллы, так и более тонкие пучки филаментов актина. Для оценки количества актина в клетке также использовали проточную цитофлуориметрию.

Для модификации цитоскелета клеток использовали различные ингибиторы полимеризации актина, трипсинизацию и лизофосфатидную кислоту (LPA). Применяли следующие ингибиторы: SMIFH2 (small molecule inhibitor of formin homology 2 domains) для ингибирования формин-зависимого пути полимеризации актина, СК666 для ингибирования Arp2/3-зависимого пути (Actin-related protein 2/3 complex) и цитохалазин D для ингибирования всех путей полимеризации актина в клетке.

Результаты и обсуждение.

1. Разработка методов обработки данных АСМ для измерения механических свойств образца.

В программе Origin был разработан скрипт для обработки силовых кривых (СК), а также данных анализа вязкоупругих свойств. Изначально СК представляет собой график зависимости электрического тока через фотодетектор от вертикального смещения сканера (рис. 2). Скрипт для обработки СК состоит из нескольких частей. В первой части из СК вычитается общий наклон, чтобы привести к нулю часть кривой, предшествующую контакту зонда с образцом. Во второй части

осуществляется поиск точки контакта, для чего пользователь выбирает диапазон, содержащий точку контакта. Скрипт с помощью алгоритма нелинейной регрессии производит аппроксимацию окрестности точки контакта комбинацией двух функций: линейной (область до контакта) и степенной (показатель степени $3/2$ для модели Герца и 2 для модели Снеддона, область контакта). В третьей части СК переводится в координаты сила – глубина продавливания с использованием известных значений координат точки контакта, чувствительности лазерно-оптической системы и жесткости кантилевера. Далее с помощью еще одной аппроксимации моделью Герца или Снеддона рассчитывается значение модуля Юнга для выбранного диапазона глубин продавливания. Скрипт также позволяет изучать зависимость модуля Юнга от глубины продавливания.

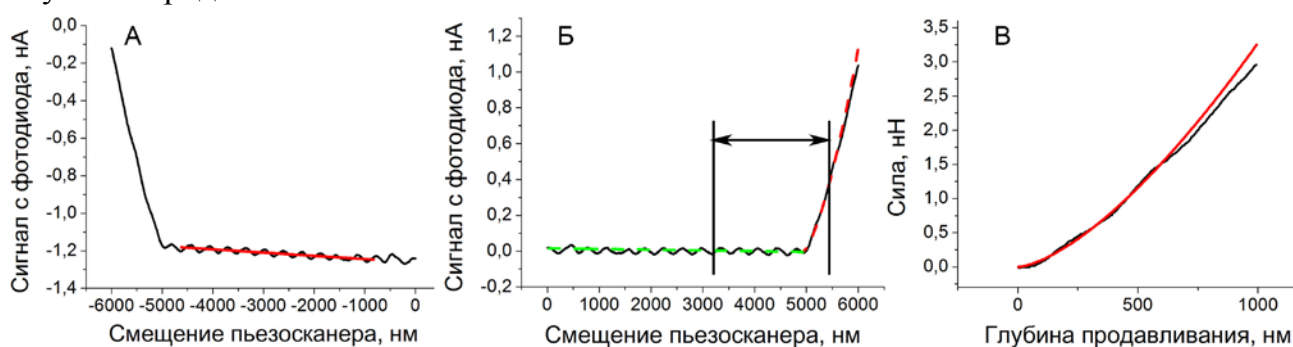


Рисунок 2. Обработка силовых кривых. Первый шаг (А) – вычитание фонового наклона. Второй шаг (Б) – поиск точки контакта. Третий шаг (В) – перевод в координаты сила – продавливание, поиск модуля Юнга.

Также был разработан скрипт для обработки данных, полученных в экспериментах по изучению вязкоупругих свойств образцов. В скрипте проводится быстрое преобразование Фурье сигналов DFL (отклонение) и SensHeigh (положение пьезотрубки), для них находится частота и амплитуда колебаний, сдвиг фаз между ними. С помощью измеренных калибровочных параметров по этим данным находится комплексный модуль Юнга при заданных частотах.

В работе были использованы ПААГ с концентрациями мономеров (акриламид/бисакриламид, %) 4/0,1; 4/0,3; 6/0,1; 6/0,3. Было показано, что значения, полученные кантилеверами с микросферами меньше значений, полученных обычными кантилеверами, и находятся в лучшем соответствии с результатами измерений, выполненных на реометре (рис. 3). При этом наилучшее соответствие наблюдается для значений модуля Юнга, полученных при обработке силовых кривых на глубинах более 500 нм (коэффициент линейной корреляции по Пирсону $R^2 = 0,99$). Возможно, вблизи поверхностей полимеризация идет хуже, поэтому на меньших глубинах значения модуля упругости ниже. Было обнаружено, что модули Юнга гелей зависят как от концентрации мономеров, что известно из литературных данных, так и от времени полимеризации и материалов, используемых в качестве ёмкости для

полимеризации, чего ранее показано не было. С увеличением длительности полимеризации жесткость гелей растёт. При полимеризации гелей между стеклами их жесткость выше, чем при использовании пластика. Жесткость гелей не зависела от их толщины в диапазоне 50 мкм – 2 мм.

Как по данным реометра, так и по данным АСМ на низких частотах (до 50 Гц) превалируют упругие свойства ПААГ (действительная часть комплексного модуля Юнга много больше его мнимой части). С ростом частоты происходит увеличение как действительной части комплексного модуля Юнга (модуля сохранения), так и мнимой (модуля потерь).

Таким образом, была реализована методика измерения модуля Юнга образцов с помощью атомно-силовой микроскопии. Методика отработана на гелях ПААГ с различными концентрациями мономеров. Предложенный способ обработки силовых кривых был реализован в форме скрипта в программе Origin. Эти методические разработки были использованы для изучения механических свойств клеток и эмбрионов.

