

3. Проведенный эксперимент с применением аллоЛТФР не выявил каких-либо побочных эффектов. Можно констатировать факт отсутствия реакции со стороны иммунной системы в ответ на введение аллоЛТФР.

4. Проведенная статистическая обработка результатов исследований позволяет считать эффективность использования аллоЛТФР доказанной.

Список литературы:

1. Официальный сайт ГИБДД РФ / <http://stat.gibdd.ru> (дата обращения: 07.06.2021).
2. *Einhorn T.A., Gerstenfeld L.C.* Fracture healing: Mechanisms and interventions // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015. Jan. Vol. 11. № 1. PP. 45-54.
3. *Блаженко А.Н., Куринный С.Н., Муханов М.Л., Агеев М.Ю., Горбунов А.В., Шацкая Е.А., Савицкая К.Н.* Результаты лечения открытых переломов у пациентов с политравмой в условиях региональной травмосистемы // *Кубанский научный медицинский вестник.* 2018. Т. 25. № 3. С. 28-33.
4. *Самодай В.Г., Стариков А.О., Калашиников П.И., Мандроценко П.А.* Псевдоартрозы: поиск методов лечения замедленной консолидации и несращения // *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2022. Т. 17. № 1. С. 105-111.
5. *Seibel M.J., Robins S.P., Bilezikian J.P.* Dynamics of bone and cartilage metabolism. – Academic press. San Diego, 1999.
6. *Самодай В.Г., Стариков А.О., Калашиников П.И.* Лиофилизированные аллогенные факторы роста в травматологии и ортопедии как перспективное направление регенеративной медицины // *Политравма.* 2019. № 4. С. 15-28.
7. *Messoro M.R., Nagata M.J.H., Furlaneto F.A.C., Dornelles R.C.M., Bomfim S.R.M., Deliberador T.M. et al.* A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats // *RSBO.* 2011. Vol. 8. № 3. PP. 299-304.

8. *Концевая С.Ю., Дерхо М.А., Десятниченко К.С.* Способ контроля над репаративным остеогенезом у животных / Патент № 2279676. Номер патента RU 2 279 676 С2. Дата регистрации: 16.06.2003. Номер заявки: 2003117818/15. Дата публикации: 27.02.2005.
9. *Gavin W., Ippokratis P., Peter V.G.* The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: Current evidence // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018. Vol. 12. № 3. PP. 1662-1677.
10. *Branco A., Yoshikawa F., Pietrobon A., Sato M.* Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation // *Review Mediators Inflamm.* 2018. Aug. 27. 2018. Art ID T9524075.

*Валерий Григорьевич Самодай,
д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой,
Андрей Олегович Стариков,
аспирант,
кафедра травматологии и ортопедии,
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
Василий Александрович Ермолаев,
врач травматолог-ортопед,
БУЗ Воронежской области «Воронежская
городская клиническая больница скорой
медицинской помощи 10»,
г. Воронеж,
e-mail: Staricov9066733720@yandex.ru*

*Т.О. Советников, А.И. Ахметова, В.М. Гукасов, Г.С. Евтушенко,
Ю.Л. Рыбаков, И.В. Яминский*

Сканирующая зондовая микроскопия в оценке шероховатости клеток крови

Аннотация

Сканирующая зондовая микроскопия за последние 30 лет совершила удивительный скачок, который позволяет не только получать 3D-визуализацию объектов в нанометровом масштабе, но и проводить измерения морфологических характеристик биологических объектов, обнаруживать объекты в малых концентрациях в жидкости, оценивать механические свойства клеток. Статья посвящена использованию достижений атомно-силовой и капиллярной микроскопии для целей медицины и фармакологии применительно к наблюдению клеток крови.

