

БЕЛОРУССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДК 539.25.086:[576.3:539.31]

ДРОЗД
Елизавета Сергеевна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛОКАЛЬНЫХ УПРУГИХ
ХАРАКТЕРИСТИК БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК
МЕТОДАМИ КОНТАКТНОЙ МЕХАНИКИ

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

по специальности
01.02.08 – Биомеханика

Минск, 2011

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель

Чижик Сергей Антонович,
доктор технических наук, профессор,
член-корреспондент Национальной
академии наук Беларуси,
Главный ученый секретарь Национальной
академии наук Беларуси

Официальные оппоненты:

Няшин Юрий Иванович,
доктор технических наук, профессор,
заведующий кафедрой теоретической
механики Пермского национального
исследовательского политехнического
университета;

Гольцев Михаил Всеволодович,
кандидат физико-математических наук,
доцент, доцент кафедры медицинской и
биологической физики УО «Белорусский
государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация

**Институт прикладной физики
НАН Беларуси**

Защита состоится «9» декабря 2011 г. в 16⁰⁰ часов на заседании совета по защите диссертаций Д 02.05.07 при Белорусском национальном техническом университете по адресу 220013, г. Минск, пр. Независимости, 65, корпус 1, аудитория 202. Телефон ученого секретаря совета: (+375 17) 292-67-84.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского национального технического университета.

Автореферат разослан «8» ноября 2011 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 02.05.07,
кандидат физико-математических наук

В.А. Нифагин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение

Механические свойства являются фундаментальными свойствами клеток и тканей живых организмов и определяют целый ряд цитофизиологических и цитопатологических процессов. Изучение упругих свойств, не только позволяет получить новые знания о функционировании биологических клеток (далее клеток), но и представляет несомненный клинический интерес. В связи с этим актуальна разработка эффективных теоретических моделей и экспериментальных методов механики клетки. Существует ряд подходов, позволяющих проводить оценку упругих свойств клеток, каждый из которых имеет определенные ограничения и недостатки. В диссертационной работе в качестве основного метода исследования использовалась атомно-силовая микроскопия (АСМ), интенсивное развитие которой позволило достичь уникальных научных результатов в различных областях физики и биологии благодаря новым экспериментальным возможностям: нанометровое пространственное разрешение при анализе поверхности, неразрушающий характер исследований для широкого класса образцов и сред, возможность локальной оценки физико-механических свойств микро- и нанообъектов. Данные преимущества АСМ делают перспективным ее применение для изучения структуры и физико-механических свойств клеток. В то же время изучение биологических объектов остается более сложной задачей по сравнению с аналогичными исследованиями поверхностей твердых тел. Это связано с необходимостью специальной подготовки образцов, оптимизации параметров измерений, а также использования адекватных математических моделей для интерпретации экспериментальных результатов. Имеющиеся литературные данные о механических свойствах клеток зачастую противоречивы, что вызвано отсутствием единообразия измерений, и, следовательно, затрудняет количественный анализ и сравнение результатов исследований. Поэтому возникла необходимость разработки общих методологических подходов применения методов АСМ, и в частности, процедуры статической силовой спектроскопии для измерения локальных упругих характеристик клеток, т.е. развития теоретических и экспериментальных основ клеточной эластографии и ее приложений для анализа и идентификации нарушений на уровне отдельной клетки.

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами

Диссертационная работа выполнена в лаборатории нанопроцессов и технологий Института тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси. Тема диссертации соответствует Перечню приоритетных направлений

фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006-2010 годы, утвержденному Постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 512 от 17 мая 2005 г., в частности, пунктам 3.11 «нанобиология», 6.1 «математические модели и их применение к анализу систем и процессов в природе и обществе» и 7.7 «методы и оборудование зондовой, туннельной и атомно-силовой микроскопии».

Полученные в диссертационной работе результаты связаны с выполнением:

- Государственной комплексной программы научных исследований «Наноматериалы и нанотехнологии» задание «Нанотех 1.04» «Разработать теоретические принципы и методики силовой спектроскопии для анализа единичной макромолекулы и провести исследования процессов взаимодействия углеродной нанотрубки с молекулами полимеров, ДНК и биологическими клетками» (№ гос. регистрации 2006392 от 17.11.2006), срок выполнения 2006–2010 гг.

- Гранта на выполнение научно-исследовательских работ докторантами и аспирантами НАН Беларуси «Сканирующая зондовая микроскопия в оценке вязкоупругих свойств эритроцитов при нарушениях транспорта глюкозы через клеточную мембрану» (утвержден Постановлением Бюро Президиума НАН Беларуси от 27.03.2009 № 169 «О выделении грантов на 2009 год»), срок выполнения 2009 г.

- Договора № Б08М-085 на проведение фундаментальной научно-исследовательской работы «Изучить изменения реологических свойств крови, состояния микроциркуляции и транспорта кислорода на ранних стадиях формирования сосудистых осложнений сахарного диабета 2 типа» (№ гос. регистрации 20082320 от 16.09.2008), срок выполнения 2008–2010 гг.

- Государственной научно-технической программы «Эталонные и научные приборы» подпрограммы «Научные приборы» задания 1.20 «Исследовать, изготовить и освоить в производстве автоматизированный видеокomплекс для мониторинга живых клеток» (№ гос. регистрации 20100130 от 05.02.2010), срок выполнения 2009–2010 гг.

- Государственной научно-технической программы «Инновационные биотехнологии» подпрограммы «Биотехнологическое оборудование» задания 9.3 «Разработка миниатюрного биореактора для оптического и контактно-зондового анализа живых клеток *in vitro*» (№ гос. регистрации 20101515 от 08.07.2010), срок выполнения 2010–2012 гг.

Цель и задачи исследования

Цель диссертационной работы – разработка методологических основ клеточной эластографии для экспериментальной оценки локальных упругих характеристик биологических клеток методами контактной механики.

Достижение поставленной цели включало решение следующих задач:

- оценить применимость моделей контактной механики для описания деформирования клетки зондом атомно-силового микроскопа;
- разработать и экспериментально апробировать способ оценки модуля упругости высокоэластичных материалов, в том числе клеток, с учетом влияния адгезии;
- сформулировать методические рекомендации по выбору параметров исследования локальных упругих свойств клеток с помощью процедуры силовой спектроскопии;
- обосновать возможность использования полученных результатов для анализа эластичности клеток и идентификации изменений их функционального состояния.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являлись структурные и локальные упругие характеристики клеток, определяемые с помощью атомно-силовой микроскопии. Предмет исследования – методы контактной механики для оценки упругих характеристик высокоэластичных материалов и локальных упругих свойств клеток на основании экспериментальных данных силовой спектроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты численного моделирования процесса деформирования клетки зондом атомно-силового микроскопа, определяющие диапазоны применимости модели Герца для расчета локального модуля упругости.
2. Способ определения модуля упругости высокоэластичных материалов, в том числе клеток, заключающийся в учете адгезионного взаимодействия острия зонда с поверхностью исследуемого материала при его растяжении.
3. Методические рекомендации по определению упругих характеристик эритроцитов с помощью процедуры статической силовой спектроскопии (выбор области и скорости индентирования, определение предельных нагрузок индентирования).
4. Метод клеточной эластографии, заключающийся в оценке локального модуля упругости клеток и идентификации нарушений их функционального состояния.

Личный вклад соискателя

Представленные в работе научные результаты получены соискателем лично. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследований, планировании и проведении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов. Результаты моделирования деформирования клетки зондом атомно-силового микроскопа и подходы в определении модуля упругости различных материалов обсуждались совместно с научным руководителем, член-корреспондентом, д. т. н., профессором

Чижиком С.А. Обсуждение результатов применения метода клеточной эластографии проводилось с академиком, д. б. н., профессором Черенкевичем С.Н., к. б. н. Константиновой Е.Э. и к. б. н. Квитко О.В. В совместных с соавторами публикациях соискателем выполнялись экспериментальные исследования, проводились расчеты, обсуждались полученные результаты и формулировались выводы проведенных исследований.

