

ских параметрах, определяющих различные сано-генетические механизмы.

Группа пациентов с низкой концентрацией NO_{X} при поступлении характеризовалась проявлениями хронического неспецифического воспалительного процесса и нарушением острофазового ответа. Спустя 10–12 суток отмечалось снижение имеющегося резерва.

Во второй группе с показателями NO_{X} , изначально превышающими порог 33 мкМ/л, воспалительные изменения характеризовались большей выраженностью острофазового ответа без признаков хронического неспецифического воспаления, что сопровождалось более высоким уровнем ОХ сыворотки крови. Образованные группы не имели четкого различия в прогностическом аспекте в связи с разнонаправленной динамикой параметров СВ и концентрацией NO_{X} за 10–12-дневный период [10], следующий за ПНМК.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Stroke incidence and mortality trends in US communities, 1987 to 2011 // S. Koton [et al.] // JAMA. — 2014. — Vol. 312, № 3. — P. 259–268.
2. Interventions for improving modifiable risk factor control in the secondary prevention of stroke / K. E. Lager [et al.] // The Cochrane Database of Systematic Rev. — 2014. — Vol. 2, № 5. — Doi: 10.1002/14651858.CD009103.pub2.
3. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / E. C. Jauch [et al.] // Stroke. — 2013. — Vol. 44, Is. 3. — P. 870–947.
4. Guidelines for the early management of stroke patients / C. Edward [et al.] // Stroke. — 2013. — Vol. 44, № 3. — P. 870–947.
5. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / W. N. Kernan [et al.] // Stroke. — 2014. — Vol. 45, Is. 7. — P. 2160–2236.
6. Definition and evaluation of transient ischemic attack / J. D. Easton [et al.] // Stroke. — 2009. — Vol. 40, Is. 6. — P. 2276–2293.
7. Нейропсихологический статус у пациентов с преходящими нарушениями мозгового кровообращения / Н. В. Галиновская [и др.] // Пробл. здоровья и экологии. — 2016. — № 2 (48). — С. 38–42.
8. Nitric oxide and interleukin-6 production in patients with transient cerebral microcirculatory disturbances / M. N. Starodubtseva [et al.] // Amer. J. Clinical Neurology and Neurosurgery. — 2015. — Vol. 1, № 2. — P. 86–91.
9. Parameters of systemic inflammatory response in patients with passing infringements of brain blood circulation / N. V. Halinouskaya [et al.] // British J. Med. and Med. Research. — 2016. — Vol. 15, № 1. — P. 1–10.
10. Прогноз инфаркта мозга у пациентов с преходящими нарушениями мозгового кровообращения в течение года по результатам измерения концентрации нитрит/нитрат ионов в плазме крови / Н. В. Галиновская [и др.] // Медицина. — 2016. — № 4 (95). — С. 16–21.
11. Лихачёв, С. А. Транзиторные ишемические атаки: этиология, патогенез, классификация, клиника, диагностика / С. А. Лихачёв, А. В. Астапенко, Н. Н. Белявский // Мед. новости. — 2003. — № 10. — С. 31–37.
12. Дривотинов, Б. В. Транзиторные ишемические атаки в свете современных нейрорепаративных представлений / Б. В. Дривотинов, Е. Н. Апанель, А. С. Мاستыкин // Нейрогуморальные механизмы регуляции функций в норме и патологии: [сб. науч. ст.] / Белорус. о-во физиологов, Ин-т физиологии НАН Беларуси; науч. ред.: В. Н. Гурин, В. Н. Калюнов, Д. М. Попутников. — Минск, 2007. — С. 305.
13. A simple score (ABCD) to identify individuals at high early risk of stroke after transient ischemic attack / P. M. Rothwell [et al.] // Lancet. — 2005. — Vol. 366, № 9479. — P. 29–36.
14. Стародубцева, М. Н. Двойственная роль пероксинитрита в организме / М. Н. Стародубцева // Пробл. здоровья и экологии. — 2004. — № 1. — С. 35–41.
15. Галиновская, Н. В. Параметры антиоксидантного статуса у пациентов с различными формами острых нарушений мозгового кровообращения / Н. В. Галиновская, В. В. Данильченко, Е. Г. Курбан // Новые аспекты в лечении и реабилитации ветеранов и лиц пожилого возраста (Гомель, 26 авг. 2016 г.): материалы Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 75-летию образования учреждения «Гомельский областной клинический госпиталь ИОВ»; под общ. ред. О. А. Иванцов. — Гомель, 2016. — С. 21–24.
16. Метаболические нарушения у больных дисциркуляторной энцефалопатией при лечении мексидолом / Н. И. Нечипуренко [и др.] // Вестник фонда фундаментальных исследований. — 2009. — № 3(49). — С. 42–49.
17. Метод оценки риска инфаркта мозга / М. Н. Стародубцева [и др.] — 2015. — Гомель. — 10 с. № 153 от 11.12.2015.
18. Сирота, Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // Вопр. мед. химии. — 1998. — Т. 45, № 3. — С. 263–272.
19. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. — М.: МедиаСфера, 2002. — 312 с.
20. Состояние иммунной системы у больных с острым инсультом / Н. М. Ребенко [и др.] // Журн. невропатологии и психиатрии. Инсулт. — 2005. — Вып. 14. — С. 46–49.
21. Особенности иммунологического статуса у пациентов с разными формами преходящих нарушений мозгового кровообращения / Н. В. Галиновская [и др.] // Пробл. здоровья и экологии. — 2016. — № 2 (39). — С. 27–33.