Введение

В последнее время все большее распространение в исследованиях параметров заболеваний клеток крови приобретает зондовая микроскопия: атомно-силовая [1] и капиллярная [2]. Атомно-силовая микроскопия позволяет получать топографию клеток, определять латеральные размеры, измерять упругость и шероховатость [3]. Эти данные можно использовать в диагностических целях. Эритроциты при нейродегенеративных патологиях характеризуются уменьшенным количеством клеток двояковогнутой дисковидной формы, меньшей шероховатостью поверхности и более высоким модулем Юнга по сравнению со здоровыми клетками [4]. В работе [5] исследовались эритроциты женщин, которые страдают от выкидышей на ранней стадии. Их клетки отличаются как по величине шероховатости, так и по модулю Юнга по сравнению со значениями у небеременных и здоровых беременных, у которых данные показатели ниже. Более того, была обнаружена тенденция к уменьшению морфометрических параметров клеток (размера клеток и шероховатости поверхности) и эластичности мем-

браны, которые уменьшались гораздо быстрее для опытной группы, чем для двух контрольных групп. Ускоренное старение эритроцитов выражается в более быстром преобразовании морфологической формы и более раннем появлении клеток спиккулярной и шаровидной форм, уменьшении шероховатости и эластичности мембраны с возрастной эволюцией. Окислительный стресс *in vitro* способствовал морфологическим изменениям клеток, наблюдаемым для стареющих эритроцитов женщин с выкидышами на ранней стадии.

В работе [6] оценивались морфометрические параметры эритроцитов, полученные при помощи зондовой микроскопии: степень пластичности клеток, объем, диаметр, высота, среднеквадратичная шероховатость по области. Для реаниматологии атомно-силовая микроскопия может дать ценную информацию об изменении поверхности мембран эритроцитов вследствие появления пор после электропорации [7].

Сложность работы с эритроцитами заключается в том, что в кровотоке эти клетки никогда не присутствуют в фиксированном состоянии, поэтому при измерении необходимо минимизировать воздействие фиксаторов, например глутарового

альдегида, на образец исследования. В этом случае хорошим решением является использование сканирующей капиллярной микроскопии, которая позволяет осуществлять сканирование в жидкости без силового воздействия на образец со стороны зонда (в этом случае – капилляра). Особый интерес представляет взаимодействие клеток крови с вирусом гриппа А, исследованное при помощи атомно-силовой и капиллярной микроскопии: в частности, по изменению шероховатости клеток была оценена вероятность адсорбции вируса на поверхности клеток [8].

Цель настоящей работы состоит в определении морфометрических характеристик эритроцитов, определении их свойств для использования в биомедицине. Среди первостепенных задач исследования – сравнение данных морфологии и геометрических характеристик эритроцитов крови человека, измеренных при помощи АСМ на воздухе и при помощи СКМ в жидкости.

Материалы и методы

Исследования клеток крови проводились методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) и сканирующей капиллярной (ион-проводящей) микроскопии (СКМ).

Для исследований на атомно-силовом микроскопе была использована кровь здорового человека. Образец готовили на тонком стерильном стекле: каплю крови объемом 10...12 мкл наносили на стекло и при помощи другого чистого стекла распределяли тонким слоем, помещая его под углом 45° коротким ребром. АСМ-изображения были получены на микроскопе «ФемтоСкан» (Россия) в контактном режиме на воздухе. В экспериментах использовался кантилевер марки frC01 с жесткостью 0,03 Н/м, время съемки кадра – около 8 мин.

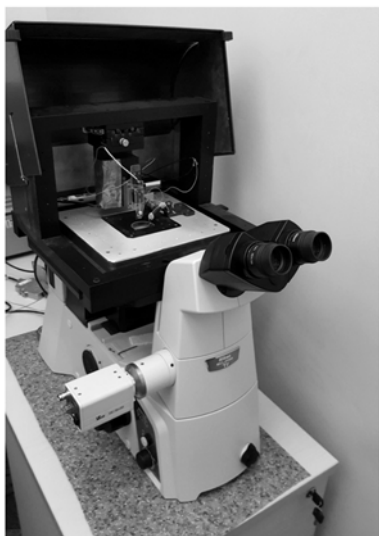


Рис. 1. Сканирующий капиллярный микроскоп на базе оптического инвертированного микроскопа «Nikon Ti-U»

СКМ-изображения были получены на установке собственной разработки на базе оптического инвертированного микроскопа «Nikon Ti-U» (рис. 1). Для измерений на капиллярном микроскопе образец приготовлен путем помещения крови, забранной из пальца с использованием ланцета, в изотонический буфер Алена, который в дальнейшем служил и в качестве электролитической среды. Далее препарат наносили на свежесколотую слюду, предварительно модифицированную полилизинном, нейтрализующим отрицательный заряд поверхности слюды и позволяющим прикрепить живые клетки к подложке.

