

от 13.07.1994 г. // Сб. законодательных и инструктивных документов по медико-социальной экспертизе и реабилитации / сост. Э. И. Зборовский и др. — Мн., 1997. — С. 84–111.

13. Трубников, В. Ф. Заболевания и повреждения опорно-двигательного аппарата / В. Ф. Трубников. — Киев: Здоров'я, 1984. — 328 с.

14. Ульрих, Э. В. Вертебрология в терминах, цифрах, рисунках / Э. В. Ульрих, А. Ю. Мушкин. — СПб.: «ЭЛБИ-СПб», 2002. — 187 с.

15. Физическая реабилитация: учеб. для студентов высш. учеб. заведений / под ред. С. П. Попова. — 2-е изд. — Ростов н/Д.: Феникс, 2004. — 608 с.

16. Фищенко, В. Я. Сколиоз / В. Я. Фищенко. — Макеевка, 2005. — 558 с.

17. Цивьян, Я. Л. Сколиотическая болезнь и ее лечение / Я. Л. Цивьян. — Ташкент: Медицина, 1972. — 221 с.

18. Чаклин, В. Д. Ортопедия / В. Д. Чакли. — М.: Медгиз, 1957. — Кн. 2. — 798 с.

19. Чаклин, В. Д. Сколиоз и кифозы / В. Д. Чаклин, Е. А. Абальмосова. — М.: Медицина, 1973. — 255 с.

20. Шатохин, В. Д. Ранняя диагностика и консервативное лечение сколиоза у детей: пособие для врачей / В. Д. Шатохин, Д. В. Колчин, В. В. Колесов. — Тольятти, 2005. — 183 с.

21. Cobb, J. R. Outline for the study of scoliosis / J. R. Cobb // Am. Acad. Orthopaedic Surg. — 1948. — Vol. 5. — P. 261–275.

22. Ferguson, A. B. The study and treatment of scoliosis / A. B. Ferguson // Sth. Med. J. — 1930. — Vol. 23. — P. 2116–2120.

23. George, K. A comparative study of two popular methods of measuring scoliotic deformity of the spine / K. George, J. Rippstein // J. Bone Jt. Surg. — 1961. — Vol. 43-A. — P. 809–818.

24. Jentschura, G. Zur pathogenese der säuglingsskoliose / G. Jentschura // Arch. Orthop. Unfall. Chir. — 1956. — Bd. 48. — S. 582–603.

25. Moe's textbook of scoliosis and other spinal deformities / D. S. Bradford [et al.]. — N.Y.: W.B. Saunders Company, 1987. — 651 p.

26. Ponseti, I. Prognosis in idiopathic scoliosis / I. Ponseti, B. Friedman // J. Bone Jt. Surg. — 1950. — Vol. 32-A. — P. 381–395.

Поступила 07.05.2007

УДК 616.43.083.3:57.083.32:614.876

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ИЗУЧЕНИЯ НАНОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков

Гомельский государственный медицинский университет  
Гомельский государственный технический университет им. П. О. Сухого

Представлен проблемный обзор исследований механических свойств клеточных поверхностей методами атомно-силовой микроскопии.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия (АСМ), модуль упругости, механические свойства клеток.

## METHODOLOGICAL PROBLEMS OF THE STUDY OF THE LIVING CELL'S NANOMECHANICAL PROPERTIES

T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov

Gomel State Medical University  
Gomel State Technical University

The review aims at analyzing the investigations of the cellular mechanical properties by the modern AFM technologies.

Key words: Atomic force microscopy (AFM), elastic modulus, mechanical properties of the cells.