Поступила 30.10.2017

УДК 591.11+53.086]:616-092-07

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КЛЕТОК КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА И ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

М. Н. Стародубцева

Гомельский государственный медицинский университет,
Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель

Применение атомно-силовой микроскопии (АСМ) для исследования микро- и наномасштабных участков поверхности клеток позволяет ввести новые клеточные параметры, получить качественно новые представления о причинах и механизмах изменения свойств клеток. Целью работы являлась оценка на примере клеток крови состояния и перспектив АСМ для изучения и разработки новых методов диагностики заболеваний на основе анализа специфики режимов работы АСМ и новых АСМ-данных о свойствах поверхности клеток.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, цитоскелет, модуль Юнга, механические свойства клеток, фрактальная размерность, эритроциты, лейкоциты, раковые клетки, патология.

ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF CELLS AS A METHOD FOR THE STUDY OF THE PATHOGENESIS AND AS THE BASIS FOR THE DEVELOPMENT OF METHODS OF DISEASE DIAGNOSIS

M. N. Starodubtseva

Gomel State Medical University,
Institute of Radiobiology of NAS of Belarus, Gomel

The application of atomic force microscopy (AFM) for the study of micro- and nanoscale areas of the cell surface allows researchers to introduce new cell parameters and to obtain qualitatively new notions about the causes and mechanisms of changes of the cell properties. The aim of the work was to assess the prospects of AFM of cells using the example of blood cells for the study and development of new methods of disease diagnosis based on the specificity of AFM modes of operation and the recent AFM data on the cell surface properties.

Key words: atomic force microscopy, cytoskeleton, Young's modulus, cell mechanical properties, fractal dimension, erythrocytes, leukocytes, cancerous cells, pathology.

Введение

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является современным методом изучения геометрических и механических свойств поверхности твердых тел, включая различные биообъекты (ткани, клетки, органоиды) на микро- и наноуровнях, а также молекул и их комплексов, включая биомолекулы: белки, нуклеиновые кислоты и др. Со времени разработки АСМ до настоящего времени наблюдается лавинообразный рост публикаций, посвященных ее применению в медико-биологической науке. С помощью АСМ изучают, как правило, не популяции, ансамбли или слои клеток, а отдельные клетки и молекулы. На уровне отдельных клеток выявляют неоднородность структуры и механических свойств их поверхности, общие и специфические черты их ответов на одни и те же стимулы, что открывает новую страницу в понимании патогенеза различных заболеваний.

Изучение с помощью АСМ взаимодействия одних и тех же или различных по природе отдельных клеток между собою, с наночастицами, протяженными субстратами, микроорганизмами углубляет понимание принципов существования различных клеток и клеточных систем, способствует появлению новых перспективных методов диагностики и терапии заболеваний человека.

Цель работы

Оценить на примере клеток крови состояние и перспективы АСМ для изучения и разработки новых методов диагностики заболеваний на основе анализа специфики режимов работы АСМ и новых АСМ-данных о свойствах поверхности клеток.

Принцип и режимы работы АСМ

Атомно-силовая микроскопия относится к методам зондовой микроскопии, к нанотехнике. Принцип получения увеличенного изображения объекта в атомно-силовой микроскопии отличен от принципа, реализуемого в оптическом, электронном и звуковом микроскопах.

Изображение поверхности объекта получается при сканировании поверхности в результате взаимодействия атомов наноразмерного острия зонда-индентора, находящегося на конце длинной консоли (кантилевера), с атомами поверхности объекта. С помощью системы обратной связи при сканировании реализуется режим поддержания определенной величины силы или определенного расстояния между исследуемой поверхностью и рабочей поверхностью зонда. Локальные изменения геометрии поверхности или свойств ее материала вызывают деформацию консоли в вертикальном или горизонтальном (боковом, латеральном) направлениях. Луч лазера отражается от поверхности консоли и попадает в определенную область фотодиодной матрицы. Цифровой сигнал записывается в виде файла, который затем обрабатывается с помощью программ обработки данных. В отличие от световых, электронных и звуковых микроскопов в атомно-силовых микроскопах получают записанное в цифровой форме трехмерное изображение поверхности объекта. Важными преимуществами атомно-силового микроскопа являются его разрешающая способность, сравнимая с разрешающей способностью электронного микроскопа, получение информации не только о геометрии реальной поверхности объекта, но и о ее физических свойствах (механических, электрических и др.), а также возможность работы с более щадящими для биологических образцов методами пробоподготовки и работы с живыми клетками [1–3]. С помощью АСМ можно изучать особенности геометрии и свойств (силу и энергию, необходимые для конформационных перестроек элементов структуры) отдельных макромолекул, а также силы взаимодействия между определенными молекулами, помещенными на поверхность острия АСМ-зонда, и поверхностью клеток [2, 3].