Важнейшим аспектом любого микроскопа является его разрешающая способность, которая в случае СКМ определяется размером кончика используемого зонда. Моделирование методом конечных элементов показывает, что она составляет около трех радиусов отверстия капилляра [9]. В связи с этим существенным фактором является подбор параметров исполь-

зуемых капилляров, позволяющих достичь требуемого разрешения, но не вносящих шумовых помех в регистрируемую величину ионного тока, возникающих вследствие колебаний тонкого острия зонда или его «засорения» в ходе работы. Используемые в работе капилляры были изготовлены путем вытягивания боросиликатных стеклянных заготовок на пуллере (P-1000, «Sutter Instruments»), обеспечивающим локальный нагрев капилляра и его растяжение до момента разрыва. Наружный и внутренний диаметры заготовок (в нашем случае) составляют 1 и 0,58 мм соответственно. Путем подбора параметров работы пуллера можно получать зонды с диаметром отверстия от 20...30 нм до нескольких микрометров.

Сканирование образца проводили капилляром с диаметром выходного отверстия около 80 нм, частота колебаний в прыжковой (hopping) моде составляла 15 Гц, амплитуда – 3 мкм. Такая амплитуда была выбрана вследствие значительного перепада высот на исследуемых клетках. Контрольная точка падения величины ионного тока составляла 1,2 % от величины тока на удалении от образца. Размер кадра – 10,3 x 10,3 мкм², разрешение – 512 x 512 точек.

Оптические наблюдения были проведены на инвертированном микроскопе «Nikon-TiU» (Япония). Постобработка снимков проводилась в ПО «ФемтоСкан Онлайн» [10] посредством медианной фильтрации и выравнивания уровня подложки по выбранному плоским участкам подложки на полученном изображении. Проводилось измерение следующих параметров шероховатости изучаемой поверхности: Ra – средняя шероховатость, определяется как среднее по модулю арифметическое отклонение профиля от средней наклонной плоскости, проведенной методом наименьших квадратов; Rq – среднеквадратичная шероховатость, показывает среднеквадратичное отклонение профиля поверхности относительно средней линии; $Rmax$ – расстояние между наибольшим пиком и наибольшей впадиной на базовой линии (плоскости); Rsk – параметр асимметрии; Rku – мера эксцесса, которая характеризует ширину пиков или впадин [11].

Результаты

Шероховатость можно рассчитывать по полной поверхности эритроцита, но для этого необходимо убрать крупный рельеф поверхности (рис. 2). Из плоскости эритроцита выделяется область размером 6 x 4 мкм и вычитается средний наклон параболой. Таким образом можно убрать крупный рельеф клетки и рассчитать среднеквадратичную шероховатость. В данном случае этот параметр составил в среднем 49 нм на основании 10 измерений (табл. 1).

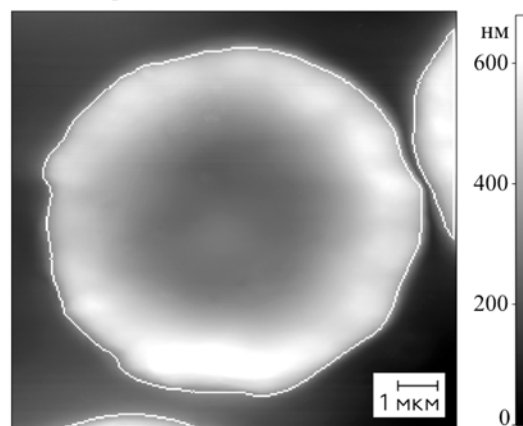


Рис. 2. Изображение эритроцита, линией выделена область, по которой рассчитываются параметры. Атомно-силовая микроскопия

Еще один способ измерить морфометрические показатели клетки – рассчитать параметры шероховатости, построив 5 сечений на кадре 6 x 4 мкм² и измерить среднюю и среднеквадратичную шероховатости, максимальное расстояние между пиками и впадинами, параметр асимметрии и меру эксцесса.