Принцип атомно-силовой микроскопии (АСМ) заключается в сканировании поверхности образца тончайшей иглой, кото-

рая закреплена на подвижной консоли (рисунк 1). Отклонения консоли регистрируются высокочувствительной системой и

визуализируются на экране в виде кривых или в виде объемного изображения образца. Поведение консоли отражает не только рельефные особенности объекта, но и взаимодействия, возникающие между острием иглы и исследуемой поверхностью. Поэтому атомно-силовые микроскопы позволяют оценивать как нанотопографию поверхности, так и ее локальные физико-механические свойства, что также может быть представлено в виде

АСМ-изображений. Важнейшим достоинством АСМ является возможность исследовать цитологические объекты и в воздушной среде, и в растворе, в том числе получать информацию о динамике структурно-функциональных свойств живых клеток с высоким пространственным и временным разрешением. Подробнее об использовании АСМ для исследования биологических объектов смотрите в обзорах [1].

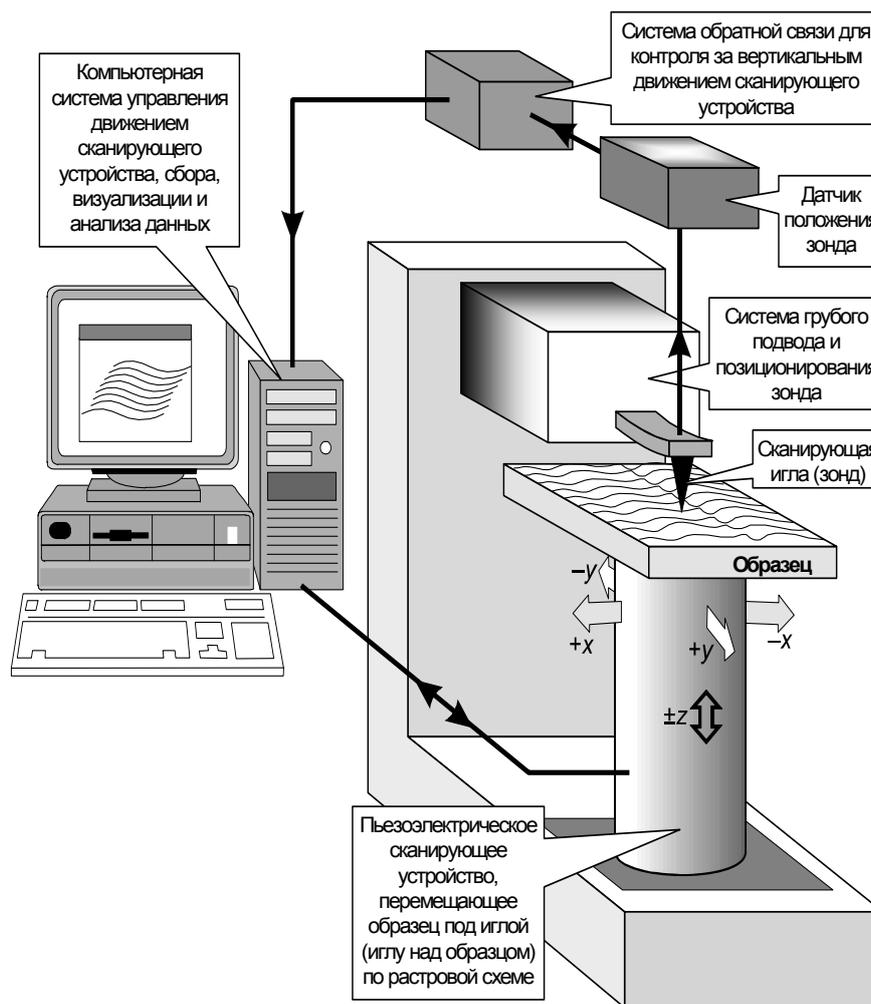


Рисунок 1 — Общая схема атомно-силового микроскопа

В последнее десятилетие АСМ начала интенсивно использоваться для изучения механических свойств живых клеток, что сразу же вызвало появление целого каскада методологических проблем.

Статья представляет собой обзор и анализ методологических подходов к этой проблеме, а также тех факторов, которые необходимо учитывать при определении физико-механических характеристик клеточных поверхностей.

