# ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ АТОМНОЙ СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В РЕАНИМАТОЛОГИИ

В. В. Мороз<sup>1</sup>, А. М. Черныш<sup>2</sup>, И. В. Яминский<sup>3</sup>, Е. К. Козлова<sup>2</sup>, Г. А. Киселёв<sup>4</sup>, А. С. Филонов<sup>4</sup>, М. С. Богушевич 1, О. Е. Гудкова<sup>3</sup>

 $^1$  ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН;  $^2$  Московская медицинская академия им. И. М.Сеченова;  $^3$  МГУ им. М. В. Ломоносова;  $^4$  ООО НПП «Центр перспективных технологий»

## Prospects for Using Atomic Power Microscopic Methods in Reanimatology

V. V. Moroz<sup>1</sup>, A. M. Chernysh<sup>2</sup>, I. V. Yaminsky<sup>3</sup>, Ye. K. Kozlova<sup>2</sup>, G. A. Kiselev<sup>4</sup>, A. S. Filonov<sup>4</sup>, M. S. Bogushevich<sup>1</sup>, O. Ye. Gudkova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences; <sup>2</sup> I. M. Sechenov Moscow Medical Academy, <sup>3</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University; <sup>4</sup> OOO «Research-Production Enterprise «Center of Advanced Technologies»

Цель работы — получить с помощью атомного силового микроскопа (ACM) изображения пор в мембране эритроцита после его электропорации, оценить параметры полученных пор и обсудить перспективы применения ACM в реаниматологии. Цельную венозную кровь человека подвергали действию импульсного электрического поля, вызывая электропорацию мембран эритроцитов. Получали мазки крови стандартным методом. Изображения формы и поверхности отдельных эритроцитов и их увеличенных фрагментов получали с помощью атомного силового микроскопа «Фемто Скан». Анализировали диаметры, глубины и конфигурацию отдельных пор. На этом и других примерах показаны широкие возможности и перспективы применения АСМ в реаниматологии. *Ключевые слова*: атомный силовой микроскоп, электропорация мембран, анализ пор.

Objective: to obtain an image of pores in the membrane of an erythrocyte after its electroporation, by using an atomic power microscope (APM), to evaluate the parameters of the obtained pores, and to discuss the prospects for using an APM in reanimatology. Human whole venous blood was exposed to a pulsed electric field, by inducing erythrocytic membrane electroporation. Blood smears were obtained by the standard method. Images of the form and surface of individual erythrocytes and their enlarged fragments were obtained by means of a Femto Scan APM. The diameters, depths, and configuration of some pores were analyzed. This example and others were used to show a wide field and prospects for using an APM in reanimatology. Key words: atomic power microscope, membrane electroporation, analysis of pores.

На 19-й сессии Общего собрания PAMH принято решение создать специальное отделение по вопросам применения нанотехнологий и наноматериалов в медицине.

20-21 декабря 2007 г.

Важным направлением развития современной медицины в целом и реаниматологии, в частности, является применение новейших физических и биофизических методов исследования биологических наноструктур.

В этом направлении перспективным методом, позволяющим непосредственно наблюдать биологические объекты в нанодиапазоне, является атомная силовая микроскопия. Этот метод имеет ряд существенных преимуществ перед другими методами микроскопии.

Атомные силовые микроскопы (ACM), имея предел разрешения от 1 до 0,01 нм, позволяют вести наблюдения при комнатной температуре, как твёрдых объектов, так и структур, находящихся в растворе, что особенно важно для медицинских и биологических исследований. Другой важнейшей особенностью ACM является возможность получения объёмных изобра-

жений биологических объектов, например мембран клеток, и оценке их размеров и конфигурации во всех трёх измерениях [1]. Эти свойства АСМ делают их незаменимыми при получении изображений клеточных и субклеточных наноструктур при решении ряда задач реаниматологии.

Одним из примеров, когда АСМ успешно применены в реаниматологии, является исследование структуры мембран эритроцитов при введении фармакологических препаратов в кровь человека. Исследование проводили с применением метода калиброванной электропорации. Этот метод позволяет изучать влияние тех или иных препаратов на мембраны эритроцитов крови человека, определять — разрушает ли препарат структуру мембраны или защищает её. Вводя, например, перфторан как в цельную кровь, так и в её суспензию можно регистрировать скрытые эффекты действия препарата в зависимости от его концентрации и времени взаимодействия с кровью [2]. Для регистрации действия препаратов на мембрану эритроцита необходимо вызвать в ней необратимую электропорацию [3, 4]. Степень элек-

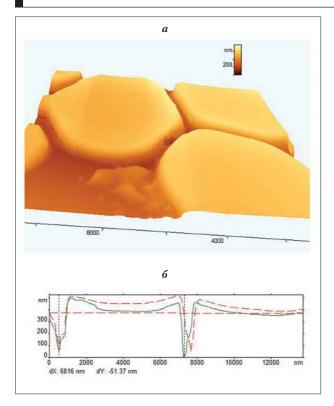


Рис. 1. Объёмное изображение отдельных эритроцитов (a), полученное с помощью атомного силового микроскопа; графическое представление их профилей и шкала размера по глубине (б). Все размеры приведены в нм.