Апробация результатов диссертации

Основные результаты исследований доложены на 2nd and 3d «Euro Summer School on Biorheology & Symposium on Micro and Nanomechanics Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems» (Варна, 2006 г.; Боровест, 2009 г.); 12th International workshop on new approaches to high-tech «Nano-design, technology, computer simulations (NDTCS '08)» (Минск, 2008 г.); на Международных конференциях «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2008 г., 2010 г.); на VIII Международном семинаре и IX Международной конференции «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии» (Минск, 2008 г., 2010 г.); на Международной научно-технической конференции «Приборостроение-2008» (Минск, 2008 г.); на VIII Международной научной конференции «Гемореология в микро- и макроциркуляции» (Ярославль, 2009 г.); на 1-ой и 2-ой Международных научных школах «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах» (Москва, 2009 г., 2011 г.); на 6-th National Scientific Practical Conference with International Participation «Reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants and human health» (Смоленск, 2009 г.); на Международном научном симпозиуме «NanoMeasure 2010» (Краков, 2010 г.); на Международной конференции «Optical Techniques and Nano-Tools for Material and Life Sciences» (Минск, 2010 г.); на Advanced Courses on Biophysics «Single Protein Mechanics» (Бильбао, 2010 г.); 1-ой Международной конференции «Междисциплинарные исследования и технологии будущего» (Минск, 2011 г.); XVII Российском симпозиуме по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твёрдых тел (Черноголовка, 2011 г.); XXIII «Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH-2011)» (Киото, 2011 г.); научном семинаре секции «Биомеханика» Института механики Болгарской академии наук (София, 2011 г.).

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликована 31 научная работа, в том числе 8 статей в рецензируемых журналах (всего 4,0 а. л.), 7 статей в сборниках и материалах конференций (всего 2,6 а. л.), а также 15 докладов и тезисов в сборниках материалов международных конференций (всего 1,0 а. л.). Направлена заявка на получение патента на изобретение. Общий объем опубликованных работ составляет 7,6 авторских листов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, библиографического списка и приложений. Диссертационная работа изложена на 121 странице и содержит 42 рисунка, 5 таблиц, список использованных источников в количестве 193 наименований на 14 страницах, список из 31 авторской работы на 5 страницах и приложения на 4 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении диссертационной работы обосновывается актуальность и значимость выбранной темы диссертации, определяется круг вопросов, требующих проведения экспериментальных исследований.

В первой главе представлен обзор литературных источников по вопросам исследования морфологических и упругих свойств клеток, в том числе методом атомно-силовой микроскопии. Описываются альтернативные способы оценки упругих характеристик клеток. Представлены модели, используемые для расчета модуля упругости на основании данных статической силовой спектроскопии, проанализированы их преимущества и недостатки. Указываются факторы, влияющие на рассчитываемое значение модуля упругости клетки. Обосновывается необходимость регламентирования условий измерений и подбора корректной расчетной модели для получения сопоставимых количественных оценок.

На основании выполненного литературного обзора определена цель и задачи исследования, обоснована актуальность диссертационной работы.

Во второй главе описываются экспериментальные методы исследования структуры и локальных упругих свойств материалов на микро- и наноуровне, в том числе клеток. Модуль упругости предлагается определять методом статической силовой спектроскопии, суть которого заключается в измерении силы взаимодействия острия зонда с поверхностью образца в зависимости от расстояния между ними. Описаны особенности технической реализации эксперимента и процедур калибровки измерительной системы (оценка радиуса закругления острия и жесткости консоли АСМ-зонда). Дополнительно для определения интегрального параметра деформируемости эритроцитов (индекса ригидности) использовался метод фильтрации суспензии клеток через мембранные фильтры. Представлены методики химической фиксации клеток, используемые для подготовки образцов для АСМ-исследований. Описывается процедура статистической обработки экспериментальных данных. Достоверность различий средних величин рассчитывали с применением t -критерия Стьюдента, принимая различия достоверными на уровне значимости $p < 0,05$.

В третьей главе рассмотрены модели контактной механики, которые могут быть использованы для описания локального деформирования клеток индентором. Приведены результаты моделирования методом конечных элементов (МКЭ) контактного взаимодействия зонда атомно-силового микроскопа с эритроцитом человека с использованием образовательной версии программного обеспечения ANSYS (рисунок 1). Острие зонда сферической формы с радиусом 40 нм принималось за абсолютно жесткое тело. Сетка контактных элементов создавалась в области предполагаемого внедрения. Рассмотрены две модели деформирования эритроцита острием АСМ-зонда аналогичного реализации процедуры статической силовой спектроскопии: эритроцит как однородное упругое тело (модуль упругости – 100 кПа) и эритроцит как гиперупругое тело, состоящее из оболочки (модуль упругости – 120 кПа) и внутреннего содержимого (модуль упругости – 90 кПа). Для описания эритроцита как гиперупругого тела использовалась модель материала Огдена, которая обычно применяется для описания нелинейного поведения при деформировании таких материалов, как резина или биологическая ткань. В результате моделирования были получены данные о распределении напряжений в значимом объеме поверхностных слоев, о перемещении точек поверхности и фактической площади контакта. Определены численные зависимости упругих сил, от глубины внедрения индентора (рисунок 2), соответствующие экспериментальным данным силовой спектроскопии. Далее на основании данных вычислительного эксперимента был проведен расчет значений модуля упругости с использованием модели Герца.

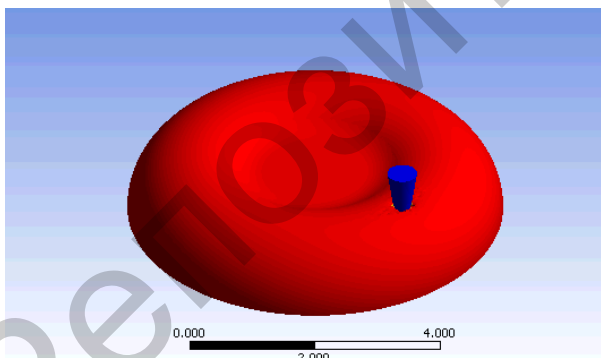


Рисунок 1 – Расчетная схема контакта АСМ-зонда с эритроцитом

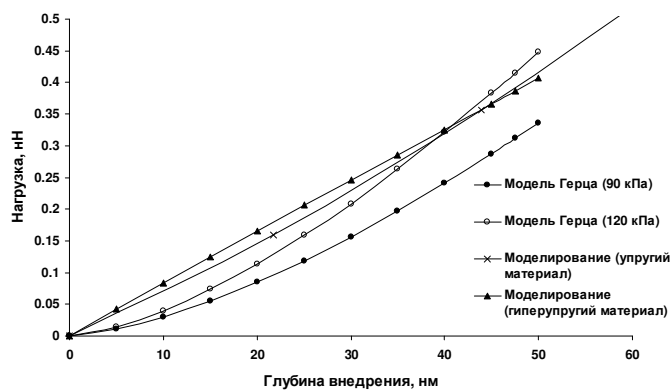
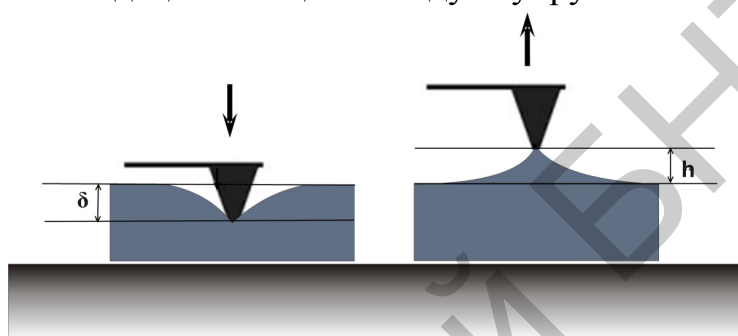


Рисунок 2 – Численная зависимость нагрузки от глубины внедрения (сравнение теории Герца с упругой и гиперупругой моделью МКЭ)

Показано, что теория Герца, которая дает простой алгоритм анализа экспериментальных данных, не может быть использована для широкого диапазона внедрения индентора. Однако могут быть определены глубины

проникновения АСМ-зонда, для которых модель Герца удовлетворительно описывает данную контактную задачу. Для выбранных характеристик клетки это 45 – 100 нм.