Классически режимы АСМ-сканирования делят на контактный, бесконтактный и полуконтактный (режим обстукивания) в зависимости

от выбранного диапазона Ван-дер-Ваальсовых сил, действующих между поверхностью острия зонда и объекта [1, 3]. Каждый из режимов имеет как преимущества, так и недостатки. Так, контактный режим сканирования характеризуется самой высокой разрешающей способностью и скоростью сканирования, но предполагает, в основном, работу в газовой атмосфере, включая воздух (при этом необходимо учитывать влияние капиллярных сил), или в вакууме. Кроме того, в контактном режиме острие зонда может деформировать поверхность объекта, привести к разрушению исходных структур поверхности, гибели биологических объектов. В бесконтактном режиме сканирования зонд микроскопа не оказывает деформирующего воздействия на поверхность объекта, но результат сканирования сильно зависит от внешних шумов, характеризуется малым разрешением и скоростью сканирования. В полуконтактном режиме сканирования (обстукивание или прерывистый контакт) консоль с зондом раскачивают генератором механических колебаний на ее резонансной частоте (или немного меньше) с амплитудой порядка 10–100 нм, при этом зонд контактирует с поверхностью только в нижних полупериодах гармонических колебаний зонда, а основную часть периода колебаний он не взаимодействует с поверхностью. Этот режим является наиболее универсальным методом исследования биообъектов в связи с минимальным (щадящим) механическим воздействием на объект при сканировании.

По состоянию консоли режимы работы также делят на статические и динамические [1]. Если в консоли возбуждают вынужденные колебания в направлении нормали к исследуемой поверхности, то такой режим называют динамическим, в случае отсутствия колебаний консоли — статическим режимом.

Различают АСМ-сканирование, АСМ-индентирование и смешанный режим АСМ. При АСМ-сканировании получают профили значений исследуемого свойства поверхности (характер изменения высоты неровностей реальной поверхности или механических параметров ее поверхностного слоя) вдоль конкретной линии сканирования (траектории движения зонда) или его трехмерные карты (рельеф) для всего исследуемого участка поверхности. Локальные значения свойств (в основном физико-механических свойств: модулей упругости, сил адгезии, параметров диссипации энергии и др.) получают при индентировании: вертикальном внедрении зонда в поверхностный слой исследуемого образца [3]. Последний режим носит название силовой спектроскопии. При этом острие зонда приближается к образцу, контактирует с его поверхностью и внедряется в нее (локально деформирует поверхност-

ный слой), после чего удаляется от поверхности. В силовой спектроскопии записывают кривые отвода-подвода, позволяющие затем построить кривую «сила-расстояние» и рассчитать с использованием различных моделей взаимодействия твердых тел такие параметры, как модули упругости, силу адгезии, жесткость и др. Есть режимы, совмещающие сканирование и индентирование поверхности. При этом получают карту свойств поверхности (например, карту жесткости или распределения модуля Юнга), проводя отдельные индентирования в каждой точке участка поверхности с определенным разрешением получаемого изображения $N \times N$. После обработки $N \times N$ кривых подвода-отвода создают карты распределения локальных модулей упругости, значений сил адгезии, диссипации энергии и некоторых других параметров поверхности.

Параметры поверхности, оцениваемые с помощью АСМ, их значение для анализа состояния и свойств биообъектов

С помощью АСМ можно оценить с высокой точностью форму и размеры клеток, бактерий, вирусов, клеточных элементов, агрегатов микроорганизмов, а также микро- и наномасштабные параметры структурных элементов клеточной мембраны [3–5]. С появлением высокоскоростной атомно-силовой микроскопии стало возможным визуализировать многие клеточные процессы, которые невозможно было зафиксировать другими методами, кроме АСМ [6].

С одной стороны, в биологии существует набор параметров, характеризующих морфологические свойства клеток. Так как АСМ позволяет получить реально трехмерное изображение объекта, то к традиционным для световой и электронной микроскопии параметрам, таким как диаметр и длина добавились еще и высота клеток, площадь поверхности клеток, объем клеток и производные от вышеупомянутых параметров (степень распластываемости, соотношение площадей или площади и объема и др.) [3–5].