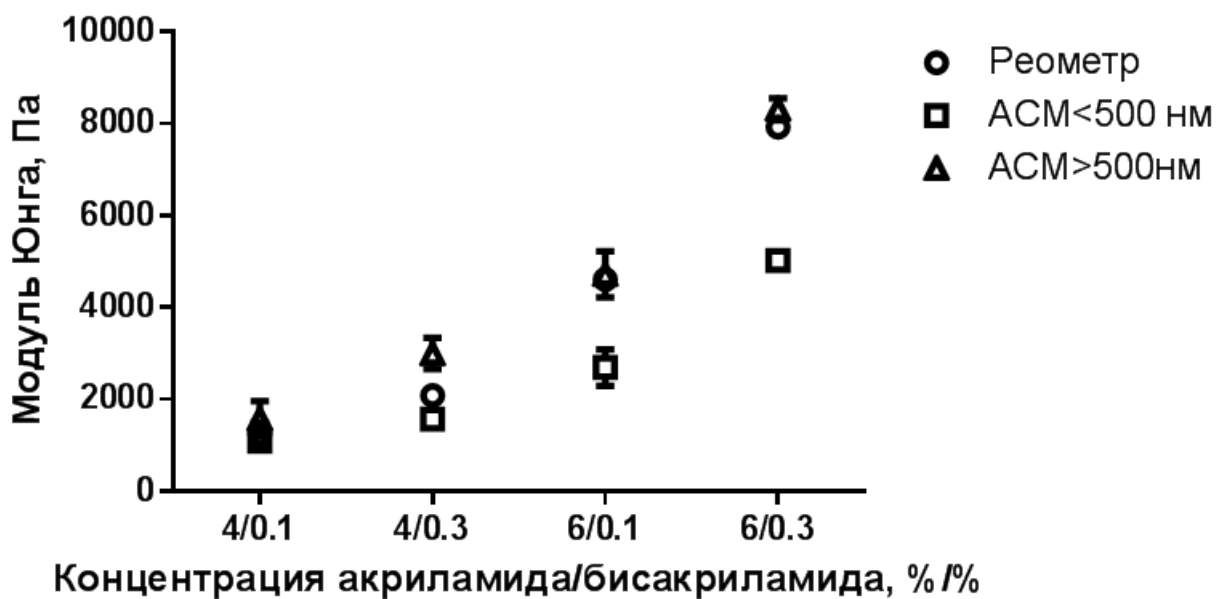


Рисунок 3. Значения модулей Юнга полиакриламидных гелей, полученные на реометре и АСМ. АСМ<500нм – обработка до глубины продавливания 500 нм, АСМ>500нм – более 500 нм.

2. Отработка метода исследования механических свойств клеток с помощью АСМ.

Измерения жесткости клеток проводились в фосфатно-солевом буфере (PBS), сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), и в смеси сред Игла в модификации Дульбекко и Хэма F12 (1:1) (DMEM/HAM F12) с добавлением NEPEP. Оптимальной с точки зрения поддержания жизнеспособности является клеточная среда, так как в ней содержатся практически все компоненты, необходимые для

стабильного существования клеток. Однако наличие большого числа компонентов увеличивает рассеяние лазерного пучка и приводит к загрязнению зонда, что негативно сказывается на уровне шумов в измерениях. Было обнаружено, что во всех растворах жизнеспособность клеток может сохраняться в течение нескольких часов (более 4), что проверялось с помощью красителя трипанового синего, не проникающего в живые клетки. Значения модулей Юнга клеток также оставались постоянными при продолжительности эксперимента до 2-4 часов.

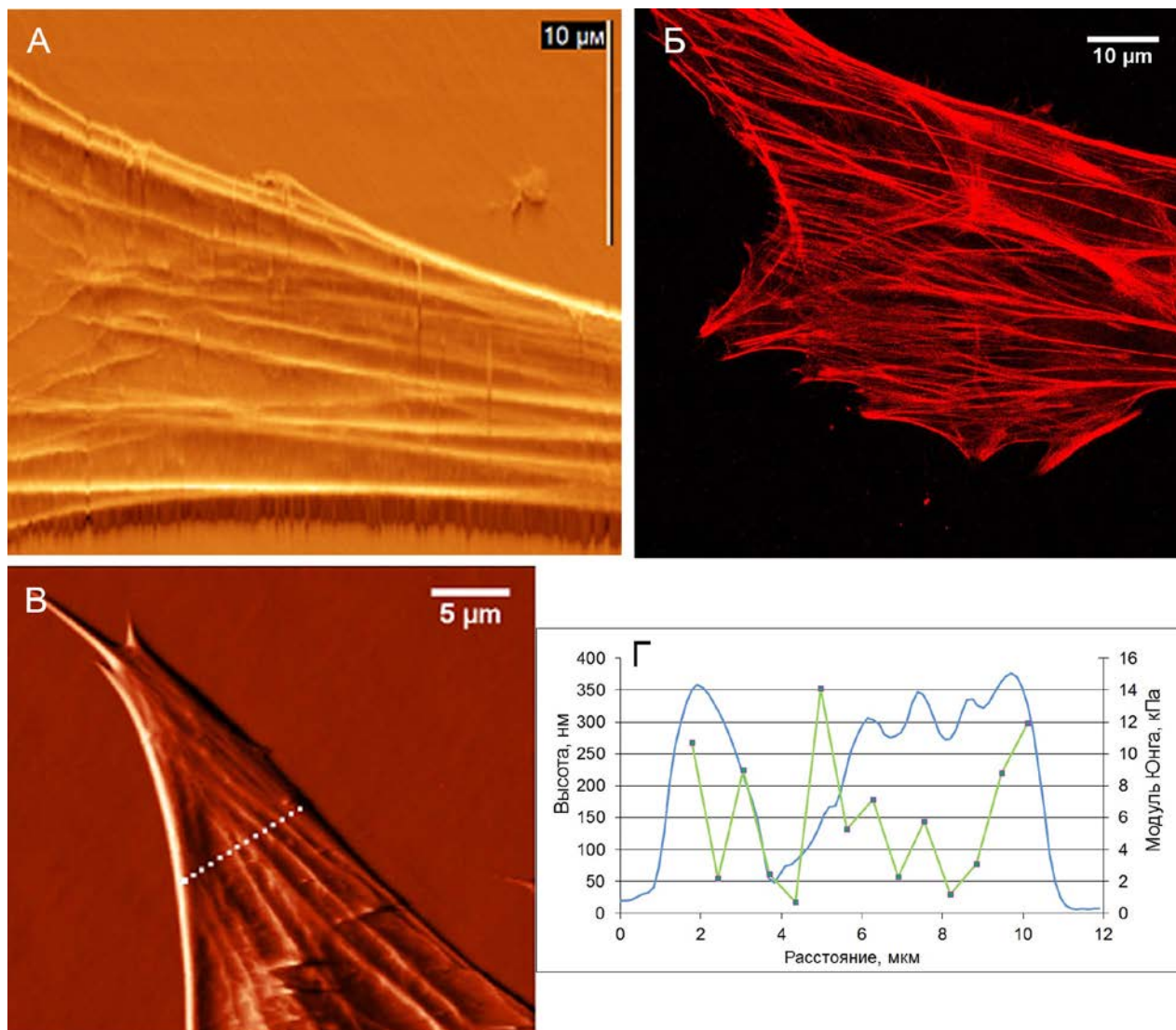


Рисунок 4. Сравнение изображения, полученного на АСМ (А, сигнал ошибки обратной связи) и КЛСМ изображения (Б, окрашивание на F-актин), мышечные фибробласты. (В) – АСМ-изображение участка астроцита и линия, вдоль которой снимались силовые кривые (14 точек) и был измерен профиль высоты. (Г) – профиль сечения (высоты) вдоль данной линии (сплошная кривая) и значения модуля Юнга (квадратные маркеры) в соответствующих точках. В точках, попадающих на фибриллы цитоскелета (локальные максимумы на синей кривой) модуль Юнга имеет более высокие значения.

Эксперименты с использованием стандартных острых АСМ зондов (кантилеверов) были проведены на эмбриональных мышечных фибробластах и

астроцитах культуры СМГ. Сканирование живых клеток в жидкости такими зондами позволяет наблюдать пучки актиновых филаментов (стресс-фибриллы, рис. 4А). Фибриллярный актиновый цитоскелет в клетке представлен тремя основными структурами – стресс-фибриллами, кортикальным (подмембранным) слоем, разветвленной сетью в ламеллоподиях (выросты ведущего края клетки). Чтобы доказать, что наблюдаемые волокна действительно являются пучками актиновых филаментов, проводилось сравнение АСМ и КЛСМ изображений при окрашивании различных элементов цитоскелета (актин, тубулин, промежуточные филаменты). Наилучшее соответствие наблюдалось для КЛСМ изображений с окраской фибриллярного актина (рис. 4Б). При картировании механических свойств острым кантилевером было установлено, что области клетки с расположенными под ними стресс-фибриллами на порядок жестче, чем остальные области (рис. 4В, Г). Вследствие этого при использовании стандартных (острых) кантилеверов разброс значений модуля упругости, полученных даже на единственной клетке, очень велик, что затрудняет анализ данных. При использовании модифицированных кантилеверов (с микросферами вместо игл) разброс значительно ниже за счет усреднения измеряемых свойств по сравнительно большой контактной площади, имеющей под собой большое количество элементов цитоскелета. По этой причине в дальнейшем в работе использовались только модифицированные кантилеверы.