В четвертой главе предложен способ определения модуля упругости высокоэластичных материалов, в том числе клеток, заключающийся в оценке растяжения поверхностного слоя в результате адгезионного взаимодействия (рисунок 3), представлены подходы к определению модуля упругости клеток при контактном растяжении мембраны на основании теории оболочек и модели Джонсона – Кенделла – Робертса (ДКР), а также сформулированы методические рекомендации по оценке модуля упругости клеток.



а) деформация сжатия (расчет по модели Герца) б) деформация растяжения (расчет по предлагаемой модели)

δ – глубина внедрения зонда, нм; h – разность между координатой точки контакта острия зонда с исследуемой поверхностью при подводе и координатой точки отрыва острия зонда от исследуемой поверхности (перемещение при растяжении материала), нм

Рисунок 3 – Схема взаимодействия индентора с поверхностью исследуемого высокоэластичного материала при подводе и отводе АСМ-зонда

Для определения модуля упругости клеток при их растяжении была использована теория оболочек, а именно решение задачи о сферической оболочке под действием нормальной силы направленной наружу. Получена система уравнений, которая может быть использована для расчета модуля упругости на основании данных силовой спектроскопии:

$$E = \frac{\sqrt{12(1-\nu^2)}}{\pi} \frac{Pr}{ht^2} \left[\frac{1}{c^2} + \frac{1}{c} \text{ker}'(c) - \frac{1}{2}(1+\nu)k_R \ln \sqrt{2k_R} - \frac{1}{4}k_R \right] + \frac{3}{5\pi} (1-\nu)(2-\nu) \frac{P}{ht} \left[\text{ker}(c) + \frac{c \text{ker}'(c)}{2(2-\nu)} \right]$$

$$c^3 = \frac{3Pr(1-\nu^2)}{4El^3}; \quad l = \frac{\sqrt{rt}}{\sqrt[4]{12(1-\nu^2)}}. \quad (1)$$

Решение системы (1) проводилось с помощью программного пакета «Mathematica 5.0». Анализ полученных результатов показал, что использование на практике такой модели затруднено, поскольку в уравнениях (1) в качестве

констант используются параметры, определение которых является сложной исследовательской задачей.

Для определения модуля упругости предлагается использовать процедуру статической силовой спектроскопии, при этом расчет параметров упругости производить с учетом сил адгезии, влияние которых существенно в случае исследования высокоэластичных материалов, в том числе клеток. На основании модели ДКР получена зависимость для нахождения локального модуля упругости исследуемого образца:

$$E = \frac{3 z_{defl} \cdot k(1 - \nu^2)}{4 (3Rh^3)^{1/2}}, \quad (2)$$

где параметры z_{defl} и h определяются экспериментально исходя из зависимости сила – расстояние при подводе и отводе АСМ-зонда. В этом случае способ определения модуля упругости представляет собой исследование упругих свойств материалов при их растяжении, и является новым подходом в интерпретации данных статической силовой спектроскопии (заявка на изобретение № а 20091443).

Используя данный способ расчета модуля упругости, были исследованы различные по своим упругим свойствам материалы. Упругий материал – полиуретан и вязкоупругие материалы – резина, полидиметилсилоксан (ПДМС) и эритроциты человека. Расчет модуля упругости этих образцов проводился с использованием двух моделей: модели Герца и предлагаемой модели отрыва контактирующего сферического индентора (МОКИ) (таблица 1).

Таблица 1 – Значение локального модуля упругости для различных материалов

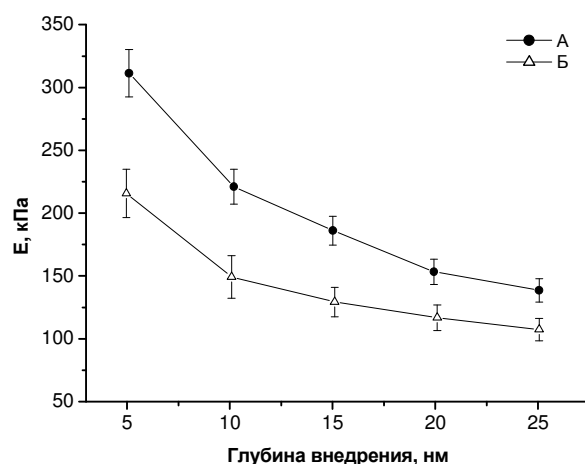
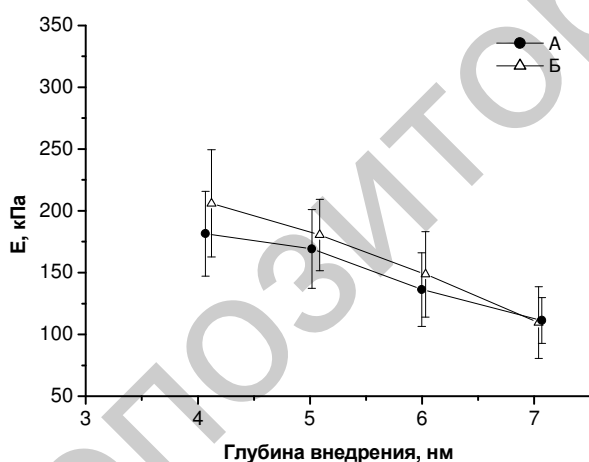
Материал	Справочные значения (E), МПа	Модуль упругости по модели Герца (E_G), МПа	Модуль упругости по модели МОКИ ($E_{МОКИ}$), МПа
полиуретан	100	98,53±6,46	25,56±0,81
резина	1,7	6,11±0,71	2,23±0,29
ПДМС	1,5	5,28±0,19	1,16±0,04
эритроциты	–	0,86±0,04	0,15±0,01

Значения модуля упругости для вязкоэластических материалов, рассчитанных по модели Герца, оказываются завышенными, в то время как МОКИ позволяет получить значения более близкие к известным ($\pm 12\%$).

Предлагаемая модель МОКИ была применена для расчета модуля упругости эритроцитов. Установлено, что значение локального модуля упругости эритроцитов, рассчитанное по модели МОКИ ниже, чем значение данного параметра, полученное при расчете по модели Герца. В данном случае

метод отрыва контактирующего сферического индентора, не только учитывает действие сил адгезии, но и позволяет определить упругие свойства мембраны при ее растяжении. В случае использования модели Герца под модулем упругости понимают комплексные значения, учитывающие как упругие свойства мембраны клетки, так и свойства подлежащего цитоскелета и внутреннего содержимого. Предложенная модель учитывает в большей степени деформирование поверхностной мембраны, вследствие чего значение, полученное при расчете по МОКИ, ниже, чем для модели Герца. Таким образом, осуществляя измерения в цикле нагружения и разгрузки индентора, можно разделить вклад поверхностных и подповерхностных структурных компонент клетки (мембрана и цитоскелет) в формирование их эластичности.

В данной главе представлены также результаты исследования, раскрывающие методологические особенности применения атомно-силовой микроскопии, и в частности, процедуры статической силовой спектроскопии для оценки локальных упругих свойств клеток, в том числе с целью выявления изменений их функционального состояния. Так измерение модуля упругости клеток в зависимости от области индентирования показало, что в случае оценки данного параметра у безъядерных клеток (эритроцитов) выбор области индентирования не существен (рисунок 4 а).