тропорации определяется по кинетическим кривым осмотического гемолиза эритроцитов. Однако при этом нет возможности оценить количество и размер возникающих в мембране пор. Наблюдение результатов электропорации мембран в электронном микроскопе позволяет регистрировать поры и оценить их размеры [5]. Однако получение изображения тонкой структуры пор весьма затруднительно из-за технологических ограничений как просвечивающих, так и сканирующих модификаций этих микроскопов.

Цель работы — получить с помощью атомного силового микроскопа изображения пор в мембране эритроцита после его электропорации, оценить параметры полученных пор и обсудить перспективы применения АСМ в реаниматологии.

#### Материалы и методы

Исследования проводили на цельной венозной крови человека, а также на её суспензии при растворении в физиологическом растворе в 300 раз. Кровь или кровь с фармпрепаратом помещали в кварцевую кювету. На стенках кюветы находились титановые электроды. На них подавали импульс электрического поля от клинического дефибриллятора «Lifepak 7» (США). Напряженность поля в растворе E=1100 B/см, длительность импульса 10 мс. При таких параметрах импульса наведенный трансмембранный потенциал превышал пороговый потенциал пробоя мембраны (300—500 мВ), и происходила их необратимая электропорация. Эффект электропорации, оценивали по кинетической кривой — зависимости D(t), где D — оптическая плотность суспензии крови. Кинетические кривые

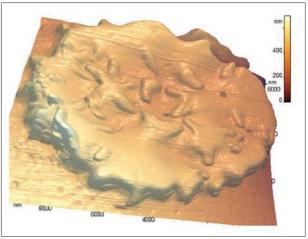


Рис. 2. Пример изображения эхиноцита в атомном силовом микроскопе, при введении в кровь эсмерона (2 мкл/мл суспензии) и последующей электропорации. Все размеры указаны в нм.

гемолиза эритроцитов описывали экспоненциальной функцией. Подробно методика проведения калиброванной электропорации описана ранее [6, 7].

Исследование структуры поверхности эритроцитов до и после действия импульсного электрического поля проводили на мазках крови, сделанных по стандартной методике.

Изображения поверхностей мембран получали с помощью атомного силового микроскопа «Фемто Скан», созданного в ООО НПП «Центр перспективных технологий». Сканирование проводили на кафедре полимеров и кристаллов физического факультета МГУ им М. В. Ломоносова.

Сканирование проводили на воздухе, при комнатной температуре, размер области сканирования 10 на 10 мкм, шаг сканирования 0,5 нм.

### Результаты и обсуждение

Структура отдельного эритроцита, его конфигурация и размеры представлены на рис. 1a. Все размеры приведены в нм. Цветовая шкала даёт возможность оценить профиль клетки и представить его в графическом виде (рис. 16). Диаметр эритроцита на данном изображении — 6816 нм, высота бортика — 530 нм, прогиб структуры дискоцита — 138 нм, ордината подъёма левого края — 51,3 нм. Устанавливая курсор в любом интересующем исследователя направлении, можно с точностью до 0,1 нм определять любые необходимые размеры клетки.

На рис. 2 представлен пример изображения эхиноцита, возникшего в результате введения в кровь эсмерона в концентрации 2 мкл/мл суспензии и последующей электропорации. Все размеры клетки указаны в нм.