С другой стороны, в промышленности существует стандарт для определения геометрических характеристик поверхности: ИСО 25178-2:2012* «Геометрические характеристики изделий (GPS). Структура поверхности. Ареал. Часть 2. Термины, определения и параметры структуры поверхности» (ISO 25178-2 «Geometrical Product Specifications (GPS) – Surface texture: Profile method – Part 2: Terms, definitions and surface texture parameters»). Стандарт включает несколько десятков параметров, таких как параметры высот, пространственные, гибридные, функции и связанные с ними параметры, фрактальные параметры и некоторые другие. Известны попытки применить этот стандарт для стандартизации оценки параметров клеточных поверхностей с помощью АСМ [7].

Важной характеристикой геометрии поверхности реальных объектов, особенно биообъектов, является фрактальная размерность. Она характеризует самоподобие свойств объекта в разных масштабах измерений и в отличие от топологической размерности, имеющей целочисленные значения (1 для линии, 2 для плоскости, 3 для объема), является дробной. Для поверхности, включая клеточную поверхность, фрактальная размерность может быть больше 2 и меньше 3. Она показывает, насколько полно поверхность заполняет объем (3-мерное пространство). Если поверхность достаточно гладкая, то ее фрактальная размерность будет ближе к 2 в отличие от очень развитой поверхности с многочисленными выступами и впадинами, фрактальная размерность которой будет стремиться к 3. Фрактальная размерность является интегральной характеристикой распределения свойств поверхности клеток. Она зависит от состояния и типа клеток, поэтому может быть использована в качестве маркера патологии клеток. Фрактальная размерность находит широкое применение при анализе состояния клеточной поверхности в связи с расширением использования АСМ в биологии и медицине. Различие поверхностей клеток нормальных тканей и раковых клеток обнаружено в ряде исследований для карт механических

свойств (адгезии и трения), оцененных АСМ-методами [8–9].

На рисунке 1 представлено различие фрактальных размерностей фибробластов и некоторых типов раковых эпителиальных клеток, оцененных по картам механических свойств (латеральных сил) участков поверхности в средней части адгезированных к стеклянным пластинам клеток, что исключает влияние ядра и структур цитоскелета периферии клетки.

Важным достоинством АСМ является то, что с помощью этого метода можно одновременно с геометрическими свойствами, характеризующими реальную поверхность твердого тела, включая клетки, определять также механические свойства поверхностного слоя. С помощью иглы-зонда АСМ «прощупывается» не вся клетка в целом, а только ее часть, ее поверхностный слой, глубина которого зависит от используемого метода АСМ. Поверхностный слой клетки представляет собой слоистый композитный материал, состоящий для большинства клеток человека и животных из гликокаликса, бислоевой липидной мембраны и кортикального цитоплазматического слоя, содержащего цитоскелетные структуры. Структура и состав (белки, липиды) этого слоя определяют ответ поверхности клетки на силовое воздействие острия зонда АСМ [1, 3].

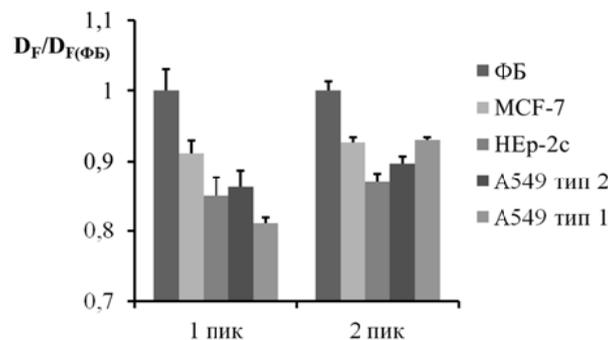


Рисунок 1 — Относительные фрактальные размерности микромасштабных карт механических свойств (карт латеральных сил) поверхности фибробластов (ФБ) и раковых эпителиальных клеток линий (MCF-7, HEp-2c, A549).

Относительная фрактальная размерность $D_F/D_{F(ФБ)}$ вычислена относительно средней фрактальной размерности для выборки образцов фибробластов ($D_{F(ФБ)}$). Фрактальные размерности оценены с помощью метода подсчета кубов и разбиения микромасштабного участка поверхности на 8 прямоугольных участков одинаковой площади для коэффициентов масштабирования поверхности по оси Z: $t = 0,0183$ (1 пик, $D_{F(ФБ)} = 2,27$) и $t = 2,7183$ (2 пик, $D_{F(ФБ)} = 2,32$) [9]. Два типа в популяции клеток A549 представляют собой «фибробластоидный» тип (тип 1) и «эпителиоидный» тип (тип 2) [23].