а) А – центральная область,

Б – периферическая область эритроцита

б) А – область над ядром,

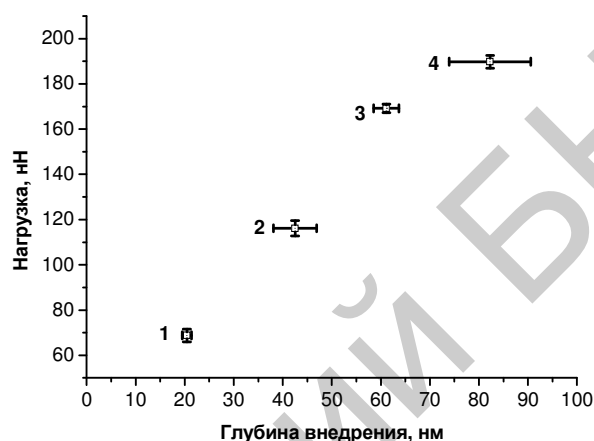
Б – безъядерная область фибробласта

Рисунок 4 – Зависимость локального модуля упругости от глубины внедрения острого зонда при индентировании клетки

При этом у клеток, которые имеют внутренние органеллы, значение модуля упругости будет различно в зависимости от области внедрения АСМ-зонда (рисунок 4 б). Показано, что у фибробластов при малых глубинах внедрения

значения модуля упругости в безъядерной области клетки в 1,5 раза меньше, чем над ядром.

Определены нагрузки, при которых происходит повреждение клетки. Для этого процедура статической силовой спектроскопии проводилась при различных значениях силы, прикладываемой к консоли (70, 120, 170 и 190 нН). Количественные значения нагрузки и возникающие при этом глубины проникновения зонда были определены после расчета данных силовой спектроскопии по модели Герца (рисунок 5). Установлено, что при воздействии с силой выше 150 нН происходит повреждение мембраны эритроцита.



1, 2 – воздействие без повреждения клетки; 3, 4 – повреждение клетки

Рисунок 5 – График зависимости прикладываемой силы от глубины внедрения зонда при различных режимах нагружения

Измерения, проведенные при различных скоростях индентирования в диапазоне 1 – 300 нм/с, показали существенную зависимость рассчитанного значения модуля упругости клеток от скорости их деформирования. При уменьшении скорости нагружения эритроцитарной мембраны упругое сопротивление клетки механическому деформированию возрастает, т.е. можно говорить о неньютонском вязкоупругом поведении. Поэтому сравнительные оценки упругости клеток следует проводить при некоторой определенной скорости движения индентора. Выбраны предпочтительные скорости индентирования (20 – 30 нм/с), которые позволяют реализовать требуемую глубину проникновения индентора.

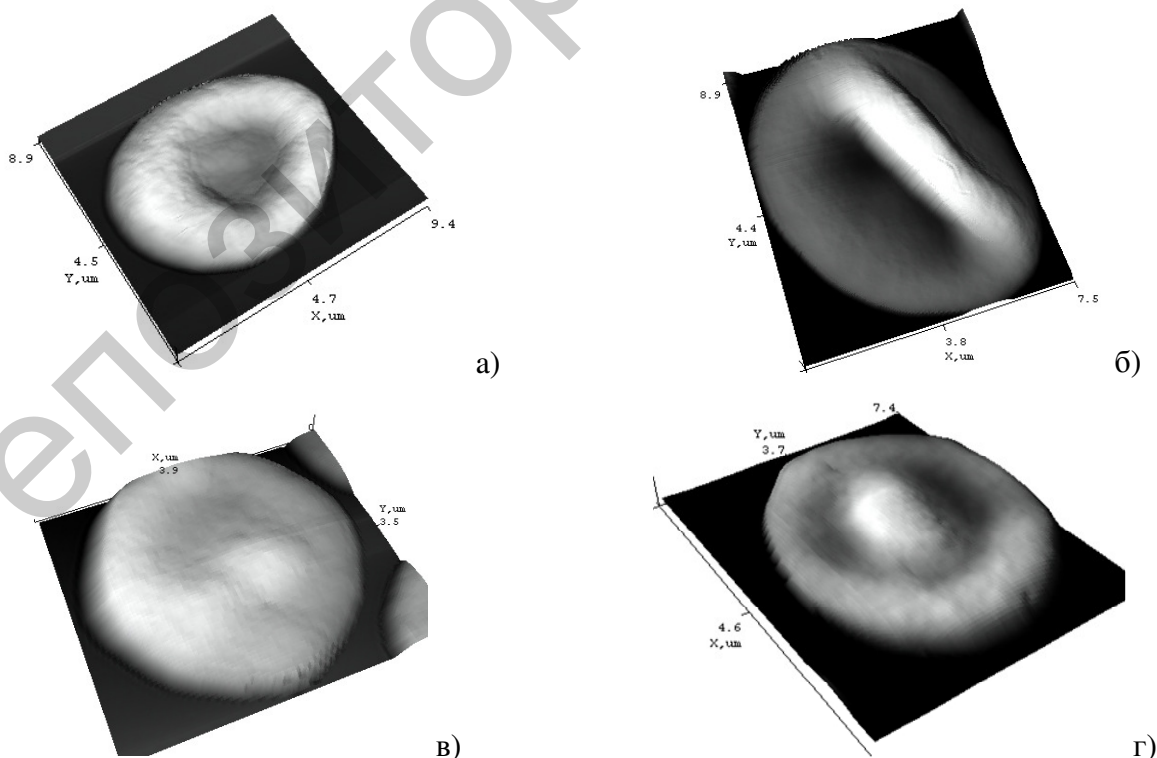
Таким образом, на основании экспериментально полученных данных могут быть сформулированы методические рекомендации по проведению процедуры статической силовой спектроскопии клеток для обеспечения достоверности оценки и сравнительного анализа локальных упругих свойств объектов:

- при исследовании упругих свойств клеток с помощью процедуры силовой спектроскопии следует учитывать наличие внутренних органелл и их влияние на упругость клетки;
- во избежание повреждения поверхности мембраны клетки, прикладываемые нагрузки при проведении процедуры статической силовой спектроскопии фиксированных клеток не должны превышать 150 нН;
- вследствие вязкоупругого поведения измерения локальных механических свойств клетки измерения необходимо проводить при одной скорости контактного деформирования.

При регламентировании условий измерений с помощью АСМ повышается достоверность количественных оценок локальных упругих свойств отдельных клеток, что в свою очередь, открывает широкие возможности для развития новой области биомеханики – клеточной эластографии.

В пятой главе представлены результаты экспериментального исследования упругих свойств клеток с применением вышеописанных методических подходов при развитии некоторых заболеваний или под влиянием на их функциональное состояние внешних факторов.

Показаны возможности применения АСМ для оценки пространственной формы, морфологических особенностей клеток и тонкой структуры мембраны эритроцитов (рисунок 6).



а) дискоцит, размеры изображения – 8,9×9,4 мкм; б) эритроцит с «гребнем», размеры изображения – 8,9×7,5 мкм; в) планоцит, размеры изображения – 7,8×7,0 мкм; г) мишеневидный эритроцит, размеры изображения – 7,4×9,2 мкм

Рисунок 6 – АСМ-изображения эритроцитов

Установлено, что для больных сахарным диабетом второго типа (СД-2) характерен полиморфизм эритроцитов (пойкилоцитоз и анизоцитоз). Среди измененных форм эритроцитов обнаруживаются эритроциты «с гребнем», платоциты, мишеневидные эритроциты (клетки с утолщением в центре).