На модуль Юнга клеток оказывает влияние большое число параметров, причем не все из них до конца исследованы. К известным параметрам относятся температура, состав среды, рН, фаза клеточного цикла, плотность клеток, состав матрикса на поверхности субстрата, его жесткость и др. При измерении модулей Юнга с помощью АСМ к ним добавляются эффект подложки, глубина продавливания, форма клетки, положение ядра, скорость снятия СК и другие.

Силовую спектроскопию обычно проводят над центральной областью клетки, так как её края имеют слишком низкую высоту (1 мкм и менее), что приводит к возникновению эффекта подложки. Эффект подложки проявляется в том, что если мягкий тонкий объект находится на намного более твердой подложке, то при индентировании измеренные значения модуля упругости для объекта окажутся выше, чем в действительности. Чтобы избежать эффекта подложки, аппроксимацию СК проводили только по первым 500 нм индентирования. Это намного меньше типичной высоты клетки над подложкой в центральной её части (5 мкм и более), в этом случае эффект подложки можно не учитывать. На некоторых СК эффект подложки проявляется на глубинах более 1-2 мкм. При подобной технике измерений ожидается существенное влияние стресс-фибрилл и кортикального актина на измеряемые значения модуля Юнга.

На клетках Vero было проведено исследование влияния ядра и степени конфлюентности клеточной культуры на механические свойства. Не было обнаружено различий в форме СК и значениях модуля Юнга ($p=0.63$) при снятии СК над ядром и вне его области (рис. 5А). Для остальных клеточных линий, исследуемых в дальнейшей работе, также влияния ядра на измерения замечено не было. По-видимому, находящиеся над ядром кортикальный актин и стресс-фибриллы нивелируют его влияние на механические измерения с помощью АСМ.

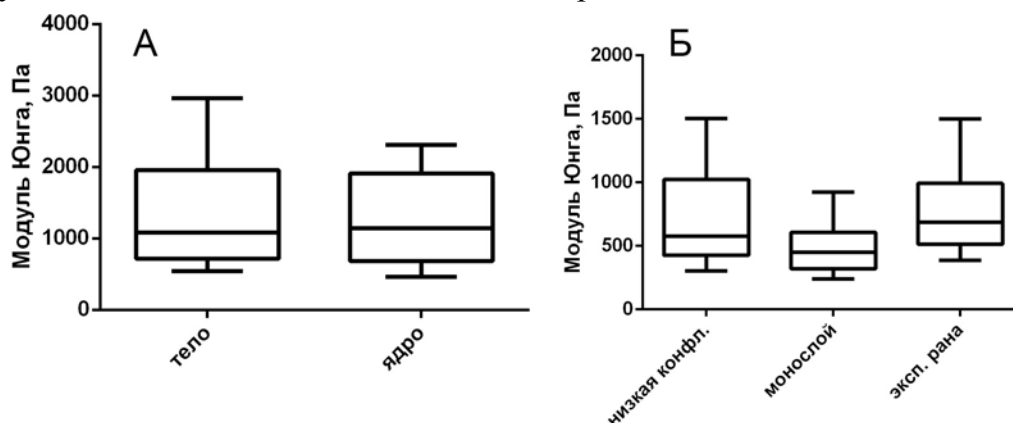


Рисунок 5. (А) – результаты измерений модуля Юнга клеток Vero в области вне ядра и над ядром клетки. (Б) – модули Юнга клеток Vero в различных состояниях (низкая степень конфлюентности, высокая (монослой), миграция в экспериментальную рану). Коробчатая диаграмма, показаны процентиля 10, 25, 50, 75 и 90.

На клетках Vero было обнаружено влияние степени конфлюентности клеточной культуры на механические свойства. Модуль Юнга клеток, находившихся в монослое (конфлюентность 100%), был на $\approx 30\%$ ниже ($p < 0,01$), чем у клеток при меньшей конфлюентности (рис. 5Б). Чтобы исключить возможное влияние длительности культивирования, измеряли модуль Юнга клеток, мигрирующих в экспериментальную рану в монослое (ширина раны ~ 600 мкм). В области раны происходит локальное уменьшение процента конфлюентности. У мигрирующих в экспериментальную рану клеток наблюдали увеличение модуля Юнга до значений, характерных для клеток при низкой конфлюентности.

Данные АСМ были подтверждены результатами проточной цитофлуориметрии при анализе количества фибриллярного актина. Проточный цитофлуориметр позволяет детектировать интегральный сигнал флуоресценции с единичных клеток в суспензии. Клетки открепляли от субстрата, фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали фибриллярный актин. Его количество в клетках монослоя было ниже, чем в клетках, еще не достигших максимальной плотности (рис. 6).

Известно, что модуль Юнга клеток становится выше, если они растут на более твердых субстратах. Для клеток в монослое эффективная жесткость среды (с учетом

соседних клеток) снижается, по сравнению с одиночными клетками, и это может быть причиной наблюдаемого снижения модуля Юнга. С другой стороны, клетки в монослое неподвижны, и им, возможно, требуется меньше фибриллярного актина, чем активно движущимся клеткам.

С учетом обнаруженного влияния конfluenceнтности, все последующие измерения по возможности проводились на одиночных клетках или клетках в небольших группах, до достижения ими состояния монослоя.