Данные представлены в виде границ 95 % доверительного интервала ($n = 3-11$)

Ключевую роль в ответе поверхности клеток на механическое воздействие острия зонда играют различные структуры цитоскелета, в основном кортикальных актиновых структур. Система цитоскелета является одной из первых, которая формирует основной ответ клеток на любой внешний и внутренний стимул. Именно определение состояния цитоскелета часто явля-

ется самым интересным и важным для анализа нормы и патологии клеток. Состояние цитоскелета можно охарактеризовать с помощью параметров структуры и состава, а также механических свойств. С помощью силовой спектроскопии можно оценить локальные значения как статических, так и динамических модулей упругости клеточной поверхности. Вещества, включая

окисляющие агенты, образующие многочисленные сшивки белковых макромолекул, способствуют сгущению сети цитоскелета, что отражается в увеличении значений локальных модулей упругости [4]. Вещества, подавляющие образование цитоскелетных структур или способствующие их разрушению, например, цитохалазины, способствуют уменьшению жесткости клеточных поверхностей [4]. При воспалительных и онкологических процессах модуль упругости поверхности клеток, как правило, уменьшается, при старении — увеличивается [3, 4]. Существуют методы картирования с помощью АСМ-значений модуля упругости или жесткости, а также сил адгезии и трения, которые также определяются состоянием кортикального цитоскелета, для поверхности клеток. С помощью различных методик картирования механических свойств клеточной поверхности установлены различные параметры распределения этих свойств в зависимости от состояния цитоскелета, в том числе и определяемое различными типами клеток [1–3, 10, 11].

Состояние и перспективы изучения свойств клеток крови с помощью методов АСМ

Кровь является важнейшей тканью организма, связывающей все его органы и другие ткани, снабжающей их необходимыми для функционирования веществами и уносящей ненужные им продукты, во многом определяющей целостность организма, играющей существенную роль в его гомеостазе, способности противостоять изменениям его состава, структуры, функций и состояния под действием внешних и внутренних факторов. В ее составе и свойствах ее клеток находят отражение также и патологические процессы, протекающие в организме. Естественно, что перспективы использования АСМ в медико-биологической области целесообразно рассмотреть в первую очередь на примере изучения с ее помощью клеток крови. Их легко получить как клинический материал для исследования. В крови, как правило, клетки находятся как отдельные клетки, что является желательным

при микро- и наномасштабных АСМ-исследованиях клеточной поверхности.

В настоящее время с помощью АСМ наиболее исследованы основные клетки крови — эритроциты. Изучены морфологические и механические свойства эритроцитов при различных заболеваниях: врожденных нарушениях структуры и свойств эритроцитов (талассемии, врожденном сфероцитозе, дефиците глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, Г6ФДГ), анемиях (железодефицитных анемиях), диабетах, ревматоидном артрите, системной красной волчанке, муковисцидозе, механической желтухе, гипертонии, кровопотерях, инфаркте, малярии [11–16] (таблица 1). Выявлены изменения механических и геометрических свойств поверхности (карт рельефа) эритроцитов человека при старении организма, у курильщиков, а также работников вредных производств [3]. Эритроциты являются удобной моделью для изучения различных свойств и функций клеток, не связанных с функциями и свойствами клеточного ядра. АСМ-методы позволили изучить структуру и механические свойства цитоскелета и липидных рафтов, а также установить взаимосвязь механических свойств эритроцитов с их метаболическим состоянием [3, 4]. На примере эритроцитов методами АСМ изучено действие на клеточную мембрану факторов различной природы: ионизирующего излучения (альфа-излучения, нейтронного излучения), лазерного и инфракрасного излучения, ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} , окисляющих реагентов (глутарового альдегида, пероксинитрита, пероксида водорода, гидропероксидов и др.), различных биохимических агентов (ингибитора Г6ФДГ, цАМФ, протеинкиназы А, гормонов, противосудорожных препаратов и других), температуры [2, 4, 16, 17] (таблица 1). Выявлены существенные изменения микро- и нанорхитектоники поверхности эритроцитов и ее механических свойств в процессе хранения крови, а также при старении эритроцитов [11, 13] (таблица 1). АСМ-методами выявлено присутствие на поверхности эритроцитов рецептора для фибриногена, изучено взаимодействие эритроцитов с квантовыми точками [14].

Таблица 1 — АСМ-параметры поверхности эритроцитов и их изменения при различных патологических состояниях

Причины изменения свойств эритроцитов	АСМ-параметры и их изменение	Источник: автор, год
Жесткость клеточной мембраны, модули упругости, силы адгезии, силы трения скольжения		
Г6ФД-дефицитная анемия	Увеличение модуля Юнга, уширение его распределения (гетерогенность)	Dulinska, 2006
Подавление активности Г6ФД	Увеличение модуля Юнга	Zhang, 2017
Наследственный сфероцитоз	Уширение распределения (гетерогенность) и тенденция к увеличению модуля Юнга	Dulinska, 2006
Талассемия		
Диабет	Увеличение коэффициента жесткости и модуля Юнга (зависит от возраста и скорости индентирования эритроцитов); уширение распределения (гетерогенность) модуля Юнга	Jin, 2010 Chen, 2009 Ciasca, 2015 Стародубцева, 2008