### АСМ-методы определения цитомеханических свойств

К настоящему времени разработан широкий спектр различных режимов и методов, расширяющих аналитические возможности АСМ (рисунок 2). Среди них можно выделить два основных режима: контактный, или статический (static contact mode), когда игла находится в постоянном контакте с поверхностью образца, и динамический (tapping mode), или так называемый «обстукивающий режим».

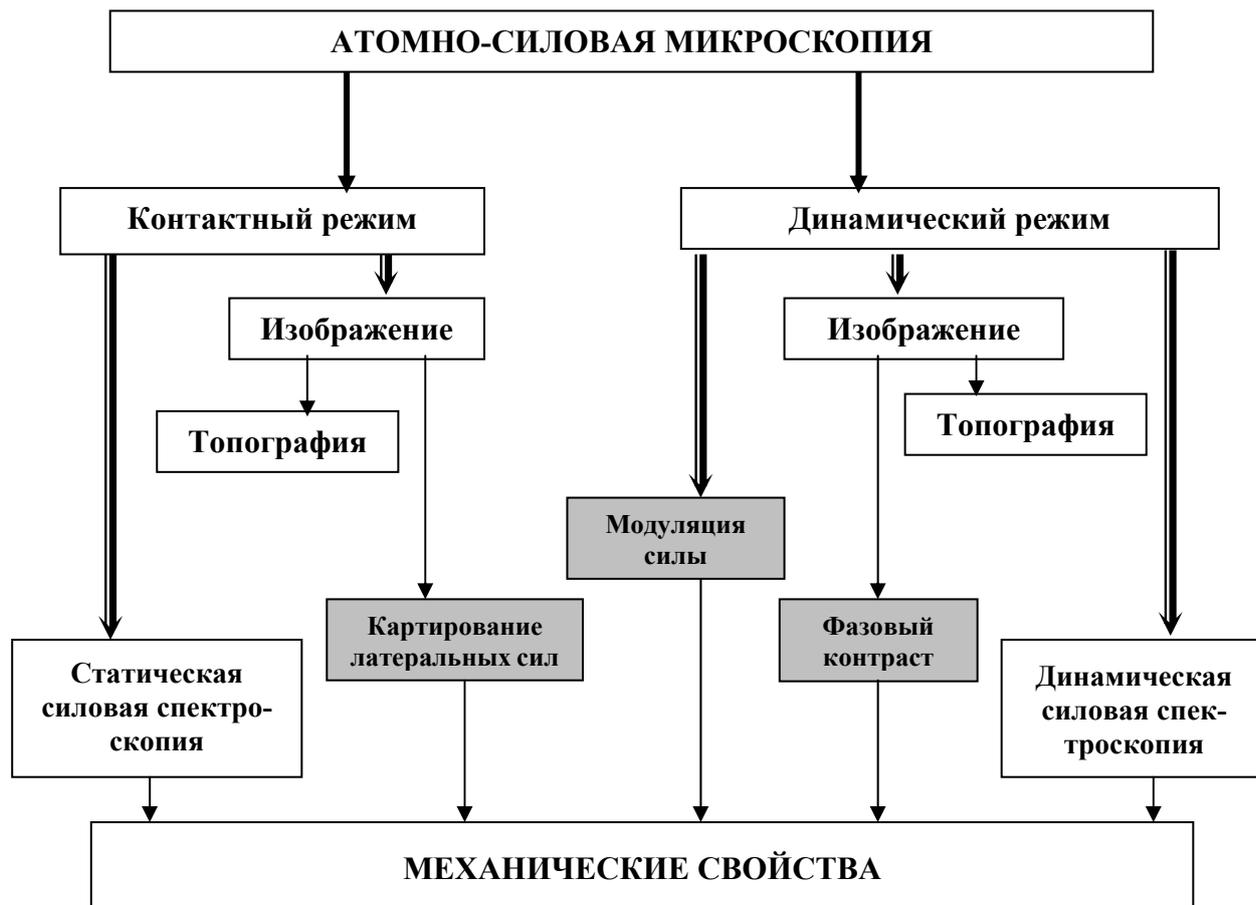


Рисунок 2 — Методы атомно-силовой микроскопии, используемые при изучении клеточной наномеханики

Цитомеханические свойства могут быть оценены при реализации обоих режимов и с использованием различных подходов, к которым относятся силовая спектроскопия, метод фазового контраста, картирование латеральных сил и метод «force modulation».