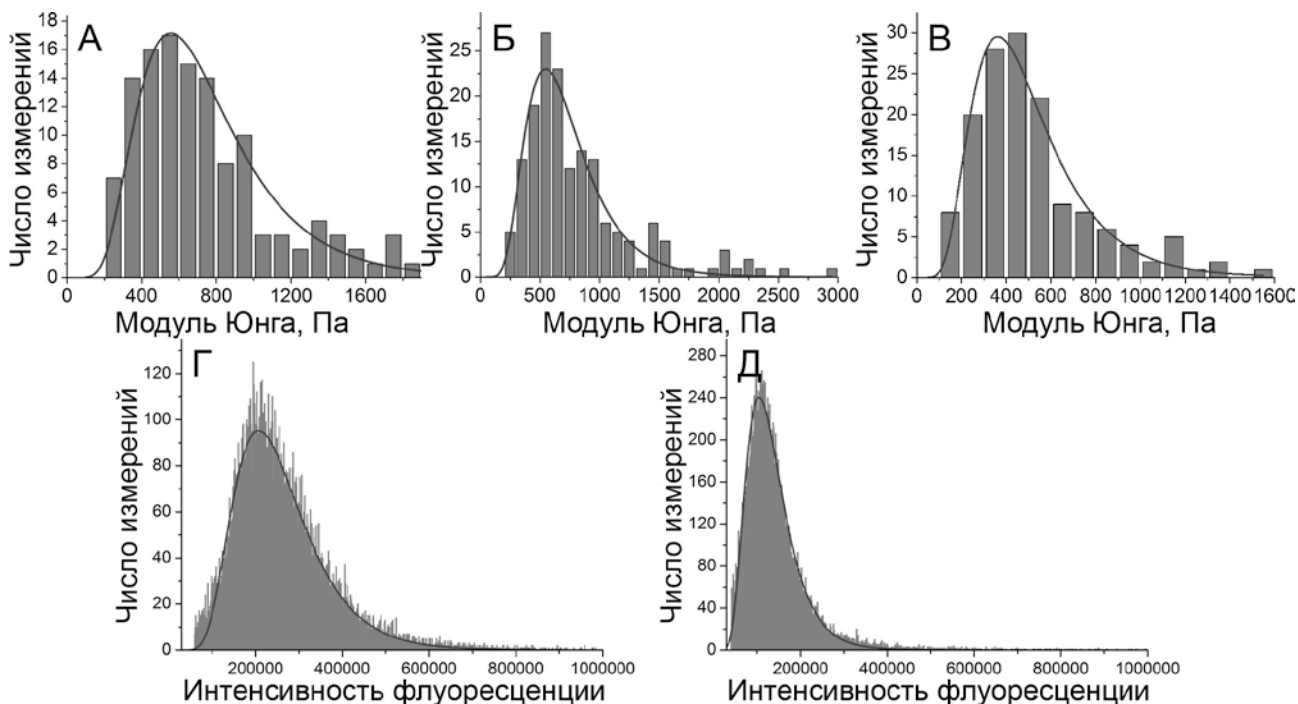


Рисунок 6. Гистограммы распределения значений модуля Юнга клеток Vero в различных состояниях (клетки, не достигшие 100% конfluenceнтности (А), клетки, мигрирующие в экспериментальную рану (Б) и конfluenceнтные клетки (В)). Гистограммы распределения количества фибриллярного актина в клетках Vero по данным проточной цитофлуориметрии (не достигшие (Г) и достигшие (Д) конfluenceнтности клетки). Сплошная линия – аппроксимация данных логнормальным распределением. Интенсивность флуоресценции в относительных единицах.

Как правило, значения модулей Юнга, полученные модифицированным кантилевером на одной и той же клетке, варьировались в пределах 20-30% от среднего значения. В то же время, средние значения модуля Юнга, полученные на разных клетках в одном эксперименте, могут отличаться на порядок. Также наблюдалась вариация средних значений для популяции клеток при проведении измерений в разные дни. Было обнаружено, что распределение значений модуля Юнга клеток Vero, а также других клеточных линий, эксперименты с которыми были проведены в дальнейшей работе, близко к логнормальному (рис. 6). Соответственно, нормальное распределение наблюдалось для логарифмов значений модулей Юнга.

Такой вид распределения может быть вызван логнормальным распределением количества актина или актин-связывающих белков в популяции клеток. В пользу первой гипотезы свидетельствуют данные, полученные на проточном цитофлуориметре (рис. 6). Распределение интенсивности флуоресценции меченного фибриллярного актина имело логнормальный вид. Логнормальное распределение является весьма распространённым в природе, и в частности в различных внутриклеточных параметрах. Было показано, что к ним относятся количество многих видов мРНК и белков (Furusawa et al., 2005).

На мышинных фибробластах, астроцитах культуры СМГ и клетках Vero были выявлены некоторые базовые особенности клеточной механики (логнормальное распределение значений модуля Юнга в популяции, роль стресс-фибрилл и клеточного ядра, влияние конфлюентности). Полученные результаты позволили в дальнейшем перейти к сравнительному изучению большего числа клеточных линий, а также влияния различных воздействий на механические свойства клеток.

3. Сопоставление механических свойств нормальных и трансформированных клеток

Для сопоставления механических свойств нормальных и трансформированных клеток были выбраны четыре клеточные системы, отличающиеся по происхождению (эпителий, мезенхима) и по степени трансформации. Первая система включала клетки Vero из эпителия почки африканской зеленой мартышки и несколько линий эпителиальных клеток рака простаты (PC3, DU145, LNCaP). Вторая система (система моноонкогенной Ras-трансформации) включала клетки линии 10(3), являющиеся иммортализованными мышинными фибробластами, и их трансформированные производные 10(3)RAS, полученные путем трансфекции исходной линии 10(3) плазмидой с геном конститутивно активного белка N-RAS^{asp13}. Третья система (SV40-трансформации) включала нетрансформированные клетки линий MRC-5, являющиеся эмбриональными легочными фибробластами человека, и их производные – трансформированные клетки MRC-5V1 и MRC-5V2, полученные путем заражения исходной линии MRC-5 вирусом SV40. Четвертая система включала подкожные фибробласты человека 1036 и линию фибросаркомы человека HT-1080. Было обнаружено, что модуль Юнга трансформированных клеток намного ниже (на 50-80%, $p < 0,01$), чем у нормальных клеток, во всех четырёх исследованных клеточных системах (рис. 7). Соответственно, на КЛСМ изображениях в трансформированных клетках наблюдалась менее плотная и более дезорганизованная сеть актиновых филаментов. Наименьшие изменения были характерны для системы моноонкогенной Ras-трансформации, что может быть связано с наименьшим уровнем трансформации клеток этой системы среди других систем. Для систем вирусной трансформации и

линий рака простаты не было выявлено корреляции значений модуля Юнга со степенью инвазивности клеток. Наименьшие значения модуля Юнга были выявлены у клеток LNCaP, не обладающих способностью к метастазированию, также имеющих наиболее слабо развитый цитоскелет и слабую адгезию к поверхности.

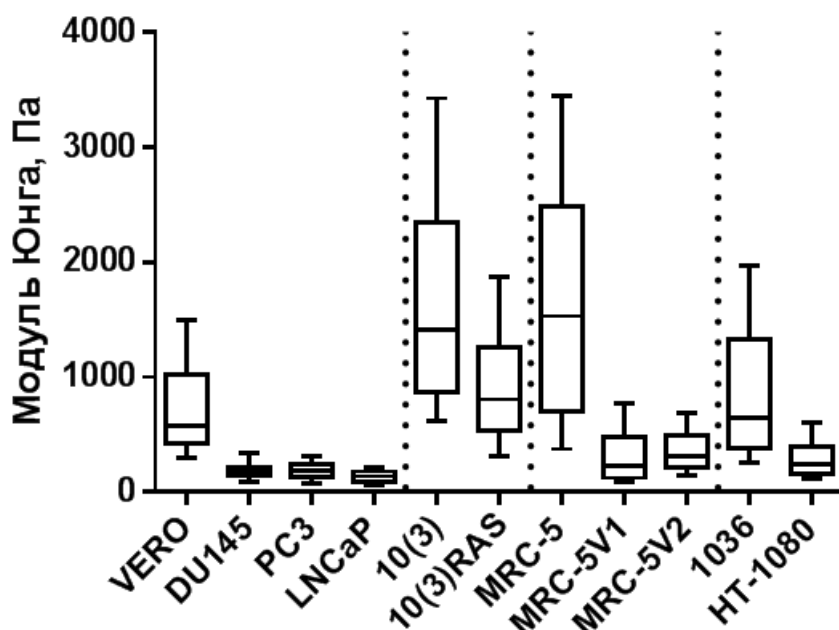


Рисунок 7. Модули Юнга клеток четырёх клеточных систем, описанных в тексте. Для первой системы (клетки линии Vero и трёх линий рака простаты) измерения проводились в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре, для остальных трёх систем – в среде DMEM/HAM с добавлением NEPES при 37°C. Скорость снятия силовых кривых – 1 мкм/с.