Окончание таблицы 1

Причины изменения свойств эритроцитов	АСМ-параметры и их изменение	Источник: автор, год
Окислительный стресс, вызванный различными веществами	Увеличение модулей упругости (модуля сдвига, модуля Юнга), сил адгезии, сил трения	Sinha, 2015 Стародубцева, 2007, 2008.
Хранение эритроцит-содержащих препаратов крови	Увеличение модуля Юнга и поверхностного потенциала (к 35 суткам)	Ламзин, 2014
Ревматоидный артрит	Увеличение коэффициента жесткости	Olumuyiwa-Akeredolu, 2017
Внебольничная пневмония	Уменьшение модуля Юнга и сил адгезии в разгаре заболевания	Гельдр, 2017
Криоконсервирование под защитой 40% глицерина	Уменьшение сил адгезии	Багаудинов, 2014
Параметры распределения геометрических и механических свойств на нано- и микроуровнях		
Наследственный сфероцитоз	Уменьшение шероховатости топографии	Ying, 2016 Girasole, 2007
Диабет	Уменьшение шероховатости топографии; Уширение распределения фрактальной размерности карт механических свойств	Bygs, 2013 Стародубцева, 2008
Г6ФД-дефицитная анемия	Увеличение шероховатости топографии	Dulinska, 2006 Fang, 2015, 2017 Tang, 2015
Г6ФД-дефицит	Увеличение шероховатости топографии	Fang, 2015, 2017 Tang, 2015
Талассемия	Увеличение шероховатости топографии	Makherjee, 2014
Железодефицитная анемия	Увеличение шероховатости топографии	Zhang, 2012
Уменьшение активности Г6ФД, концентрации GSH и MDA	Увеличение шероховатости топографии	Ghosh, 2017
Действие гормонов стресса	Увеличение шероховатости топографии	Makrushnikov, 2015
Тяжелая сочетанная травма	Увеличение высот неоднородностей поверхности с размерами 600–1000 нм в 9 раз, 70–300 нм — в 1,5 раз и 20–60 нм — в 3 раза	Мороз, 2013
Хранение эритроцитарной массы	Уменьшение высот неоднородностей поверхности с размерами 600–1000 нм к 25 суткам, 400–600 нм — к 19 суткам и 120–200 нм — к 7 суткам хранения	Козлова, 2015
Хранение эритроцитарной массы	Увеличение шероховатости карт механических свойств до 20 суток и существенное уменьшение после 20 суток хранения	Стародубцева, 2015
Действие ионов цинка и фуросемида	Увеличение высот неоднородностей поверхности с разными размерами в зависимости от концентрации реагента	Мороз, 2014 Козлова, 2013
Гипертензия, облучение нейтронами	Изменение комплекса статистических и мультифрактальных параметров топографического изображения поверхности клетки	Talu, 2015
Окислительный стресс, вызванный пероксинитритом	Гетерогенность свойств; изменение фрактальной размерности карт механических свойств	Стародубцева, 2007
Цирроз печени	Уменьшение шероховатости карт механических свойств, увеличение фрактальной размерности карт	Стародубцева, 2015
Инфекционные заболевания верхних дыхательных путей	Гетерогенность механических свойств; уменьшение шероховатости карт механических свойств у сфероцитов	Стародубцева, 2015

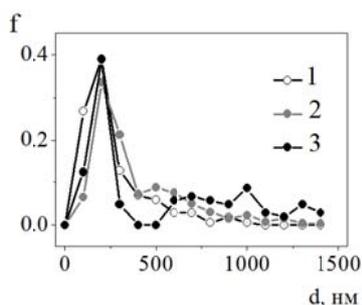
Изменения геометрических и механических свойств эритроцитов при различных воздействиях и состояниях организма определяются в основном реорганизацией цитоскелета, представляющего собой двумерную актин-

спектриновую сеть, находящуюся в контакте с плазматической мембраной и связанную с ней через определенные белки. Увеличение степени поперечных сшивок между цитоскелетными белками и уменьшение размеров ячеек ак-

тин-спектриновой сети приводит к увеличению модуля Юнга и жесткости поверхности эритроцитов [3, 4]. Эти процессы имеют место при выраженном окислительном модифицировании структуры цитоскелета: при действии окисляющих агентов в высоких концентрациях, при старении организма, при длительном хранении крови [3, 4, 11, 13]. Окисляющие агенты в малой концентрации могут приводить к деструкции биомакромолекул и структур цитоскелета, что выражается в уменьшении мо-

дуля Юнга и жесткости поверхности эритроцитов, наблюдаемое, например, при инфекционных заболеваниях [4, 18].