Среднее значение шероховатости, измеренное при помощи АСМ по 10 эритроцитам, при расчете среднеквадратичной шероховатости по выделенному кадру составило 49 нм, при измерении по 5 сечениям $Ra = 31$ нм, $Rq = 36$ нм. По данным, приведенным в *табл. 1*, можно охарактеризовать средний профиль как имеющий узкие пики и впадины; при этом по параметру асимметрии в выборке поровну эритроцитов, имеющих глубокие поры в рельефе и имеющих выступы.

Таблица 1

Параметры шероховатости эритроцитов, полученные при помощи АСМ. Погрешность измерений составляет ~15 %

№ п/п	Ra , нм	$Rmax$, нм	Rq по 5 сечениям, нм	Rsk	Rku	Rq по кадру 6 x 4, нм
1	45,46	201,30	54,48	0,41	2,27	62
2	23,18	99,23	27,18	-0,39	2,04	39
3	24,49	102,80	28,75	-0,39	2,07	37
4	21,45	95,21	25,20	-0,34	2,17	53
5	20,44	91,19	24,04	-0,38	2,24	38
6	37,20	139,10	42,64	0,27	1,81	54
7	47,27	153,20	52,35	0,31	1,59	47
8	62,90	232,90	74,03	0,62	2,14	68
9	23,78	91,06	27,51	-0,03	1,89	66
10	9,58	50,77	11,85	0,42	2,82	25
Средний показатель	31,57	125,67	36,80	0,04	2,10	49

В инвертированном оптическом микроскопе можно наблюдать превращение клеток крови: от начального состояния дискоцитов в сформировавшиеся эхиноциты или сфероциты. На основании полученных данных оптической микроскопии определяются объекты исследования при помощи капиллярной микроскопии. Жизненный цикл эхиноцитов крови показан на *рис. 3*, на котором представлены снимки дискоцита, переходящего в эхиноцит: а), г), ж) – 2D-, 3D-топография и сечение через 1 ч после нанесения образца; б), д), и) – 2D-, 3D-топография и сечение через 2 ч после нанесения; в), е), к) – 2D-, 3D-топография и сечение сформировавшегося эхиноцита через 3,5 ч после нанесения.

На этапах жизненного цикла хорошо видны изменения морфологии клеток: происходит уменьшение латеральных размеров и заметное вытягивание клетки в высоту, что хорошо отражают характерные сечения клеток (*рис. 3*). При переходе

в эхиноцит изменяется двояковыпуклая форма, увеличивается высота клетки, на поверхности начинают образовываться шипы (*рис. 3ж*). В процессе дальнейшего формирования эхиноцита образуются отростки в области прилегания к подложке и происходит укрупнение шипов (*рис. 3и*). У сформировавшегося эхиноцита присутствуют уже характерные отростки и крупные шипы (*рис. 3к*).

Шероховатость эритроцитов, исследованных при помощи СКМ, оценивалась методами, указанными выше. Выделенная для анализа поверхность эритроцита на СКМ-снимке представлена на *рис. 4*. В *табл. 2* приведены значения шероховатости, рассчитанные по 5 сечениям и по кадру 6 x 4 мкм².

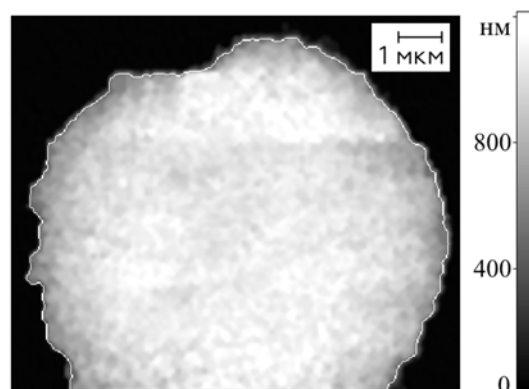


Рис. 4. СКМ-изображение эритроцита. Линией выделена область, по которой рассчитывается среднеквадратичное отклонение от плоскости

Таблица 2

Параметры шероховатости эритроцита, рассчитанные по 5 сечениям и по кадру 6 x 4 мкм²

	Ra , нм	$Rmax$, нм	Rq , нм	Rsk	Rku
По 5 сечениям	26	142	32	0,214	2,79
По кадру 6 x 4 мкм ²	35	138	45	-0,2	3,40

При использовании методики вычитания крупного рельефа поверхности клетки параболой среднеквадратичная шероховатость по кадру 6 x 4 мкм² составила: $Ra = 35$ нм, $Rq = 45$ нм.