Оценка упругих свойств эритроцитов методом АСМ с использованием модели Герца показала, что у больных СД-2 типа имеет место снижение деформируемости красных клеток крови (модуль упругости на 27,5 % выше), причем, если при интегральной оценке обнаруживаются лишь тенденции к снижению деформируемости, то при локальной оценке механических свойств мембраны отдельной клетки различия могут быть оценены количественно (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели деформируемости эритроцитов (индекс ригидности – ИРЭ, отн. ед., модуль упругости – Е, кПа) у здоровых лиц и больных СД-2 типа

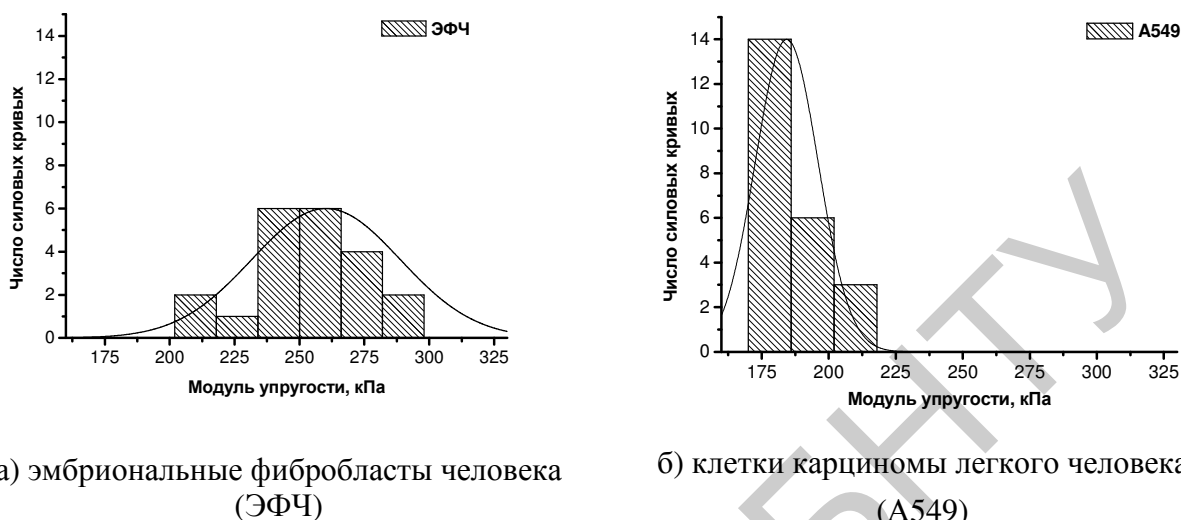
Группа	Здоровые	Больные СД-2 типа
Человек в группе	24	38
Возраст	46,21±1,87	50,96±1,34
ИРЭ, отн.ед.	13,15±1,23	14,01±1,13
Е, кПа (число измерений)	74,47±4,97 (286)	102,75±4,78* (447)

Примечание – различия достоверны по отношению к группе здоровых лиц при уровне значимости: * – < 0,001.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что АСМ-анализ является чувствительным методом, позволяющим проводить оценку деформируемости отдельных клеток.

Исследованы упругие свойства эмбриональных фибробластов человека (ЭФЧ) (нормальные клетки) и клеток карциномы легкого человека - линия А549 (опухолевые клетки). В результате расчета модуля упругости данных клеток установлено, что модуль упругости клеток линии А549 ($E=184,31 \pm 2,45$ кПа) в 1,4 раза ниже, чем у нормальных клеток ($E=260,21 \pm 5,84$ кПа) (рисунок 7). Это означает, что опухолевые клетки являются более эластичными и, предположительно, именно эти изменения объясняют возможность их проникновения в другие ткани, то есть процесс образования метастаз. Кроме того, исследования показали, что сила адгезии ЭФЧ в 1,8 раза выше, чем клеток А549 ($3,39 \pm 0,19$ нН и $1,92 \pm 0,18$ нН соответственно) при уровне значимости 0,001. Следовательно, можно предположить, что у исследуемого типа опухолевых клеток имеет место

нарушение процесса адгезирования по отношению к инородным телам (в нашем случае – к поверхности кремниевого зонда).



а) эмбриональные фибробласты человека (ЭФЧ) б) клетки карциномы легкого человека (A549)

Рисунок 7 – Диаграммы распределения значений модулей упругости на глубине внедрения индентора 150 нм. Ширина столбца – 16 кПа

Таким образом, экспериментально полученные данные свидетельствуют о том, что изменение механических свойств клеток может потенциально служить в качестве биомаркера для детектирования опухолевых клеток и дополнительного метода оценки эффективности терапии.

Известно, что функциональная активность, как тромбоцитов, так и эритроцитов зависит от структурной организации цитоскелета. Поскольку цитоскелет вносит существенный вклад в определяемые значения локального модуля упругости клеток, была поставлена задача - исследовать структурно-функциональные свойства тромбоцитов крови при действии восстановленного глутатиона (GSH) с помощью АСМ, а именно влияние различных концентраций данного вещества на упругие свойства тромбоцитов. Установлено, что в присутствии GSH (5 мкМ) в микромолярных концентрациях происходит деполимеризация кортикального F-актина (использовался флуоресцентный зонд на F-актин, BIODIPY FL-фоллацидин). Это сопровождается снижением в 1,4 раза модуля упругости тромбоцитов. В присутствии GSH (6 мМ) в миллимолярных концентрациях, напротив, наблюдается увеличение концентрации F-актина и повышение модуля упругости клеток в 3,1 раза. Следовательно, оценка локального модуля упругости позволяет расширить представления о некоторых клеточных процессах, сопровождающихся (связанных) с изменениями упругих свойств клеток.

Для оценки возможности применения АСМ при изучении влияния фармакологических препаратов на функциональное состояние клеток крови, а

именно на их механические свойства проведено исследование воздействие доноров оксида азота (NO) нитропруссидом натрия (НП) и динитрозильных комплексов железа с глутатионом (ДНКЖ) на тромбоциты. Установлено, что обработка интактных тромбоцитов НП (1 мМ) и ДНКЖ (50 мкМ) в течение 3 минут не влияет на упругие свойства, в то время как при дезагрегации тромбоцитов донорами NO воздействие ДНКЖ и НП различно. Так, модуль упругости НП-деагрегированных тромбоцитов в 2,9 раза меньше, чем у интактных ($p < 0,05$). При сравнении данного параметра между интактными и ДНКЖ-деагрегированными клетками достоверных различий не установлено. Изменение модуля упругости при агрегации свидетельствует о запуске процессов реорганизации цитоскелета при активации тромбоцитов. Можно предположить, что в результате воздействия ДНКЖ данный процесс прекращается и происходит обратимая реорганизация цитоскелета, поскольку значения модуля упругости интактных, спонтанно и ДНКЖ-деагрегированных тромбоцитов практически не различаются.

Полученные результаты исследования тромбоцитов указывают на возможность использования АСМ для контроля изменений морфологии клетки на разных стадиях активации, а также для проведения количественной оценки локальных механических свойств тромбоцитов, что открывает новые возможности использования данного метода для тестирования действия различных фармакологических веществ и в частности, антиагрегационных препаратов.

Проведено сравнение результатов оценки модуля упругости эритроцитов, эмбриональных фибробластов человека и клеток карциномы легкого, полученных в результате расчета с помощью модели Герца и МОКИ (таблица 3).

Таблица 3 – Локальный модуль упругости различных типов клеток в норме и при патологии, рассчитанный по двум моделям ($X \pm Sx$)

	Эритроциты		ЭФЧ	A549
	здоровых лиц	больных СД-2 типа		
Модуль упругости по модели Герца (E_r), кПа	74,47±4,97	102,75±4,78*	260,21±5,84*	184,31±2,45
Модуль упругости по модели МОКИ ($E_{моки}$), кПа	11,19±0,86	14,21±1,09”	86,65±2,5	76,87±8,9

Примечание – различия достоверны по отношению к группе здоровых лиц при уровне значимости: ” – $p < 0,1$; * – $< 0,001$.

Значение локального модуля упругости эритроцитов при СД-2 типа рассчитанное по модели МОКИ, представляющей собой исследование упругих свойств мембраны при ее растяжении, выше, чем у эритроцитов здоровых лиц. Это свидетельствует о чувствительности предложенного способа, поскольку при СД-2 типа изменение упругости эритроцитов связывают с изменением деформируемости мембраны. Расчет локального модуля упругости нормальных и опухолевых клеток по модели МОКИ не выявил достоверных различий. Считается, что изменение упругих свойств опухолевых клеток связано с перестройкой подмембранного цитоскелета, поэтому при изучении упругих свойств данных клеток с помощью статической силовой спектроскопии модель Герца является более чувствительной.