На рис. З представлен комплекс плоских и объёмных изображений фрагмента эритроцита после проведения электропорации. Левый сектор — плоское изображение с выделенным сегментом для дальнейшего анализа. В секторе показана цветовая шкала, устанавливающая соответствие между цветом на изображении и высотой объектов. Правый сектор — объёмное изображение этого фрагмента. На нём представлен профиль,

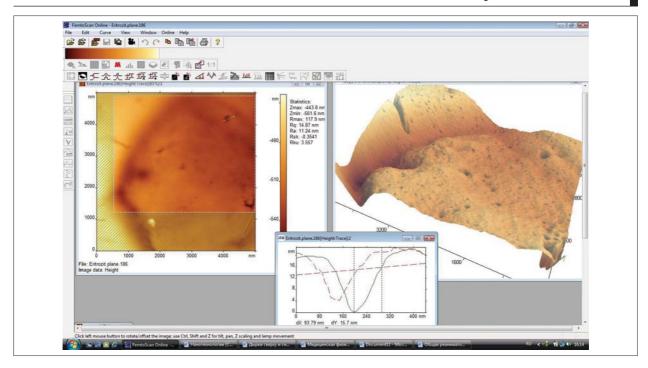


Рис. 3. Плоское и объёмное изображения фрагмента эритроцита в атомном силовом микроскопе после проведения электропорации. Левый сектор — плоское изображение с выделенным сегментом для анализа. Правый сектор — объёмное изображение этого фрагмента с порами различных размеров. Размер изображения 3200×2500 нм. Нижний сектор — профиль выделенной поры. Радиус данной поры — 93,8 нм, а её глубина — 15,7 нм.

фронтальная поверхность эритроцита с порами различных размеров, как по диаметру, так и по глубине. Размер изображения  $3200\times2500$  нм.

Приведём пример проведения анализа конфигурации отдельной поры. Анализ проводится с использованием программного обеспечения «ФемтоСкан» [8] атомного силового микроскопа. На рис. 3 — левый сектор: исследователь устанавливает курсор на интересующем его участке мембраны — пунктир между красной и зелёной точками в правом верхнем углу сектора. В данном случае, выбрана тёмная точка в секторе, указывающая на наличие поры по шкале квазицвета. На нижнем секторе рисунка представлен профиль выделенной поры. Красный линейный пунктир — средний наклон поверхности фрагмента. Сплошная линия — профиль поры. Курсоры – два вертикальных пунктира – установлены так, что один отмечает самую глубокую точку поры, другой её верхнюю часть. Радиус данной поры составляет 93,8 нм, а её глубина — 15,7 нм. Исследователь может установить курсор на этой поре (в левом секторе) под любым углом и получить профиль поры по любому направлению. Затем можно получить изображение этой или других пор в объёме. Такой фрагмент показан на рис. 4. Здесь сохранены размеры, а плоскость поверхности и её освещение оператор устанавливает, исходя из задач конкретного исследования.

Каковы могут быть перспективы описываемого метода получения изображений с помощью атомной силовой микроскопии?

Анализируя размеры и конфигурацию пор в условиях конкретного эксперимента можно предвидеть результат взаимодействия различных объектов. Напри-

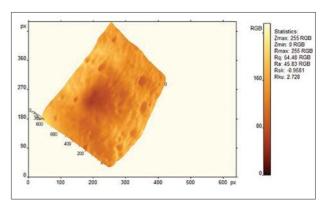


Рис. 4. Объёмное изображение фрагмента поверхности эритроцита после электропорации, полученное на атомном силовом микроскопе. Показаны поры различной величины и конфигурации.

мер, если в кровь ввести перфторан (размер частиц в эмульсии ≈70 нм), можно предположить, что такие частицы могут застревать в показанных порах или иных структурных образованиях на поверхности эритроцита. Более того, нет препятствий для проведения такого исследования в прямом биофизическом эксперименте.

АСМ позволяет в ходе сканирования биологической структуры фиксировать механические свойства того или иного участка поверхности одновременно с регистрацией его топографии. Модули упругости различных компонент клетки различаются на несколько порядков: от десятых долей до сотен кПа. Это даёт возможность, используя цветовую шкалу, получать карты латеральных сил и модулей упругости для различных биологических наноструктур.

Здесь представляются широкие возможности использования этих методик в реаниматологии. Например, исследовать в АСМ фрагменты ткани мозга, печени или иные ткани организма при различных степенях гипоксии, а затем регистрировать динамику обратного процесса — оксигенации. Сравнивая карты латеральных сил в прямом и обратном процессах можно обсуждать механизмы оживления организма.

Важным фактором в патогенезе нарушений, возникающих в раннем посттравматическом периоде, является нарушение микрореологических свойств крови, которые во многом зависят от формы, деформируемости и состояния поверхностной мембраны эритроцитов. Изучение этих свойств с помощью АСМ может способствовать получению качественно новых результатов. За последние несколько лет исследованы и живые эритроциты [9], и фиксированные клетки на воздухе [10] и в физиологическом растворе [11].