Для клеточных линий Vero и DU145 была измерена зависимость вязкоупругих свойств от частоты воздействия. На частотах менее 50 Гц доминируют упругие свойства клеток. В соответствии с литературными данными, частотная зависимость комплексного модуля Юнга для обоих типов клеток хорошо аппроксимируется ($R^2 = 0,96-0,99$) моделью структурного (конструкционного) демпфирования со степенной зависимостью от частоты (рис. 8):

$$E^*(f) = E'(f) + iE''(f) = \bar{E}_0(1 + i\eta)\left(\frac{f}{f_0}\right)^\alpha + if\mu;$$

В данном уравнении \bar{E}_0 – масштабный множитель для модулей сохранения (E') и потерь (E''), η – коэффициент структурного демпфирования, f_0 – масштабный множитель для частоты, α – показатель степени, μ – ньютоновская вязкость. Из рисунка 8 видно, что с увеличением частоты растут и модуль сохранения, и модуль потерь. Упругие свойства доминируют при частотах ниже 50 Гц, затем вклад вязких свойств становится существенным, и на частотах около 200 Гц они сравниваются. Для опухолевых клеток характерны более низкие значения параметра \bar{E}_0 (600 Па против 1000 Па) и более высокие значения параметра α (0,18 против 0,14). Последнее

приводит к тому, что при увеличении скорости снятия силовых кривых разница в эффективных значениях модуля Юнга между нормальными и опухолевыми клетками будет уменьшаться. Поэтому для определения опухолевых клеток силовые кривые следует снимать на малых скоростях (2 мкм/с и меньше). Модель структурного (конструкционного) демпфирования со степенной зависимостью от частоты, успешно аппроксимирующая экспериментальные данные, подтверждает применимость теории мягкого стеклоподобного тела (Sollich, 1998) для описания механических свойств клетки. Структура мягких стеклоподобных тел описывается как состоящая из многочисленных дискретных элементов, связанных друг с другом слабыми взаимодействиями (цитоскелет в случае клеток). Профиль потенциальной энергии системы элементов представлен колодцами (энергии подсостояний), глубина которых имеет экспоненциальное распределение. Параметр α определяет частоту переходов между колодцами.

Возможно, пониженная жесткость и высокая эластичность помогают метастазирующим клеткам перемещаться во внутритканевых полостях, проползать через внеклеточный матрикс и стенки сосудов. Наши данные, наряду с работами других авторов (Lekka et al., 2012), подтверждают, что измеряемая с помощью АСМ жесткость может выступать биомаркером для диагностики опухолевых клеток на ранних стадиях развития опухоли.

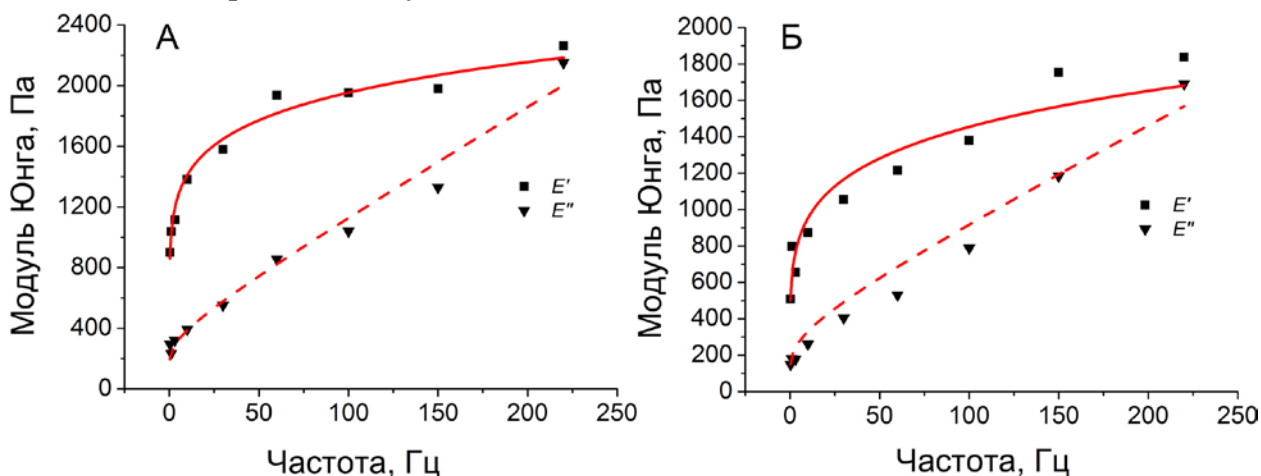


Рисунок 8. Зависимости комплексного модуля Юнга от частоты для клеток Vero (А) и DU145 (Б). Сплошная кривая – аппроксимация моделью структурного демпфирования модуля сохранения (E'), прерывистая – модуля потерь (E'').

4. Изучение влияния биохимических воздействий, приводящих к изменению структуры цитоскелета, на нормальные и опухолевые клетки

Для проверки влияния различных воздействий на опухолевые и нормальные клетки были выбраны линия клеток рака простаты Du145 и в качестве контроля клетки Vero. Эксперименты проводились в среде DMEM/НАМ с добавлением NERES, скорость снятия силовых кривых (смещения пьезотрубки) – 2 мкм/с. Предварительно

было показано, что добавление в среду DMSO (растворителя многих исследуемых веществ) не оказывает регистрируемых эффектов на механические свойства клеток.

Ведущую роль актинового цитоскелета в определении жесткости клеток подтверждают эксперименты с цитохалазином Д – агентом, разрушающим филаменты и блокирующим полимеризацию актина. Уже через несколько минут нахождения цитохалазина Д (10 минут, концентрация 2 мкг/мл (4 мкМ)) в среде с клетками регистрируется значительное падение их модуля Юнга (и для раковых клеток DU145 – на $\approx 80\%$ ($p < 0,01$), и для нормальных клеток Vero – на $\approx 90\%$ ($p < 0,01$)) до значений $\approx 80-100$ Па (рис. 9А).