Таким образом, на основании полученных результатов можно говорить о возможности использования метода клеточной эластографии для оценки упругих свойств клеток. Разработанный метод позволяет идентифицировать изменения функционального состояния клеток. Кроме того, можно предположить, что использование нескольких расчетных моделей предоставит возможность получать информацию о том, на каком уровне происходят изменения механических свойств единичной клетки: изменение упругих свойств мембраны, либо мембраны и подлежащего цитоскелета в совокупности.

Перечень условных обозначений

E – модуль Юнга образца, Па; ν – коэффициент Пуассона образца; R – радиус закругления острия, м; z_{defl} – изгиб консоли, нм; k – жесткость консоли, Н/м; h – разность между координатой точки контакта острия зонда с исследуемой поверхностью при подводе и координатой точки отрыва острия зонда от исследуемой поверхности (перемещение при растяжении материала), м; P – прикладываемая нагрузка, Н; r – радиус оболочки, м; t – толщина оболочки, м; \bar{c} – площадь контакта, м²; l – характерный размер; c – безразмерная величина, равная $c = \bar{c}/l$; $kei(c)$ – функция Томпсона; $k_R = l^2/r^2$ – коэффициент, характеризующий толщину оболочки.

ОСНОВНЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. Проведено численное моделирование упругого взаимодействия острия АСМ-зонда с однородной упругой и гиперупругой клеткой, состоящей из оболочки и внутреннего содержимого. Определен диапазон глубин проникновения АСМ-зонда (45–100 нм), для которых модель Герца удовлетворительно описывает данную контактную задачу [8].

2. Разработан и экспериментально апробирован способ определения модуля упругости высокоэластичных материалов, в том числе клеток, заключающийся в учете адгезионного взаимодействия острия зонда атомно-силового микроскопа с поверхностью исследуемого материала при его растяжении [3, 14, 31].

3. Предложены методические рекомендации по исследованию упругих свойств эритроцитов с помощью процедуры статической силовой спектроскопии: выбор области внедрения не влияет на значение локального модуля упругости безъядерных клеток, во избежание повреждения клеточной мембраны, прикладываемые нагрузки при проведении процедуры статической силовой спектроскопии фиксированных клеток не должны превышать 150 нН; вследствие вязкоупругого поведения измерения локальных механических свойств клетки необходимо проводить при одной скорости контактного деформирования [1, 2, 9, 11, 16–18, 23, 25, 27].

4. Обоснованы возможности использования клеточной эластографии для идентификации нарушений функционального состояния клеток. Установлено, что при нарушении транспорта глюкозы через клеточную мембрану (СД-2 типа) имеет место уменьшение деформируемости эритроцитов; модуль упругости опухолевых клеток в 1,4 раза меньше модуля упругости нормальных клеток при расчете по модели Герца. Показано, что метод клеточной эластографии позволяет выявлять изменения состояния тромбоцитов, происходящих под действием глутатиона в различных концентрациях и доноров оксида азота, что демонстрирует возможности использования данного метода для тестирования воздействия химических веществ на упругие свойства отдельной клетки [2, 4–7, 10, 12, 13, 15, 19–22, 24, 26, 28–30].

5. Впервые определены возможности оценки функциональных изменений клетки на разных уровнях (изменение локальных упругих свойств мембраны, подлежащего цитоскелета либо мембраны и цитоскелета одновременно) в результате использования различных диапазонов экспериментальных данных и различных расчетных моделей [3, 14, 31].

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Разработанный способ оценки модуля упругости может быть применен для исследования упругих свойств вязкоупругих материалов, в том числе клеток.

2. Результаты исследований могут быть использованы при исследовании модуля упругости клеток методом статической силовой спектроскопии для получения сопоставимых данных, а также для оценки функциональных изменений клетки.

3. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс при проведении лабораторного практикума «Метод изучения структурно-морфологических характеристик клеток крови» на 5 курсе физического факультета БГУ для студентов квалификации «Физик. Исследователь», «Физик. Преподаватель физики» (Акт о практическом использовании в учебном процессе от 3.12.2010).

4. В настоящее время разработанные подходы оценки упругих свойств клеток используются при выполнении работ по заданиям Подпрограммы «Биотехнологическое оборудование» ГП «Инновационные биотехнологии» (2010–2012 гг.) и ГПНИ «Междисциплинарные научные исследования, новые зарождающиеся технологии как основа устойчивого инновационного развития» («Конвергенция» 2011–2013 гг.).

5. Результаты работы обладают высоким экспортным потенциалом и используются при разработке нового оборудования и программного обеспечения для проведения исследований в области клеточных биотехнологий (Акт о выполнении зарубежного контракта от 17.10.2011).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах и сборниках

1. Дрозд, Е.С. Атомно-силовая микроскопия структурно-механических свойств мембран эритроцитов / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, Е.Э. Константинова // Рос. журн. биомеханики. – 2009. – Т. 13, № 4(46). – С. 22–30.

2. Дрозд, Е.С. Исследование опухолевых и иммортальных клеток методом атомно-силовой микроскопии / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, О.В. Квитко // Тепло- и массоперенос – 2008 : сб. науч. тр. / Ин-т тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова Нац. акад. наук Беларуси ; науч. ред. В.Л. Драгун. – Минск, 2009. – С. 369–377.

3. Дрозд, Е.С. Оценка модуля упругости высокоэластичных материалов в наномасштабе методом внедрения и отрыва сферического индентора / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 6. – С. 117–122.

4. Study of the mechanical properties of single cells as biocomposites by atomic force microscopy / M. Starodubtseva, S. Chizhik, N. Yegorenkov, I. Nikitina, E. Drozd // Microscopy : Science, Technology, Applications and Education : [in 3 vol.] / Formatex Research Center ; ed.: A. Méndez-Vilas, J. Díaz. – Badajoz, 2010. – Vol. 1. – P. 470–477.

5. Drozd, E.S. Mechanical characteristics of erythrocyte membranes in patients with type 2 diabetes mellitus / E.S. Drozd, S.A. Chizhik, E.E. Kontantinova // Series of Biomechanics / Inst. of Mechanics (Bulg. Acad. of Science), Bulg. Soc. of Biomech. – 2010. – Vol. 25, № 3/4. – P. 53–60.

6. Redox regulation of morphology, cell stiffness, and lectin-induced aggregation of human platelets / E.V. Shamova, I.V. Gorudko, E.S. Drozd, S.A. Chizhik, G.G. Martinovich, S.N. Cherenkevich, A.V. Timoshenko // Eur. Biophys. J. – 2011. – Vol. 40, № 2. – P. 195–208.

7. Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами монооксида азота / Е.В. Шамова, О.Д. Бичан, Е.С. Дрозд, И.В. Горудко, С.А. Чижик, К.Б. Шумаев, С.Н. Черенкевич, А.Ф. Ванин // Биофизика. – 2011. – Т. 56, № 2. – С. 256–271.

8. Дрозд, Е.С. Моделирование упругого взаимодействия острия зонда атомно-силового микроскопа с биологической клеткой / Е.С. Дрозд, С.А. Пронкевич, С.А. Чижик // Механика машин, механизмов и материалов. – 2011. – № 3(16). – С. 64–66.

Статьи в сборниках трудов и материалов научных конференций

9. Drozd, E.S. Combined atomic force microscopy and optical microscopy measurements as a method of erythrocyte investigation / E.S. Drozd, S.A. Chizhik // 12th International Workshop on Nanodesign Technology and Computer Simulations : Proc. of SPIE / Intern. Soc. for Optical Eng ; ed.: A.I. Melker, V.V. Nelayev. – [S. l.], 2009. – Vol. 7377. – P. 73770E–73770E-8.