С помощью АСМ изучено взаимодействие различных соединений с поверхностью лейкоцитов, а также лейкоцитов с эндотелиальными клетками [19]. Были выявлены изменения структуры микромасштабных участков поверхности нейтрофилов при их активации окисляющим агентом (пероксинитритом) и контактом со стеклянной пластиной (рисунок 2) [4].



Под-тип	D/h	Размер мелких гранул, нм	Размер крупных гранул, нм	R ²
1	3,4 ± 0,6	168,7 ± 72,2	-	0,95
2	10,3 ± 1,5	239,9 ± 32,4	556,0 ± 170,1	0,99
3	26,6 ± 1,0	168,5 ± 37,6	939,3 ± 630,0	0,97

Рисунок 2 — АСМ-анализ размеров гранул на поверхности активированных пероксинитритом нейтрофилов.

Примечание. Полигоны частот для диаметров гранул на поверхности нейтрофилов, представленные на рисунке, были аппроксимированы одним или двумя пиками Лоренца (R² — коэффициент смешанной корреляции). Данные в таблице представлены как середина и полуширина пика Лоренца

Активированные нейтрофилы были разделены по степени их расплывания на стеклянной пластине на три подтипа: клетки со значением отношения диаметра к ее высоте $D/h < 6,5$ отнесены к первому, $6,5 < D/h < 16-18$ — второму, а $D/h > 18$ — третьему подтипу. Для поверхности клеток первого подтипа характерны мелкие гранулы диаметром до 500 нм и высотой до 50 нм. Структурные элементы поверхности с размерами 200 нм и меньше могут быть отнесены как к гранулам (желатиназным и специфическим) нейтрофилов, так и к ячейкам кортикального актинового цитоскелета нейтрофилов. Более крупные структурные элементы, появляющиеся на поверхности нейтрофилов второго и третьего типов, могут быть соотнесены либо с азурофильными гранулами нейтрофилов, либо с вакуолями и микропузырьками-микрочастицами, образующимися в результате активации нейтрофилов.

АСМ нашла применение и в области изучения тромбоза [20]. Были изучены как структурные и механические свойства тромбоцитов в норме при их активации и при патологических состояниях организма, так и структурные и механические свойства и влияющие на них факторы для отдельных белков — участников процесса свертывания крови.

Другими перспективными направлениями использования АСМ для медико-биологических

целей являются: изучение свойств раковых клеток и тканей при различных стадиях онкогенеза, влияния факторов разной природы на эти свойства; изучение структуры и физических свойств бактерий и вирусов; изучение свойств и особенностей взаимодействия клеток с наночастицами (содержащими серебро, золото, кадмий и др.), полимерными наночастицами (дендримерами) с целью разработки новых методов диагностики и терапии заболеваний; изучение свойств микро- и нановезикул, механизма их образования из клеток и взаимодействия с клетками организма для использования этих везикул в диагностике ряда заболеваний; взаимодействия клеток; изучение агрегатов макромолекул (например, белков) для углубления понимания патогенеза заболеваний; изучение механизмов взаимодействия «клетка-клетка», «клетка-микроорганизм», «клетка-субстрат».

Заключение

За последние годы применение атомно-силовой микроскопии для исследования свойств клеток позволило получить принципиально новые знания об изменении их свойств как на уровне целых клеток, так и микро- и наномасштабных участков их поверхности на основе введения новых для медико-биологической области параметров. С ее помощью изучены многие аспекты геометрии (шероховатости) реальной поверхности и механиче-

