

УДК 57.088

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДАМИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

стр. 20 – 23

Смирнова М.Е.¹, Яминский И.В. ^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²ООО НПП «Центр перспективных технологий»

Контактные данные: Смирнова М.Е., smirnova.me15@physics.msu.ru

Резюме: В данной работе рассматриваются преимущества сканирующего зондового микроскопа перед другими часто используемыми устройствами. Описано несколько современных методов сканирующей зондовой микроскопии, созданных специально для наблюдения мягких биологических объектов. Представлены изображения эритроцитов, полученные при сканировании в контактном режиме атомно-силового микроскопа.

Ключевые слова: оптическая микроскопия, сканирующая зондовая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, сканирующая ион-проводящая микроскопия, клетки крови, эритроциты, фиксация биологических объектов, физические свойства клеток.

RESEARCH OF ERYTHROCYTES USING METHODS OF SCANNING PROBE MICROSCOPY

pages 20 – 23

Smirnova M.E., Yaminsky I. V.

Summary: The advantages of a scanning probe microscope over other widely used devices are discussed in this paper. Several modern methods of scanning probe microscopy designed specifically for observing soft biological objects are described. There are also presented images of erythrocytes obtained by scanning in the contact mode of an atomic force microscope.

Keywords: optical microscopy, scanning probe microscopy, atomic force microscopy, scanning ion-conductance microscopy, blood cells, erythrocytes, fixation of biological objects, physical properties of cells.

Введение

Заболевания крови – серьезная проблема современной медицины. Обычно они сопровождаются нарушениями строения и функций различных кровяных клеток или изменением их числа.

Наиболее давно используемый метод наблюдения микрообъектов, в том числе и эритроцитов – оптическая микроскопия. Он позволяет получить общую информацию о составе крови, процентном содержании в ней различных клеток и их форме. Но с помощью оптического

микроскопа довольно трудно получить качественное изображение одной конкретной клетки и лучше изучить ее строение.

В конце двадцатого века появляются принципиально новые микроскопы, позволяющие получать изображения объектов с высоким разрешением (вплоть до атомного на лучших современных устройствах). Эти изобретения открыли новые возможности для исследования биологических объектов.

Использование оптической микроскопии в изучении клеток крови

Использовать оптические микроскопы для изучения биологических объектов начали столетия назад. Такие наблюдения позволяют подсчитать процентные соотношения различных клеток крови, что позволяет сделать общие выводы о состоянии здоровья пациента. (Например, при активации иммунной системы в ответ на раздражитель резко возрастает число определенных групп лейкоцитов.) Такие подсчеты широко используются до сих пор при проведении общего анализа крови.

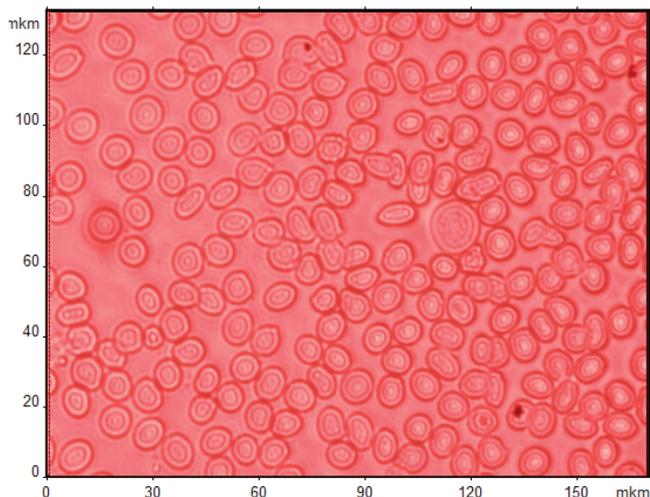


Рис.1. Изображение клеток крови на покровном стекле, полученное с помощью инвертированного оптического микроскопа Nikon. Обработка изображения проведена в программе ФемтоСканОнлайн

Также оптический микроскоп позволяет заметить отклонения в форме эритроцитов. Обычно они вызваны генетическими заболеваниями, наиболее распространенное – серповидно-клеточная анемия. Форма эритроцитов в этом случае значительно отличается от нормальной дисковидной, что не может не отразиться на выполнении ими своих функций. Некоторые проявления болезни: нарушение кровообращения в мелких сосудах (серповидные эритроциты теряют свою эластичность и закупоривают их), повышенная нагрузка на печень и селезенку (деформированные эритроциты более хрупкие, и продолжительность их жизни меньше, чем у нормальных). Пациенты могут часто испытывать одышку, иметь повышенную утомляемость, отставания в росте и развитии.