10. Дрозд, Е.С. Новый метод биомедицинских исследований / Е.С. Дрозд // Наука и инновации. – 2009. – № 10(80). – С. 20–22.

11. Drozd, E.S. Combination of optical and probe microscopy for biological cells manipulation / E.S. Drozd, S.A. Chizhik // Optical Techniques and Nano-Tools for Material and Life Sciences (OTN MLS-2010) : Intern. Conf., Minsk, June 15–19, 2010 / B.I. Stepanov Inst. of Phys. NAS Belarus [et. al.] ; ed.: V.N. Belyi [et. al.]. – Minsk, 2010. – P. 179–184.

12. Вязкоупругие свойства эритроцитов и показатели перекисного окисления липидов у больных сахарным диабетом 2 типа / Е.С. Дрозд, И.В. Буко, Е.Э. Константинова, Д.А. Милютин // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 3–25 июня 2010 г. : в 2 ч. / Издат. центр БГУ ; ред.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2010. – Ч. 2, т. 2. – С. 198–200.

13. Регуляция механических свойств эритроцитов донорами оксида азота / Е.В. Шамова, О.Д. Бичан, Е.С. Дрозд, И.В. Горудко, А.Ф. Ванин // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования

биосистем : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 23–25 июня 2010 г. : в 2 ч. / Издат. центр БГУ ; редкол.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2010. – Ч. 2, т. 2. – С. 151–153.

14. Дрозд, Е.С. Метод оценки локальных упругих свойств биологических клеток на базе атомно-силовой микроскопии / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : IX Междунар. конф., Минск, 12–15 окт. 2010 г. : сб. докл. / [редкол.: С.А. Чижик (пред.) и др.] ; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова. – Минск, 2010. – С. 124–130.

15. Использование атомно-силовой микроскопии для диагностики морфофункционального состояния тромбоцитов / Л.В. Кухаренко, С.А. Чижик, Е.С. Дрозд, С.В. Сыроежкин, Ю.В. Селявко, Л.Г. Гелис, Е.А. Медведева // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии – 2010 : IX Междунар. конф., Минск, 12–15 окт. 2010 г. : сб. докл. / [редкол.: С.А. Чижик (пред.) и др.] ; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова. – Минск, 2010. – С. 156–162.

Тезисы докладов научных конференций

16. Экспериментальный комплекс, совмещающий функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии, для микро- и наноанализа биологических объектов / С.А. Чижик, В.В. Чикунов, Е.С. Дрозд, А.П. Шкадаревич, А.М. Курганович, А.А. Суслов // Приборостроение – 2008 : материалы Междунар. науч.-техн. конф., Минск, 12–14 нояб. 2008 г. / редкол.: О.К. Гусев (пред.) [и др.] ; Беларус. нац. техн. ун-т. – Минск, 2008. – С. 51–52.

17. Дрозд, Е.С. Возможности применения атомно-силовой микроскопии для оценки структурно-механических свойств мембран эритроцитов / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, Е.Э. Константинова // Гемореология и микроциркуляция: (от функциональных механизмов в клинику): материалы Междунар. науч. конф., Ярославль, 12–15 июня 2009 г. / Ярослав. гос. пед. ун-т им. К.Д. Ушинского ; редкол.: А.В. Муравьев [и др.]. – Ярославль, 2009. – С. 46.

18. Дрозд, Е.С. Сканирующая зондовая микроскопия в оценке вязкоупругих свойств клеточной мембраны / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, Е.Э. Константинова // Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах : материалы 1-й Междунар. науч. шк., Москва, 14 июля 2009 г. / Мос. гос. ун-т. – М., 2009. – С. 214–216.

19. Drozd, E.S. Mechanical characteristics of erythrocyte membranes in patients with type 2 diabetes mellitus / E.S. Drozd, E.E. Konstantinova // 3rd Eurosummer School on Biorheology and Symposium on Micro and Nanomechanics

Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems, Borovets, Bulgaria, 29 Aug. – 2 Sept., 2009 / ed. N. Antonova. – Sofia, 2009. – P. 45–46.

20. Study of mechanical surface properties of platelets, disaggregated by donor of nitric oxide / E.V. Shamova, O.D. Bichan, E.S. Drozd, S.A. Chizhik, K.B. Shumaev // Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Antioxidants and Human Health : 6th Intern. Sci. Conf., Smolensk, Russia, Sept. 14–18, 2009 / Smolenskoblغاز. – Smolensk, 2009. – P. 178–179.

21. AFM investigations of structural features and mechanical properties of intact and disaggregated platelets / E.S. Drozd, S.A. Chizhik, O.D. Bichan, E.V. Shamova // NanoMeasure – 2010 : Science. Symp., Krakow, Poland, June 3–4, 2010 / Jagiellonian Univ. – Krakow, 2010. – P. 32.

22. Glutathione-mediated changes in mechanical properties and lectin-induced aggregation of platelets / E.V. Shamova, I.V. Gorudko, E.S. Drozd, G.G. Martinovich, S.N. Cherenkevich // FEBS Journal : 35th FEBS (Federation of European Biochemical Societies) : Congr., Gothenburg, Sweden, 26 June – 1 July, 2010. – Vol. 277, № 1. – P. 299–300.

23. Drozd, E.S. Combination of optical and probe microscopy for biological cells manipulation / E.S. Drozd, S.A. Chizhik // Optical Techniques and Nano-Tools for Material and Life Sciences (OTN MLS-2010) : Intern. Conf., Minsk, June 15–19, 2010 / B.I. Stepanov Inst. of Phys. NAS Belarus ; ed.: V.N. Belyi [et. al.]. – Minsk, 2010. – P. 35–36.

24. Computer analysis of geometrical and movement parameters of biological cells by their microscopic imagery / V.M. Artemiev, A.O. Naumov, L.L. Kohan, S.A. Chizhik, E.S. Drozd, F.E. Dromashko, O.V. Kvitko, Ya.I. Sheiko, I.I. Koneva // Optical Techniques and Nano-Tools for Material and Life Sciences (OTN MLS-2010) : Intern. Conf., Minsk, June 15–19, 2010 / B.I. Stepanov Inst. of Phys. NAS Belarus [et. al.] ; ed.: V.N. Belyi [et. al.]. – Minsk, 2010. – P. 41–42.

25. Комплекс зондово-оптических методов в исследовании живых клеток / С.А. Чижик, Е.С. Дрозд, О.В. Квитко, В.М. Артемьев // Первая международная конференция «Междисциплинарные исследования и технологии будущего», Минск, 16–18 мая 2011 г. / Ин-т физики им. В.И. Степанова НАН Беларуси ; редкол.: Д.Б. Хорошко, С.Я. Килин. – Минск, 2011. – С. 1–2.

26. Использование лазерной конфокальной и атомно-силовой микроскопии для определения функционального состояния тромбоцитов / И.В. Горудко, Е.В. Шамова, Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, А.В. Соколов, О.М. Панасенко, С.Б. Бушук, С.Н. Черенкевич, Б.А. Бушук // Первая международная конференция «Междисциплинарные исследования и технологии будущего», Минск, 16–18 мая, 2011 / Ин-т физики им. В.И. Степанова НАН Беларуси ; редкол.: Д.Б. Хорошко, С.Я. Килин. – Минск, 2011. – С. 24–25.

27. Дрозд, Е.С. Клеточная эластография как метод оценки упругих свойств клеток с помощью атомно-силового микроскопа / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик // XVII Российский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел, Черногоровка, 31 мая – 2 июня 2011 г. / ИПТМ РАН. – Черногоровка, 2011. – С. 238.

28. Дрозд, Е.С. Оценка морфо-функционального состояния тромбоцитов методом АСМ / Е.С. Дрозд, Л.В. Кухаренко, С.В. Сыроежкин, Л.Г. Гелис, Е.А. Медведева, И.В. Лазарева // Современные достижения бионаноскопии : материалы 5-ой Междунар. конф., Москва, 15–17 июня 2011 г. / Моск. гос. ун-т. – М., 2011. – С. 22.