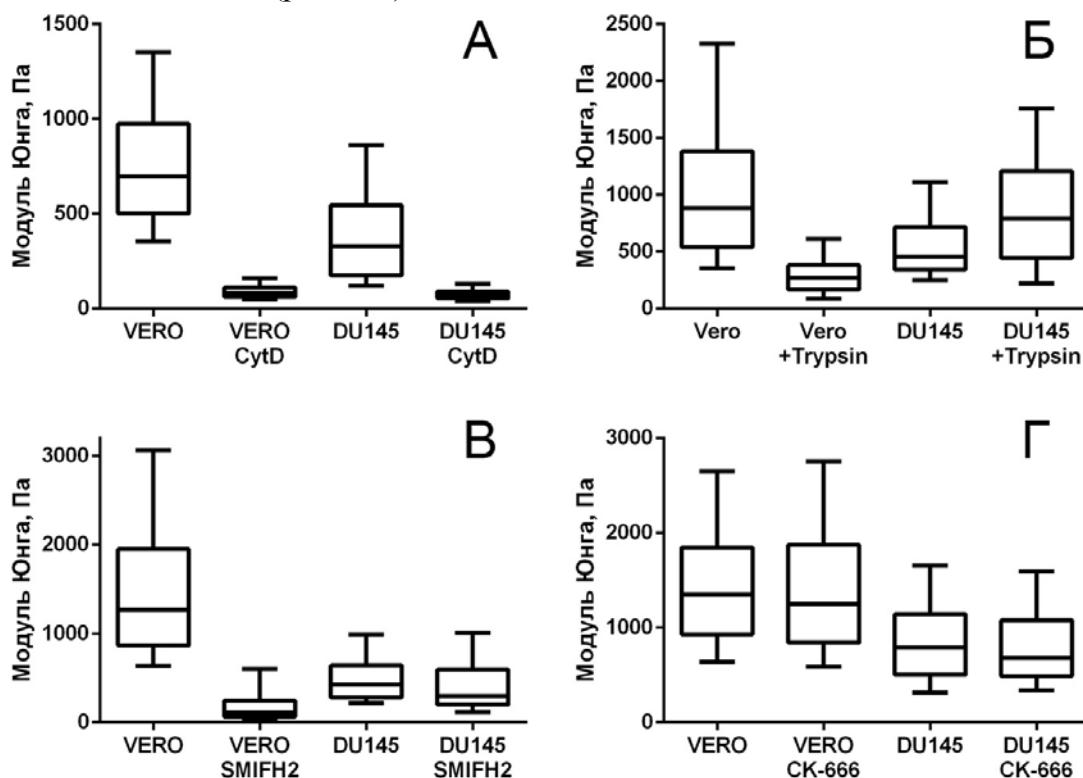


Рисунок 9. Сравнение влияния различных воздействий на модуль Юнга клеток Vero и DU145. (А) – цитохалазин Д, (Б) – трипсин, (В) – SMIFH2, (Г) – СК-666.

Были проведены эксперименты по разрушению стресс-фибрилл с помощью обработки трипсином с ЭДТА (трипсин 0,05%; ЭДТА – 0,53 мМ, раствор с солями Хэнкса). В ходе трипсинизации разрушаются межклеточные и фокальные контакты, клетки приобретают шарообразную форму. При этом происходит разборка стресс-фибрилл, кортикальный актин сохраняет свою целостность. Жесткость клеток Vero после трипсинизации составляла $\approx 30\%$ от первоначальной ($p < 0,01$), что, по всей видимости, соответствует вкладу кортикального актина. В то же время у клеток DU145 после трипсинизации модуль Юнга не только не падает, но и возрастает на $\approx 70\%$ ($p < 0,01$) (рис. 9Б). Полученные данные свидетельствуют о большем вкладе кортикального актина в определение механических свойств раковых клетках по сравнению с нормальными клетками.

Основными нуклеоторами актина являются формин и комплекс Arp2/3. Было обнаружено, что ингибирование формина с помощью низкомолекулярного специфического ингибитора SMIFH2 (2 часа, 20 мкМ) сильно влияет на модуль Юнга нормальных клеток (падает на $\approx 90\%$, $p < 0,01$) и практически не влияет на трансформированные клетки (падает на $\approx 10\%$, $p < 0,01$) (рис. 9B). Это может объясняться тем, что ингибирование формина приводит к частичной разборке стресс-фибрилл, возможно, также нарушается структура кортикального актина. Так как в раковых клетках стресс-фибриллы изначально тоньше и играют меньшую роль в определении механических свойств, то и действие SMIFH2 на них выражено слабее. Полученные результаты также могут объясняться высоким уровнем экспрессии формина в опухолевых клетках, и для заметного уровня его ингибирования нужны более высокие концентрации SMIFH2.

Ингибирование комплекса Arp2/3 с помощью CK-666 (2 часа, 100 мкМ) не приводило к изменениям модуля Юнга ни клеток Vero, ни клеток DU145 (рис. 9Г). Известно, что комплекс Arp2/3 отвечает за полимеризацию и ветвление актина в ламеллоподиях, и, таким образом, играет ведущую роль в мезенхимальном типе движения клеток. По-видимому, регуляция образования стресс-фибрилл и поддержание структуры кортикального актина устойчивы к ингибированию Arp2/3 комплекса.

Таким образом, было показано, что различные воздействия, приводящие к изменению структуры актинового цитоскелета, по-разному влияют на нормальные и опухолевые клетки. Полученные данные свидетельствуют, что в определении механических свойств опухолевых клеток большую роль играет кортикальный актин. Кортикальный актин важен для трёхмерной миграции по амебоидному механизму, которая может происходить при инвазии. Возможно, развитый кортикальный актин также помогает опухолевым клеткам выживать при перемещении в кровотоке. Отличия в строении и регуляции цитоскелета в опухолевых клетках потенциально могут быть использованы при поиске лекарств, направленных на предотвращение метастазирования.

5. Изучение эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* с помощью АСМ.

В данной работе впервые проведено исследование поверхности живых и фиксированных эмбрионов *Xenopus laevis* методом АСМ. Для этого был предложен оригинальный способ приготовления образцов. На дне чашек Петри были сделаны специальные агаровые доньшки. Они представляли собой плотный гель, с которым удобно производить механические манипуляции. В агаровых доньшках тонкой иглой делали лунку глубиной $\sim 0,5$ мм. Туда помещали зародыш таким образом, чтобы часть

его поверхности, которую собирались исследовать, оказывалась сверху. Края ямки механически фиксируют эмбрион и не дают ему перемещаться и поворачиваться в ямке. Сам эмбрион выступает над поверхностью доньшка на доли миллиметра, что позволяет сканировать его верхнюю часть с помощью АСМ. Данная методика закрепления слабо воздействует на эмбрион (после проведения исследований и извлечения из ямки он продолжает нормально развиваться), поэтому её использование можно рекомендовать для дальнейших исследований.

В слое агарозного геля для сканирования в жидкости закрепляли как живые, так и фиксированные эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Изображения, полученные методом АСМ, сопоставляли с изображениями, полученными методом СЭМ, который традиционно используется для исследования поверхности эмбрионов. Изображения, полученные на фиксированных эмбрионах с помощью АСМ, в целом согласуются с изображениями, полученными методом СЭМ. Поскольку процедура приготовления образцов для АСМ не требует высушивания и напыления металла, то можно ожидать присутствие меньшего числа артефактов, вызванных пробоподготовкой.