Три последних метода дают качественную или полуколичественную оценку локальных механических свойств, позволяя создавать карты их пространственного распределения на клеточной поверхности.

Метод записи фазового образа (фазовый контраст) и «force modulation» используются при работе в «обстукивающем режиме». Благодаря кратковременному контакту зонда с образцом минимизируется вероятность повреждения клеточных мембран. При этом можно анализировать колебательные характеристики зонда при сканировании клеточной поверхности. Изменения в колебательном поведении консоли будут отражать неоднородность в локаль-

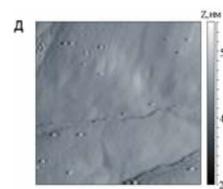
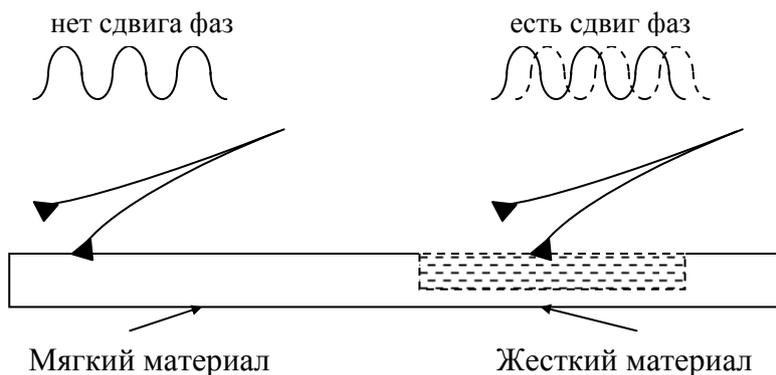
ных физико-механических свойствах поверхностных слоев образца.

Метод фазового контраста основан на том, что при «обстукивании» точек с разными микромеханическими свойствами изменяется фаза колебаний консоли (рисунок 3, А). Например, сдвиг фаз нарастает с увеличением модуля упругости образца [2]. Благодаря этому неоднородность в упругих свойствах отражается как различия в контрастности АСМ-изображений (темные и светлые участки клеточной поверхности).

В случае «force modulation» анализируются изменения в амплитуде колебательных движений консоли.

Опосредованную информацию об эластических свойствах клеток получают и путем создания карт латеральных сил. В этом случае регистрируются отклонения консоли, которые связаны либо с рельефом клеточной поверхности, либо с неоднородностью ее фрикционных свойств (рисунок 3, Б).