29. Drozd L. Evaluation of the elastic properties by atomic force microscopy of erythrocytes and lipid peroxidation in patients with type 2 diabetis mellitus / L. Drozd, E. Konstantinova, I. Buko // XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis : 57th Annu. SSC Meeting (ISTH-2011) [Electronic resource] : Intern. Conf., Kyoto, Japan, June 23–28, 2011 / Intern. Soc. on Thrombosis and Haemostasis. – Electronic data and program (74,3 Mb). – Kyoto, 2011. – Vol. 9 : Suppl. 2. – 1 electronic optical disk (CD-ROM).

30. Regulation of platelet functional and mechanical properties by nitric oxide donors / V.D. Bichan, E.V. Shamova, E.S. Drozd, I.V. Gorudko, S.A. Chizhik, K.B. Shumaev, S.N. Cherenkevich, A.F. Vanin // XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis : 57th Annu. SSC Meeting (ISTH-2011) [Electronic resource] : Intern. Conf., Kyoto, Japan, June 23–28, 2011 / Intern. Soc. on Thrombosis and Haemostasis. – Electronic data and program (74,3 Mb). – Kyoto, 2011. – Vol. 9 : Suppl. 2. – 1 electronic optical disk (CD-ROM).

Патенты на изобретения и заявки на патенты и полезные модели

31. Способ определения модуля упругости : пат. Респ. Беларусь, МПК7 G 01N 13/00/ G 01N 3/40 / С.А. Чижик, Е.С. Дрозд ; заявитель Ин-т тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова Нац. акад. наук Беларуси. – № а 20091443 ; заявл. 13.10.2009 ; опубл. 30.06.2011 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2011. – № 3. – С. 26.

РЕЗЮМЕ

Дрозд Елизавета Сергеевна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛОКАЛЬНЫХ УПРУГИХ ХАРАКТЕРИСТИК БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЕТОДАМИ КОНТАКТНОЙ МЕХАНИКИ

Ключевые слова: модели контактной механики, модуль упругости, биологическая клетка, атомно-силовая микроскопия, силовая спектроскопия.

Объект исследования: локальные упругие свойства клеток.

Цель работы: разработка методологических основ клеточной эластографии для экспериментальной оценки локальных упругих характеристик биологических клеток методами контактной механики.

Методы исследования: атомно-силовая микроскопия, статическая силовая микроскопия, оптическая микроскопия, методы фильтрации и спектрофотометрии, компьютерное моделирование.

Полученные результаты и их новизна: в результате компьютерного моделирования деформирования клетки зондом атомно-силового микроскопа определен диапазон глубины проникновения зонда, для которых модель Герца удовлетворительно описывает данную контактную задачу. Разработана и экспериментально апробирована методика оценки модуля упругости высокоэластичных материалов, в том числе клеток, заключающаяся в учете адгезионного взаимодействия острия зонда с поверхностью исследуемого материала при его растяжении. Обоснованы возможности использования клеточной эластографии для анализа и идентификации изменений функционального состояния клеток на примере таких заболеваний как сахарный диабет второго типа и рак легкого. Впервые определены возможности оценки изменений на разных уровнях клетки (изменение механических свойств мембраны, подлежащего цитоскелета либо мембраны и цитоскелета в совокупности) в результате использования различных диапазонов экспериментальных данных и расчетных моделей.

Рекомендации по использованию: метод клеточной эластографии может быть использован для идентификации и анализа изменений функционального состояния клеток, а также для оценки степени воздействия химических веществ на механические свойства отдельной клетки.

Область применения результатов: биомеханика клетки, медико-биологическое приборостроение, разработка новых методов диагностики заболеваний человека.

РЭЗІЮМЭ

Дрозд Лізавета Сяргееўна

ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ АЦЭНКА ЛАКАЛЬНЫХ ПРУГКІХ ХАРАКТАРЫСТЫК БІЯЛАГІЧНЫХ КЛЕТАК МЕТАДАМІ КАНТАКТНАЙ МЕХАНІКІ

Ключавыя словы: метады кантактнай механікі, модуль пругкасці, біялагічная клетка, атамна-сілавая мікраскапія, сілавая спектраскапія.

Аб'ект даследавання: лакальныя пругкія уласцівасці клетак.

Мэта работы: распрацоўка метадалагічных асноў клетачнай эластаграфіі для эксперыментальнай ацэнкі лакальных пругкіх характарыстык біялагічных клетак метадамі кантактнай механікі.

Метады даследавання: атамна-сілавая мікраскапія, статычная сілавая мікраскапія, аптычная мікраскапія, метады фільтрацыі і спектрафотаметрыі, камп'ютэрнае мадэляванне.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: у выніку камп'ютэрнага мадэлявання дэфармацыі клеткі зондам атамна-сілавога мікраскопа быў вызначаны дыяпазон глыбіні пранікнення зонда, для якіх мадэль Герца здавальняючы апісвае дадзеную кантактную задачу. Распрацавана і эксперыментальна апрабавана метадыка ацэнкі модуля пругкасці высокаэластычных матэрыялаў, у тым ліку клетак, якая ўлічвае адгезійныя ўзаемадзеянні зонда з паверхняй матэрыялу пры яго расцяжэнні. Абгрунтаваны магчымасці выкарыстання клетачнай эластаграфіі для аналізу і ідэнтыфікацыі клеткавых паталогій на прыкладзе такіх захворванняў як цукровы дыябет другога тыпу і рак лёгкага. Упершыню вызначаны магчымасці ацэнкі змяненняў на розных узроўнях клеткі (змяненне механічных уласцівасцяў мембраны, падлягаемага цытаскелета альбо мембраны і цытаскелета ў сукупнасці) ў выніку выкарыстання розных дыяпазонаў эксперыментальных дадзеных і разліковых мадэляў.

Рэкамендацыі па выкарыстанню: метады клетачнай эластаграфіі можа быць выкарыстаны для ідэнтыфікацыі і аналізу змяненняў функцыянальнага стану клетак, а таксама для ацэнкі ўздзеяння хімічных рэчываў на пругкія ўласцівасці асобнай клеткі.

Вобласці прымянення вынікаў: біямеханіка клеткі, медыка-біялагічнае прыборабудаванне, распрацоўка новых метадаў дыягностыкі захворванняў чалавека.

SUMMARY

Drozd Lizaveta

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE LOCAL ELASTIC PROPERTIES OF BIOLOGICAL CELLS BY THE CONTACT MECHANICS METHODS

Keywords: methods of the contact mechanics, modulus of elasticity, biological cell, atomic force microscopy, force spectroscopy.

The object of research: elastic properties of the cells.

The purpose: to develop the methodological bases of cell's elastography for experimental evaluation of the local elastic properties of biological cells using the models of contact mechanics.

Methods: atomic force microscopy, static force spectroscopy, optical microscopy, spectrophotometry and filtering techniques, computer simulation.

The results and their novelty: As a result of computer simulation of the cell deformation of the atomic force microscope probe a range of the penetration depth of the probe was identified, for which the Hertz model sufficiently describes this contact problem. The method of the elastic modulus of highly elastic materials estimation, including cells was developed and experimentally tested. According to this method we consider the adhesive interaction of the tip with the material surface under its stretching. The possibility of cell's elastography using for the analysis and identification of cellular abnormalities as an example of such pathologies as diabetes mellitus type II and lung cancer were found. For the first time the opportunity of the estimation of the changes at different levels of the cell (the mechanical properties of the membrane or the membrane and the cytoskeleton together) as a result of different ranges of the experimental data and calculated models were determined.

Recommendations for using: the method of cell elastography can be used for identification and analysis of changes in the functional state of the cells, as well as to assess the impact of chemicals on the elastic properties of individual cells.

Field of application: cells biomechanics, biomedical instrumentation, development of new methods of the human diseases diagnosis.