Для сравнительного анализа АСМ- и СКМ-снимков также определялись морфометрические параметры эритроцитов по выделенным на снимках областям (*рис. 2* и *4* соответственно). Данные измерений приведены в *табл. 3*.

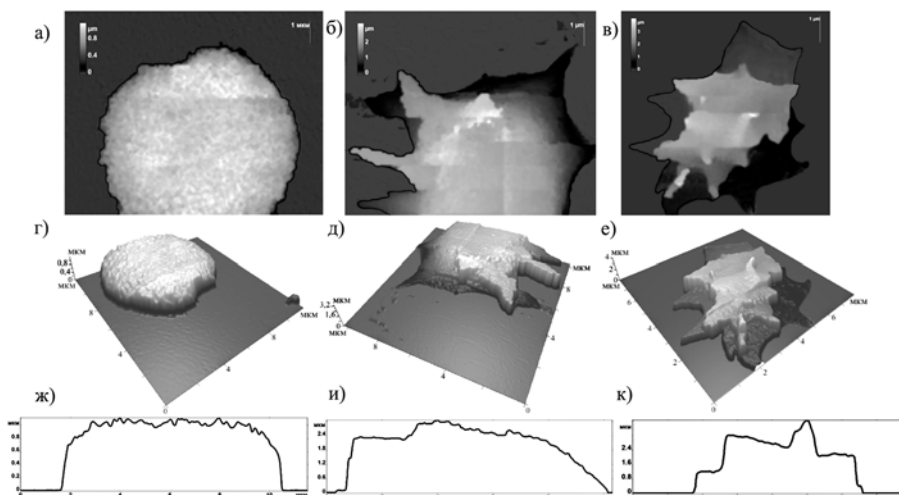


Рис. 3. 2D-, 3D-топография и сечение исследуемых клеток крови: а), г), ж) – эритроцит через 1 ч после нанесения образца; б), д), и) – формирующийся эхиноцит через 2 ч после нанесения; в), е), к) – сформировавшийся эхиноцит через 3,5 ч. Сканирующая капиллярная микроскопия

Таблица 3

Морфометрические параметры эритроцитов, рассчитанные по выделенным на АСМ- и СКМ-снимках областям: периметр, площадь, объем, среднеквадратичная шероховатость, перепад высот, средняя высота

Кадр	P , мкм	S , мкм ²	V , мкм ³	RMS , нм	H , мкм	Hav , мкм
АСМ	27,1	36,7	10,5	79	0,403	0,198
СКМ	29,9	53,6	70,2	84	1,568	1,374

Заключение

В рассматриваемой работе сравнивались морфология и геометрические характеристики эритроцитов, измеренные при помощи АСМ на воздухе на покровном стекле и при помощи СКМ в жидкости. Значение объема эритроцита в СКМ по сравнению с исследованиями на воздухе на АСМ значительно изменилось, почти в 7 раз, а шероховатость осталась почти неизменной – $Rq = 45 \pm 6$ нм по данным СКМ и 49 ± 7 нм по данным АСМ. Таким образом, можно сделать вывод, что поверхность мембраны эритроцита не претерпевает значительных деформаций в процессе высыхания. Из приведенных примеров видно, что поиск физических биомаркеров для эритроцитов в мазках крови является перспективным направлением. АСМ и СКМ позволяют расширить диагностические возможности анализа мазка крови. Тем не менее требуется дальнейшее накопление статистических данных морфометрических параметров эритроцитов, особенно по топографии клеток доноров с заболеваниями крови.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского королевского общества № 21-58-10005, РФФИ, проект № 20-32-90036, РФФИ, проект № 20-12-00389. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям, проект № 71108.