Но при работе с оптическим микроскопом получают фактически двумерные изображения. Присутствующая дифференциация по цвету обусловлена не рельефом образца, а его способностью пропускать излучение оптического спектра. И разрешение такого микроскопа традиционно ограничено длиной волны света – примерно половиной микрона, что не позволяет получить качественные изображения эритроцитов, имеющих размеры единиц микрон. Для получения более полной информации о клетках крови и решения современных проблем требуются более совершенные методы.

Электронная микроскопия

Электронный микроскоп очень широко используется в современных исследованиях, в том числе и для сканирования биологических образцов, так как позволяет получать снимки с хорошим разрешением (на лучших микроскопах до долей ангстрема). Но биологические объекты перед сканированием должны быть подвергнуты многоступенчатой дегидратации с помощью спирта, ацетона и жидкой двуокиси углерода. После всех этих непростых манипуляций клетка погибает, но сохраняет свою форму, в отличие от физических свойств. Сканировать получившийся образец можно только в вакууме. Сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) же позволяет проводить исследования с живыми клетками в их естественной среде – жидкости и получать информацию о биологических объектах, не только визуализируя их рельеф и промеряя его, но измеряя также физические характеристики. Для эритроцита особенно важной является жесткость мембраны, так как, имея размеры 7-9 мкм, он способен проходить через тончайшие капилляры диаметром до 3 мкм.

Сканирующая зондовая микроскопия

С момента своего появления сканирующая зондовая микроскопия активно развивается, за последние десятилетия появилось множество разновидностей СЗМ. Наиболее распространенный – атомно-силовой микроскоп. Он имеет множество режимов работы, широкий диапазон условий, при которых может проводиться сканирование, и потому применим практически к любой задаче. С помощью АСМ можно изучать и биологические объекты.

Несмотря на то, что контактный режим очень широко используется в современных исследованиях, его применение для изучения мягких биологических образцов требует определенных навыков регулировки силы, приложенной к зонду. Сил свыше 100пН следует избегать, так как они могут вызвать обратимые и даже необратимые деформации. Контактный режим хорошо подходит для сканирования высушенных клеток.

Бесконтактный и полуконтактный режимы позволяют существенно уменьшить трение и лучше подходят для исследования биологических объектов, но изображения, полученные в этих режимах, имеют высокую степень

гофрировки. В данном режиме повышается чувствительность к шумам: жесткость, шероховатость, поверхностный заряд или химический состав образца могут повлиять на колебания кантилевера. При попадании частички образца на острие зонда микроскоп приходится перенастраивать. Последнюю проблему получилось решить на сканирующем ион-проводящем микроскопе (СИПМ), в котором проводятся измерения ионного тока, текущего через нанопипетку.

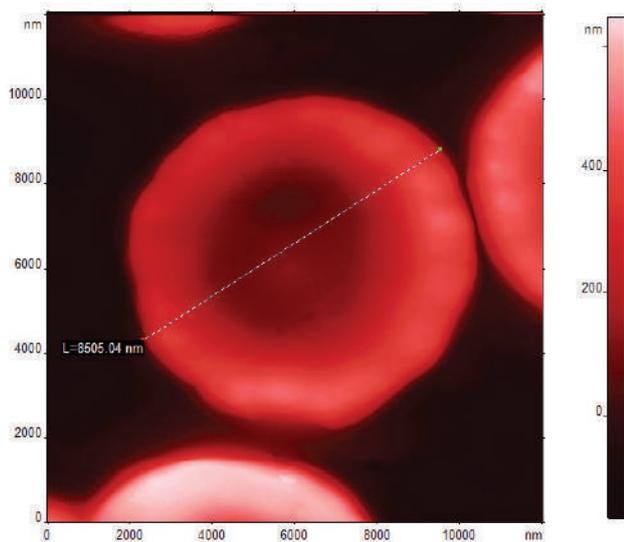


Рис. 2. Изображение высушенного эритроцита, полученное в контактном режиме, СЗМ ФемтоСкан

Характерной особенностью СИПМ является то, что сканирование происходит в жидкости – естественной среде для биологических объектов. Перемещаясь относительно образца, зонд в каждой точке совершает колебания вдоль вертикальной оси, амплитуда которых задается в соответствующем программном обеспечении пользователем. Также задается уменьшение силы тока (в процентах), при котором подведение должно быть остановлено. Обычно работают с десятками долями процента. Такие значения позволяют избежать контакта капилляра с образцом, который может привести как к повреждению образца, так и к поломке самого капилляра. Регистрируя высоту, на которой произошли заданные изменения силы тока, получаем информацию о рельефе исследуемой поверхности.

Важной деталью является также то, что при сканировании на СИПМ образцы необходимо закреплять на подложке. Для фиксации биологических объектов часто используется глутаровый альдегид, а для закрепления эритроцитов применяется полилизин.