ские свойства поверхностного слоя, включая параметры их карт, клеток в норме и при патологиях. АСМ-параметры клеточной поверхности позволяют разрабатывать новые критерии для оценки механических свойств клеток, включая клетки крови, как в норме, так и при патологиях. Перспективной интегральной характеристикой распределения свойств клеточной поверхности является фрактальная размерность. Актуально дальнейшее развитие методик, использующих эти новые оцененные на микро- и наноуровнях параметры для характеристики состояния клеток, позволяющих улучшить диагностику патологии организма. Важным является то, что эти методы диагностики патологии организма на клеточном уровне основаны на оценке механических свойств клеточной поверхности, что принципиально отличается от используемых сегодня повсеместно биохимических методов и традиционных методов световой и электронной микроскопии. В связи с простотой принципа атомно-силовой микроскопии и возможностью работы в физиологических для клеток условиях актуальным является внедрение методов АСМ в практическую медицину и создание специализированных для клиник моделей АСМ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кузнецова, Т. Г. Методологические проблемы изучения наномеханических свойств живых клеток / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Проблемы здоровья и экологии. — 2007. — № 3. — С. 103–111.
2. Yeow, N. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology / N. Yeow, R. F. Tabor, G. Garnier // Adv. Colloid. Interface Sci. — 2017. — pii: S0001-8686(17)30076-3. doi: 10.1016/j.cis.2017.05.011.
3. Morton K. C. Atomic force microscopy-based bioanalysis for the study of disease / K. C. Morton, L. A. Baker // Anal. Methods. — 2014. — Vol. 6. — P. 4932–4955.
4. Стародубцева, М. Н. Пероксинитрит в патологии и физиологии клеток крови / М. Н. Стародубцева. — М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2011. — 200 с.
5. Никитина, И. А. Поверхностная архитектура и состояние цитоскелета тимоцитов крыс разного возраста при действии пероксинитрита / И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, А. И. Грицук // Успехи геронтол. — 2011. — Т. 24. № 2. — С. 227–233.
6. High-speed atomic force microscopy imaging of live mammalian cells. / M. Shibata [et al.] // Biophys. Physicobiol. — 2017. — Vol. 14. — P. 127–135.
7. Multifractal characterization of morphology of human red blood cells membrane skeleton / Ş. Țălu [et al.] // J. Microsc. — 2016. — Vol. 262(1). — P. 59–72.
8. Fractal properties of cell surface structures: A view from AFM / A. Bitler, R. S. Dover, Y. Shai // Semin. Cell Dev. Biol. — 2017. — pii: S1084-9521(17)30017-4. doi:10.1016/j.semedb.2017.07.034.
9. Starodubtseva, M. N. Novel fractal characteristic of atomic force microscopy images / M. N. Starodubtseva, I. E. Starodubtsev, E. G. Starodubtsev // Micron. — 2017. — Vol. 96. — P. 96–102.
10. Starodubtseva, M. N. Mechanical properties of cells and ageing / M. N. Starodubtseva // Ageing Res. Rev. — 2011. — Vol. 10, № 1. — P. 16–25.
11. АСМ-диагностика патологии эритроцитов на основе физико-механического образа клеточной поверхности / М. Н. Стародубцева [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. — 2015. — № 2. — С. 99–104.
12. Mapping viscoelastic properties of healthy and pathological red blood cells at the nanoscale level / G. Ciasca [et al.] // Nanoscale. — 2015. — Vol. 7(40). — P. 17030–17037.
13. Disorders in the morphology and nanostructure of erythrocyte membranes after long-term storage of erythrocyte suspension: atomic force microscopy study / V. V. Moroz [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. — 2015. — Vol. 159(3). — P. 406–410.
14. Interactions of quantum dots with donor blood erythrocytes in vitro // S. N. Pleskova [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. — 2014. — Vol. 156(3). — P. 384–388.
15. Структурно-механические свойства мембран эритроцитов у больных сахарным диабетом 2-го типа / М. Н. Стародубцева [и др.] // Бюл. exper. биол. мед. — 2008. — Т. 145, № 1. — С. 106–110.
16. Стародубцева, М. Н. Механические свойства эритроцитарных мембран при действии пероксинитрита / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, С. Н. Черенкевич // Бюл. exper. биол. и мед. — 2007. — Т. 143, № 2. — С. 227–230.
17. Starodubtseva, M. N. Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy / M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, I. A. Nikitina // Micron. — 2012. — Vol. 43, № 12. — P. 1232–1238.
18. Ультраструктурные характеристики эритроцитов при внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста / Б. И. Гельдер [и др.] // Военно-медицинский журнал. — 2017. — Т. 338. — С. 40–47.
19. Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction / X. Zhang [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. — 2004. — Vol. 286(1). — P. H359–H367.
20. The melding of nanomedicine in thrombosis imaging and treatment: a review. / V. Karagkiozaki [et al.] // Future Sci. OA. — 2016. — Vol. 2(2). — P. FSO113.
21. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: A quantitative atomic force microscopy investigation / M. Girasole [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. — 2007. — Vol. 1768. — P. 1268–1276.
22. Nano-scale surface characterization of human erythrocytes by atomic force microscopy: A critical review / R. Mukherjee [et al.] // IEEE Trans Nanobioscience. — 2015. — Vol. 14(6). — P. 625–633.
23. Геометрические и физико-механические параметры фибробластов и раковых клеток человека линий A549 и HEP-2c, оцененные с помощью атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. — 2016. — № 1. — С. 60–66.

Поступила 31.10.2017

УДК 617:615.468.6]:615.281

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ШОВНОГО МАТЕРИАЛА

А. С. Князюк¹, Д. Н. Бонцевич¹, Н. И. Шевченко²

¹Гомельский государственный медицинский университет,
²Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

Цель: провести сравнительную оценку выраженности и продолжительности антибактериального действия монофиламентных полипропиленовых нитей и полифиламентных нитей из полигликолевой кислоты, модифицированных антибиотик-содержащим покрытием.

Материалы и методы. Исследована исходная антибактериальная активность образцов нитей, содержащих антибактериальный препарат из группы фторхинолонов в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa* и её ди-