С помощью АСМ можно анализировать свойства мембранных фрагментов самых различных клеток. Исследуются участки сердечной мышцы, проводится картирование модулей Юнга на поверхности живых кардиомиоцитов [12, 13]. Кроме того, АСМ позволяют анализировать различные участки эндотелиальных [14] и лейкозных клеток [15].

Применение методов атомной силовой микроскопии даёт возможность анализировать не только изменения структуры клеток, но и, что весьма важно, регистрировать динамику функционального состояния объектов.

Так, в работе Tokumasu [16] демонстрируется динамика фазового перехода из жидко-кристалличе-

#### Литература

- Яминский И. В. (ред.). Сканирующая зондовая микроскопия. М.: Научный мир; 1997.
- Мороз В. В., Козлова Е. К., Богушевич М. С и соавт. Перфторан в суспензии крови. Эффекты закрепляющего и разрушающего действия на модифицированные электрическими импульсами мембраны. Общая реаниматология 2005; 1 (3): 5—10.
- Tekle E., Astumian R. D., Friauf W. A., Chock P. B. Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. Biophys. J. 2001; 81 (8): 960–968.
- Козлова Е. К., Мороз В. В., Богушевич М. С., Черныш А. М. Влияние формы электрического импульса на электропорацию мембран эритроцитов. Общая реаниматология 2005; 1 (1): 42—47.
- Chang D. C., Reese T. S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. Biophys.J. 1990; 58 (7): 01–12.
- Мороз В. В., Богушевич М. С., Черныш А. М. и соавт. Способ определения защиты мембран эритроцитов крови от воздействия пробойным импульсным электрическим полем. Патент на изобретение 2004; 2283096.
- Черняев А. П., Черныш А. М., Алексеева П. Ю. и соавт. Диагностика скрытых повреждений мембран эритроцитов в результате воздействия физико-химических факторов. Технологии живых систем 2007; 4 (1): 28—36.
- Филонов А. С., Яминский И. В. Обработка и анализ данных в сканирующей зондовой микроскопии: Алгоритмы и методы. Наноиндустрия 2007; 2: 32—34.

ского состояния в гель-фазу и обратно при нагревании и остывании в липидном бислое. Показано бифазное состояние системы, когда в ней одновременно присутствуют и гель-фаза и жидкий кристалл. Исследования динамики изменения свойств мембран клеток при умирании и оживлении организма могут открыть новые страницы научной и практической реаниматологии.

Определенным достоинством применяемой нами аппаратуры — сканирующего зондового микроскопа «ФемтоСкан» — является наличие встроенного сетевого доступа, когда управление экспериментом можно проводить дистанционным образом, например, через Интернет, а данные и изображения в реальном времени передавать на дополнительные удаленные компьютерные терминалы. В целом, это существенно повышает результативность проводимых исследований за счет одновременного вовлечения большего числа специалистов.

Однако использование атомных силовых микроскопов в медицине сопряжено с рядом трудностей. Главная из них — высокая стоимость аппаратуры и программного обеспечения к ней. Современные АСМ отечественного производства стоят от 1 до 5 миллионов рублей. Зарубежные аналоги стоят ещё дороже. Кроме того, АСМ требуют хорошо обученного, квалифицированного персонала для постоянной работы.

В заключение данной статьи необходимо отметить, что применение ACM в конкретных условиях, для решения поставленных медицинских задач требует разработки своих оригинальных методик исследования.

- Nowakowki R., Luckham P., Winlove P. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy. Biochimica et Biophysica Acta 2001; 1514: 170–176.
- Gould S. A. C., Drake B., Prater C. B. et al. From atoms to integrated circuit chips, blood cells, and bacteria with the atomic force microscope. J. Vacuum S. and Technology 1990; A 8: 369–373.
- Butt H-J., Wolff E. K., Gould S. A. C. et al. Imaging cells with the atomic force microscope. J. Structural Biology 1990; 105: 54–61.
- 12. Shroff S. G., Saner D. R., Lal R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. Amer. J. Physiology 1995; 269 (C(1p+1)): C286—C292.
- Hofmann U. G., Rotsch C., Parak W.J., Radmacher M. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. J. Structural Biology 1997; 119: 84–91.
- Mathur A. B., Truskey G. A., Reichert W. M. Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells. Biophysical J. 2000; 78: 1725—1735.
- Rosenbluth M. J., Lam W. A., Fletcher D. A. Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. Biophysical J. 2006: 90: 2994–3003.
- Tokumasu F., Jin A. J., Dvorak J. A. Lipid membrane phase behaviour elucidated in real time by controlled environment atomic force microscopy. J. Electron Microscopy 2002; 51 (1): 1–9.

Поступила 24.01.08