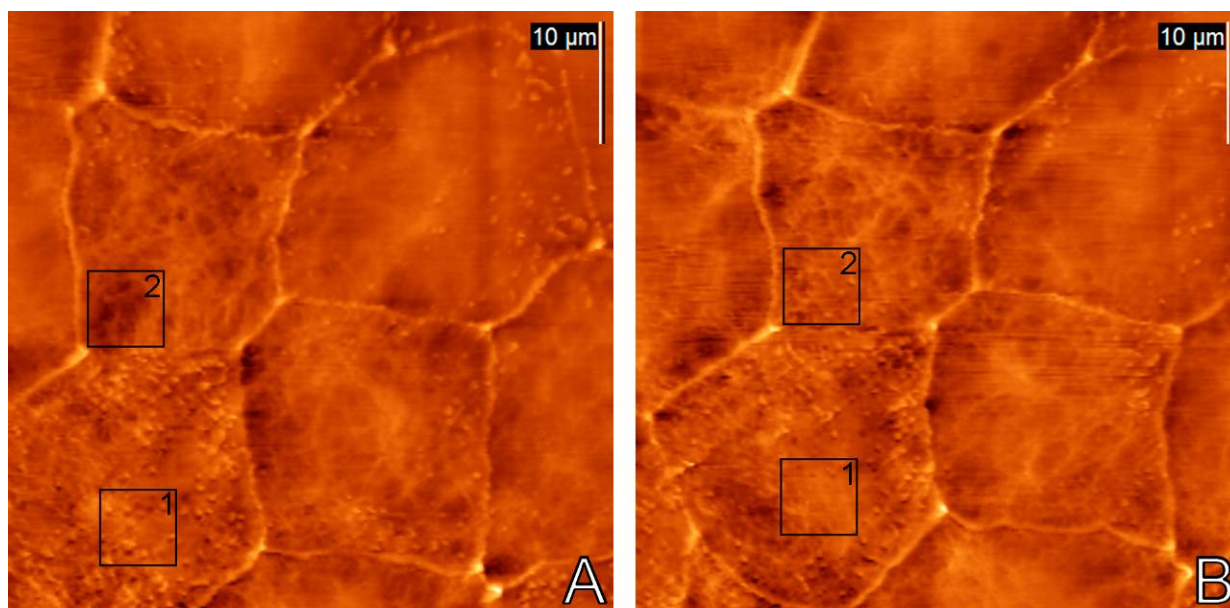


Рисунок 10. Два последовательных изображения (сигнал ошибки обратной связи) поверхности живого эмбриона (10 стадия, гастрюла, время на 1 кадр – 5 минут). В области, выделенной квадратом 1, микроворсинки (точечные возвышения) на втором кадре исчезли. В области, выделенной квадратом 2, произошла перестройка цитоскелета (исчезла яма) и появилось несколько микроворсинок.

С помощью АСМ удалось также исследовать поверхность живого эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Была получена временная серия изображений одной и той же области поверхности образца и зарегистрированы клеточные перестройки с течением времени *in vivo* (рис. 10). Кроме смещений клеточных

границ, на поверхности живого эмбриона можно увидеть структуры, которые были интерпретированы как микроворсинки и подмембранный цитоскелет. По серии кадров можно наблюдать за изменением количества и расположения микроворсинок (точечные возвышения на изображениях) на клетках. Подмембранный цитоскелет наблюдается как сеть на поверхности (Santacrose et al., 2006). Перестройки в цитоскелете выглядят как изменения в положении углублений, выступов и фибрилл на последовательных кадрах.

Силовая спектроскопия живых эмбрионов проводилась с помощью модифицированных микросферами кантилеверов. СК снимали во время развития эмбрионов, начиная со стадии бластулы и заканчивая стадией гастролы. Не удалось выявить каких-либо закономерностей в изменении модуля Юнга эмбрионов в зависимости от стадии развития. Измеренные значения модуля Юнга сильно варьируют для живых эмбрионов, полученных как от разных, так и от одной самки, а также на разных стадиях развития, и лежат в диапазоне 10 – 200 Па. С помощью силовой спектроскопии было выявлено, что добавление лизофосфатидной кислоты (LPA) вызывает рост модуля Юнга эмбрионов с введенной мРНК белка G₁₃. Рост модуля Юнга в течение 10 мин после добавления (LPA) составил более 100 % (с 80 до 200 Па), как видно из рисунка 11. По-видимому, в это время происходит усиленная полимеризация актина, то есть и в случае эмбрионов актин играет существенную роль в определении жесткости.

Таким образом, было показано, что АСМ позволяет изучать механические свойства не только клеток в культуре, но и на уровне организма, в составе живого эмбриона. Полученные результаты позволяют рекомендовать АСМ для исследования морфологии и механических свойств эмбрионов на разных стадиях развития, а также при различных воздействиях.

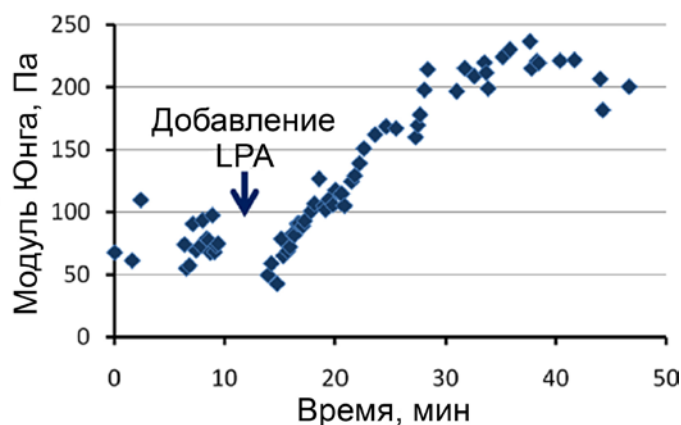


Рисунок 11 . Зависимость модуля Юнга эмбрионов с введенной мРНК белка G₁₃ от времени при добавлении к ним лизофосфатидной кислоты (LPA). Стрелкой отмечено время добавления.

Выводы.

1. Разработана новая методика измерения модуля Юнга по данным силовой спектроскопии. В методике используются стандартные или модифицированные микросферами кантилеверы, а также оригинальный скрипт для обработки силовых кривых. С использованием разработанной методики возможно измерение значений модуля Юнга от десятков Па до сотен кПа. Измеренные с помощью АСМ согласно методике значения модуля Юнга полиакриламидного геля на глубинах более 500 нм хорошо совпадают со значениями, измеренными реометром (коэффициент линейной корреляции $R^2=0,99$) и лежат в диапазоне от ≈ 1400 Па (для гелей с содержанием акриламида 4% и бисакриламида 0,1%) до ≈ 8000 Па (для гелей с содержанием акриламида 6% и бисакриламида 0,3%).
2. Показано, что фибриллы, видимые на АСМ-изображениях поверхности исследованных живых клеток, могут быть идентифицированы как пучки актиновых филаментов (стресс-фибриллы) путем сравнения с изображениями, полученными методом КЛСМ.
3. На примере линии Vero обнаружено влияние конfluenceности клеточной культуры на модуль Юнга клеток. Показана корреляция модуля Юнга клеток с количеством фибриллярного актина, измеренным с помощью проточного цитофлуориметра. Для десяти клеточных линий обнаружено логнормальное распределение значений модулей Юнга. Средние геометрические значений модуля Юнга составляли от 120 до 1460 Па, мультипликативные стандартные отклонения от 1,6 до 2,3.
4. Выявлено различие в значениях модуля Юнга нормальных и опухолевых клеток для четырех клеточных систем (линии клеток рака простаты, фибробласты после моноонкогенной, вирусной и естественной трансформации). Во всех случаях трансформированные клетки характеризовались снижением модуля Юнга (от 50 до 80%). Средние геометрические значений модуля Юнга трансформированных клеток составляли от 120 до 790 Па, нормальных – от 640 до 1460 Па.
5. Показана применимость для клеток модели деформации, свойственной для объектов с внутренними конформационными переходами с экспоненциальным распределением по энергиям подсостояний, что приводит к степенной зависимости комплексного модуля Юнга от частоты для нормальных (показатель степени 0,14) и для опухолевых клеток (показатель степени 0,18) в диапазоне 0,3 –

220 Гц. Это подтверждает теорию мягкого стеклоподобного тела для описания реологии клеток.