Список литературы:

1. Смирнова М.Е., Яминский И.В. Исследование эритроцитов методами сканирующей зондовой микроскопии // Медицина и высокие технологии. 2017. № 3. С. 20-23.
2. Макарова Е., Багров Д., Горелкин П., Ерофеев А., Яминский И. Наблюдение эритроцитов с помощью атомно-силовой и сканирующей ион-проводящей микроскопии // Наноиндустрия. 2015. № 2 (56). С. 42-47.
3. Akhmetova A.I., Gukasov V.M., Rybakov Y.L., Yaminsky I.V. High-speed scanning probe microscopy in biomedicine // Biomedical Engineering. 2021. Vol. 54 (6). PP. 434-437.
4. Strijkova-Kenderova V., Todinova S., Andreeva T., Bogdanova D., Langari A. et al. Morphometry and Stiffness of Red Blood Cells-Signatures of Neurodegenerative Diseases and Aging // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 23 (1). P. 227.
5. Andreeva T., Langari A., Komsa-Penkova R., Krutova S., Golemanov G. et al. Morphometric and Nanomechanical Features of Erythrocytes Characteristic of Early Pregnancy Loss // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 22 (15). P. 7778.
6. Синицына О.В., Ахметова А.И., Яминский И.В. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов: новые диагностические возможности // Медицина и высокие технологии. 2022. Т. 1. С. 9-12.
7. Черныш М., Яминский И.В., Козлова Е.К., Киселев Г.А., Филонов А.С. и др. Структура мембран эритроцитов до и после электропорации. Исследование с помощью атомного силового микроскопа // Медицинская физика. 2008. № 1 (37). С. 70-75.
8. Макарова Е.С., Яминский И.В. Изучение взаимодействия вируса гриппа с единичными клетками эпителия и эритроцитами // Медицина и высокие технологии. 2016. № 1. С. 39-55.

9. Rheinlander J., Schaffer T.E. Image formation, resolution, and height measurement in scanning ion conductance microscopy // J. Appl. Phys. 2009. Vol. 105. P. 094905.
10. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B. FemtoScan Online software and visualization of nanoobjects in high resolution microscopy // Nanoindustry. 2018. Vol. 11. № 6 (85). PP. 414-416.
11. Битюцкая Л.А. и др. Нанотехнологии в физике. Дистанционная лаборатория атомно-силовой микроскопии нанообъектов. Часть 1. Тестирование. Обработка и анализ изображения / Учебное пособие. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2007. 31 с.

Тимофеев Олегovich Советников,
студент,
физический факультет,
ФГОУВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
специалист,
ООО НПП «Центр перспективных технологий»,
Асель Иосифовна Ахметова,
инженер,
НИИ «ФХБ им. А.Н. Белозерского»,
ФГОУВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
ведущий специалист,
ООО НПП «Центр перспективных технологий»,
ведущий специалист,
ООО «Энергоэффективные технологии»,
Вадим Михайлович Гукасов,
д-р биолог. наук, гл. научный сотрудник,
Государственный центр экспертизы
в сфере науки и инноваций,
ФГБНУ НИИ «Республиканский исследовательский научно-консультационный центр экспертизы»
Министерства науки и высшего образования РФ,
г. Москва,
Геннадий Сергеевич Евтушенко,
д-р техн. наук, гл. научный сотрудник,
Государственный центр экспертизы
в сфере науки и инноваций,
ФГБНУ НИИ «Республиканский исследовательский научно-консультационный центр экспертизы»
Министерства науки и высшего образования РФ,
г. Москва,
профессор-консультант,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,
г. Томск,
Юрий Леонидович Рыбаков,
д-р биолог. наук, директор,
Государственный центр экспертизы в сфере науки и инноваций,
ФГБНУ НИИ «Республиканский исследовательский научно-консультационный центр экспертизы»
Министерства науки и высшего образования РФ,
Игорь Владимирович Яминский,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
физический и химический факультеты,
ФГОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
генеральный директор,
ООО НПП «Центр перспективных технологий»,
директор,
ООО «Энергоэффективные технологии»,
г. Москва,
e-mail: akhmetova@nanoscory.ru