СИПМ открывает широкие возможности для исследования живых клеток, так как при его использовании не происходит контакта острия капилляра с образцом. Небольшие изменения ионного тока фиксируются раньше, чем происходит соприкосновение. Таким образом исключается возможность повредить клетку при сканировании.

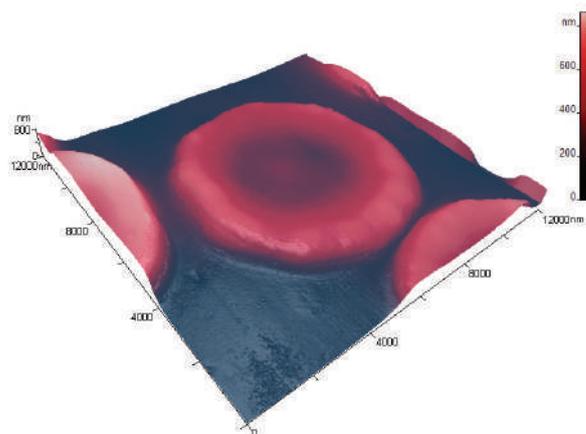


Рис. 3. 3D изображение эритроцита, СЗМ ФемтоСкан

Кроме наглядности, высокого разрешения, широкого температурного диапазона, в котором могут проводиться измерения, СЗМ имеет и другие преимущества. В сравнении и с оптическим, и с электронным микроскопом принципиальное отличие СЗМ в том, что с его помощью строится именно трехмерное изображение. Добиться его построения с помощью электронного микроскопа можно, но только проведя серию снимков и соответствующие вычисления.

Важным шагом стало понимание того, что одновременно с созданием изображения АСМ способен получать информацию о биофизических свойствах. Можно количественно определить высоту, поверхностные силы и механические деформации образца, его модуль упругости. Для таких наблюдений требуются кантилеверы с хорошо определенной геометрией и химическими свойствами. Физические свойства образца могут быть сопоставлены с его топографией.

С помощью данной технологии изучали клетки после применения лекарственных препаратов. Исследования вязкости и упругости неопухольевых клеток молочной железы показали, что они менее деформируемы по сравнению с раковыми. То есть у больных клеток значительно изменяются механические свойства. Применение данной технологии при исследовании эритроцитов поможет лучше понять механизмы протекания заболеваний кровеносной системы.

Заключение

Применение различных инструментов сканирующей зондовой микроскопии в исследованиях эритроцитов имеет большой потенциал и позволяет полноценно исследовать живые клетки как физические объекты, не ограничиваясь лишь их визуализацией. Данные методы могут быть также применены для изучения взаимодействия эритроцитов с другими объектами, наиболее интересными для рассмотрения в этом ключе являются вирусы.

Настоящая работа выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 15-04-07678).

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Ахметова А.И., Мешков Г.Б., Сеницына О.В., Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия в медицине // Медицина и высокие технологии №4 с. 16-19 (2016)
2. Макарова Е.С., Багров Д.В., Горелкин П.В., Ерофеев А.С., Яминский И.В. Наблюдение эритроцитов с помощью атомно-силовой и сканирующей ион-проводящей микроскопии // Наноиндустрия №2(56) с. 42-47 (2015)
3. Yves F. Dufrière, Toshio Ando, Ricardo Garcia, David Alsteens, David Martinez-Martin, Andreas Engel, Christoph Gerber & Daniel J. Müller Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology // Nature Nanotechnology 12, 295-307 (2017)
4. David Alsteens¹, Richard Newton, Rajib Schubert, David Martinez-Martin, Martin Delguste, Botond Roska and Daniel J. Müller Nanomechanical mapping of first binding steps of a virus to animal cells // Nature Nanotechnology 12 177-183 (2016)
5. А.С. Филонов, Д.Ю. Гаврилко, И.В. Яминский Руководство пользователя пакета программного обеспечения для управления сканирующим зондовым микроскопом и обработки изображений FemtoScan (Версия 4.8)
6. И.В. Яминский Сканирующая капиллярная микроскопия // Наноиндустрия №1(63) с. 76-79 (2016)

АВТОРЫ:

1. **Смирнова Мария Евгеньевна** – студентка физического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.
Smirnova Maria Evgenyevna – student of Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University.
E-mail: smirnova.me15@physics.msu.ru
2. **Яминский Игорь Владимирович** – профессор, доктор физико-математических наук, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Генеральный директор ООО НПП «Центр перспективных технологий».
Yaminsky Igor Vladimirovich – Doctor of Science in Physics and Mathematics, Prof., Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation; Director, Advanced Technologies Center, 4-5-47, Stroiteley str., Moscow, Russian Federation.
E-mail: yaminsky@nanoscopy.ru