6. Выявлено сильное снижение (на 80-90%) модуля Юнга нормальных (Vero) и опухолевых (DU145) клеток при ингибировании полимеризации актина цитохалазином Д. Показано, что воздействие ингибитора формина SMIFH2 приводит к сильному снижению (на 90%) модуля Юнга нормальных клеток, и к слабому снижению (на 10%) модуля Юнга опухолевых клеток. Ингибирование Arp2/3 комплекса с помощью СК-666 не приводит к изменению механических свойств ни нормальных, ни опухолевых клеток. После трипсинизации модуль Юнга нормальных клеток снижается (на 70%), а опухолевых – возрастает (на 70%). Данные свидетельствуют о большей роли кортикального актина в определении механических свойств опухолевых клеток и стресс-фибрилл – в случае нормальных клеток.
7. Показано, что методом АСМ могут быть зарегистрированы изменения расположения клеточных границ, перестройки в цитоскелете, изменение количества и расположения микроворсинок на поверхности живого эмбриона. Жесткость эмбрионов с введенной мРНК белка G₁₃ возрастает при добавлении к ним лизофосфатидной кислоты, что ведет к усилению полимеризации актина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Yu.M. Efremov, M.E. Lomakina, D.V. Bagrov, P.I. Makhnovskiy, A.Y. Alexandrova, M.P. Kirpichnikov, K.V. Shaitan Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation// *Biochimica et biophysica acta* V. 1843 (5), p. 1013-1019. – 2014.
2. Yu.M. Efremov, A.A. Dokrunova, D.V. Bagrov, K.S. Kudryashova, O.S. Sokolova, K.V. Shaitan The effects of confluency on cell mechanical properties // *Journal of Biomechanics*, V. 46, p. 1081-1087. – 2013.
3. E.A. Pukhlyakova, Yu.M. Efremov, D.V. Bagrov, N.N. Luchinskaya, D.O. Kiryukhin, L.V. Belousov, K.V. Shaitan Atomic force microscopy as a tool to study *Xenopus laevis* embryo // *Journal of Physics: Conference Series*, V. 345, 012040. – 2012.
4. Yu.M. Efremov, E.A. Pukhlyakova, D.V. Bagrov, K.V. Shaitan Atomic force microscopy of living and fixed *Xenopus laevis* embryos // *Micron*, V. 42, Issue 8, - p. 840-852. – 2011.
5. Ю.М. Ефремов, Д.В. Багров, Е.В. Дубровин, К.В. Шайтан, И.В. Яминский Атомно-силовая микроскопия животных клеток: обзор достижений и перспективы развития // *Биофизика*, т. 56, вып. 2, - с. 288-303. – 2011.

6. Ю.М. Ефремов, Е.В. Дзюбенко, Д.В. Багров, Г.В. Максимов, С. И. Шрам, К.В. Шайтан Исследование распределения и механических свойств цитоскелета астроцитов в среде культивирования методом атомно-силовой микроскопии // Acta Naturae, т. 3, вып. 3(10), - с. 96-102. – 2011.

Тезисы докладов

1. Yu.M. Efremov, D.V. Bagrov, A.A. Dokrunova, M.E. Lomakina, A.Y. Alexandrova, O.S. Sokolova, K.V. Shaitan Changes in elastic properties of cells after malignant transformation // Germany, Göttingen, 10th International PhD Student Symposium “Horizons in Molecular Biology”, Student Abstracts - p. 124. – 2013.
2. Yu.M. Efremov, D.V. Bagrov, A.A. Dokrunova, M.E. Lomakina, A.Y. Alexandrova, K.V. Shaitan, O.S. Sokolova Measurements of Young’s modulus of several cancer cell lines by AFM // Italy, Candiolo, EMBO Workshop «Physical Biology of Cancer». Book of abstracts, p. 98. – 2013.
3. Ю.М. Ефремов, Д.В. Багров, А.А. Докрунова, М.Е. Ломакина, А.Ю. Александрова, О.С. Соколова, К.В. Шайтан Сравнение механических свойств нормальных и трансформированных клеток с помощью силовой спектроскопии // Россия, Москва, X конференция «Нанотехнологии в онкологии». Электронный сборник тезисов. – 2012.
4. Yu.M. Efremov, A.A. Dokrunova, D.V. Bagrov, K.V. Shaitan, O.S. Sokolova Different mechanical properties and response to actin-binding protein inactivation of normal and cancerous cells // Ukraine, Kyiv, The 1st Multidisciplinary Symposium “Molecular Oncology: from Laboratory Bench to Medicine”, Abstract book, p. 69. – 2012.
5. Ю.М. Ефремов, А.А. Докрунова, Д.В. Багров, О.С. Соколова, К.В. Шайтан Использование атомно-силовой микроскопии для исследования и диагностики раковых клеток // Россия, Нижний Новгород, IV Съезд биофизиков России, Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике», Материалы докладов. – с. 33. – 2012.
6. Ю.М. Ефремов, А.А. Докрунова, Д.В. Багров, К.В. Шайтан, О.С. Соколова Атомно-силовая микроскопия как инструмент для измерения механических свойств клеток // Россия, Москва, Современные достижения бионаноскопии, Шестая международная конференция, сборник тезисов. – с. 22. – 2012.
7. Ю.М. Ефремов, А.А. Докрунова, Д.В. Багров, О.В. Воронцова, К.В. Шайтан, О.С. Соколова Сравнение механических свойств нормальных и раковых клеток методом атомно-силовой микроскопии // Россия, Москва, Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты, V Всероссийская научно-практическая конференция, материалы. – с. 39-40. – 2012.

8. Ю.М. Ефремов, А.А. Докрунова Изучение механических свойств нормальных и раковых клеток с помощью АСМ // Россия, Москва, «Ломоносов-2012», Секция «Биология», XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, сборник тезисов. – с. 22-23. – 2012.
9. Yu.M. Efremov, E.A. Pukhlyakova, D.V. Bagrov, N.N. Luchinskaya, D.O. Kiryukhin, L.V. Belousov, K.V. Shaitan Atomic force microscopy as a tool for investigation of force transmission pathways in the *Xenopus laevis* embryos // Germany, Göttingen, 8th International PhD Student Symposium “Horizons in Molecular Biology”, Student Abstracts - p. 73. – 2011.

Цитированная литература

1. Cross S.E. и др. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients // Nat. Nanotechnol. 2007. Т. 2. № 12. С. 780–783.
2. Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms // Nat. Rev. Cancer. 2003. Т. 3. № 5. С. 362–374.
3. Furusawa C. и др. Ubiquity of log-normal distributions in intra-cellular reaction dynamics // Biophysics (Oxf). 2005. Т. 1. С. 25–31.
4. Guck J. и др. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence // Biophys. J. 2005. Т. 88. № 5. С. 3689–3698.
5. Kamm R., Lammerding J., Mofrad M. Cellular nanomechanics // Springer Handbook of Nanotechnology. – Springer Berlin Heidelberg. 2010. С. 1171–1201.
6. Lekka M. и др. Cancer cell recognition–Mechanical phenotype // Micron. 2012. Т. 43. С. 1259–1266.
7. Olson M.F., Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility // Clin. Exp. Metastasis. 2009. Т. 26. № 4. С. 273–287.
8. Swaminathan V. и др. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines // Cancer Res. 2011. Т. 71. № 15. С. 5075–5080.