

*Бочкарева Д. А.*

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИИ МОРФОЛОГИИ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК РС12 ДО И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВНЕШНЕГО ИНДУКТОРА АПОПТОЗА**

*Научный руководитель: канд. физ.-мат. наук, доц. Кухаренко Л. В.*

*Кафедра медицинской и биологической физики*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Актуальность.** Объектом исследования были выбраны клетки крысиной феохромоцитомы РС12, которые являются нейронной клеточной моделью для изучения процессов апоптоза, метаболизма, клеточного роста. Изучение и расшифровка механизмов запрограммированной смерти клеток являются одним из наиболее актуальных направлений современной биофизики. Посредством апоптоза организм избавляется от ненужных, или, «отработавших» клеток. Путем апоптоза устраняются трансформированные клетки, например, при вирусной инфекции или повреждении ДНК, при онкологических заболеваниях. В настоящее время атомно-силовая микроскопия (АСМ) широко и интенсивно используется для решения различных биофизических задач, в том числе и для исследования механизмов запрограммированной клеточной смерти.

**Цель:** целью данной работы являлось исследование поверхностной морфологии клеток крысиной феохромоцитомы РС12 до и после воздействия внешнего индуктора апоптоза при разных методиках приготовления методом атомно-силовой микроскопии для изучения механизмов апоптоза клетки.

**Материалы и методы.** Исследование поверхностной морфологии клеток крысиной феохромоцитомы РС12 до и после воздействия внешнего индуктора апоптоза проводилось на атомно-силовом микроскопе Solver-P47. Микроскоп работал как в контактном режиме, так и в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием стандартных кремниевых кантилеверов. Перекись водорода использовалась в качестве внешнего индуктора апоптоза. В первой серии экспериментов исследовались клетки, выращенные на подложках из стекла, фиксированные в 4% растворе формалина и высушенные на воздухе. Одна группа клеток была контрольной, другая подвергалась воздействию 0.5 mM раствора  $H_2O_2$  в течение 20 мин. Во второй серии экспериментов исследовались клетки РС12, выращенные на подложках из стекла и высушенные на воздухе без фиксации в растворе формалина. Как и в первом случае, одна группа клеток была контрольной, другая - подвергалась воздействию 0.5 mM раствора  $H_2O_2$  в течение 20 мин.

**Результаты и их обсуждение.** Обнаружено, что клетки РС12 после воздействия  $H_2O_2$  уменьшаются в размерах (~ 8 мкм) и становятся более плоскими. На поверхности клеток видны локальные выпячивания наружной мембраны. По-видимому, под ними находятся остатки фрагментированного ядра. При малых окнах сканирования не наблюдается существенных нарушений целостности мембраны. По-видимому, удалось визуализировать везикулы, наполненные содержимым цитоплазмы (митохондрий, рибосомы и др.), размером ~ 200 нм, которые отделяются от мембраны клетки. Фиксация клеток в 4% растворе формалина затрудняет проводить эксперимент на больших полях сканирования.

**Выводы.** По-видимому, воздействие  $H_2O_2$  на клетки РС12 приводит к возрастанию свободных радикалов и уровня перекисного окисления липидов и проявляется в виде окислительного стресса. В условиях окислительного стресса происходит активация NMDA-рецепторов, приводящая к повышенному входу кальция внутрь клетки с последующей стимуляцией протеаз и разрушением клеточных структур. От мембраны клетки отделяются небольшие везикулы, наполненные содержимым цитоплазмы (митохондрий, рибосомы и др.), окруженные мембранным липидным бислоем. Клетка уменьшается в размерах. Можно предположить, что изменение поверхностной морфологии клеток РС12 после воздействия  $H_2O_2$ , визуализируемое АСМ, соответствует апоптотическому механизму гибели клеток.