**• А. Метод фазового контраста**

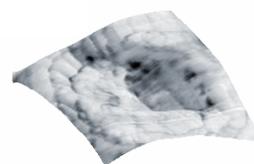


Топография



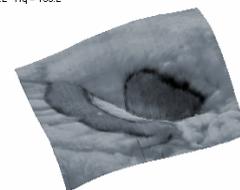
Фазовый контраст

**• Б. Метод латеральных сил**



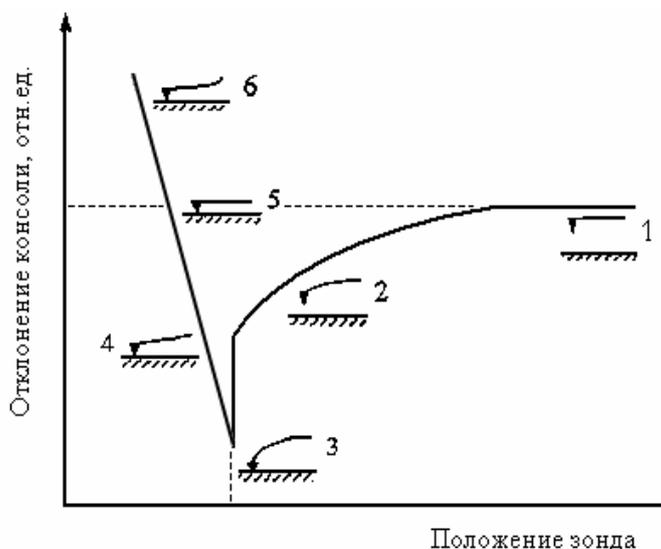
Топография

$A_s = 726.8 \text{ nm}$   
 $Ra = 128.2 \quad Rq = 195.2$



Латеральные силы

**• В. Силовая спектроскопия**



Поведение консоли в процессе подвода образца:

- 1 — игла далеко от поверхности;
- 2 — игла приближается к образцу.
- Под действием сил притяжения консоль изгибается вниз;
- 3 — игла прикасается к поверхности;
- 4 — зонд вдавливается в образец;
- 5 — под действием сил отталкивания консоль принимает горизонтальное положение;
- 6 — и затем изгибается вверх.

**Рисунок 3 — Схемы, иллюстрирующие принципы действия различных режимов АСМ (пояснения в тексте)**

Важным достоинством всех трех методов является то, что одновременно с картированием анализируется и топография клеточной поверхности.

Консоль атомно-силового микроскопа также является высокочувствительным сенсором для измерения сил, которые возникают в области контакта острия зонда и образца. Это лежит в основе **метода силовой спектроскопии**, который чаще всего используется для количественной оценки механических свойств клеточных мембран и может быть реализован в обоих режимах: как статическом, так и динамическом.

#### Метод силовой спектроскопии

В основе этого метода лежит анализ кривых «сила-расстояние».

Игла, закрепленная на краю гибкой консоли, размещается над исследуемой точкой поверхности (с точностью до 10 нм) и образец поднимается вертикально по направлению к зонду при тонком контроле шага перемещения (подвод). Затем осуществляется движение образца в обратном направлении (отвод). При реализации режима статической силовой спектроскопии регистрируется величина изгиба консоли в зависимости от положения зонда (рисунок 3, В). В случае динамической силовой спектроскопии по мере приближения осциллирующего зонда к поверхности образца амплитуда колебаний консоли уменьшается сначала за счет действия поверхностных сил, а далее — за счет упругого взаимодействия острия с образцом. Именно на этом участке функция «амплитуда-расстояние» несет информацию об упругих свойствах поверхности.

Однако для интерпретации динамики этих кривых могут использоваться различные подходы, что создает серьезные затруднения при сравнении результатов, полученных разными исследователями. В частности, в зависимости от целей, преследуемых авторами, механические свойства могут быть охарактеризованы различными механическими характеристиками, например, модулем Юнга (или эффективным модулем упругости), который рассчитывается в Па, модулем сдвига (в Дж) и др. Поэтому первой проблемой, которую приходится решать при использовании силовой спектроскопии, является выбор адекватной теоретической модели.

### Теоретические модели, используемые в силовой спектроскопии

#### Модель Герца и проблемы, связанные с ее использованием

Самой популярной является модель Герца, которая описывает простой случай линейной упругой деформации гладких поверхностей двух давящих друг на друга изотропных тел. Для расчетов упругих характеристик клеточных мембран геометрия системы «зонд-образец» моделируется как «сфера-плоскость». В большинстве случаев эта теория удовлетворительно описывает получаемые экспериментальные результаты. Однако необходимо учитывать, что она имеет ряд существенных ограничений.

Во-первых, теория предполагает, что индентор имеет параболическую форму.

Во-вторых, глубина индентирования должна быть предельно малой относительно высоты всей исследуемой клетки. Однако в современных атомно-силовых микроскопах очень часто используются сферические или конические иглы. Экспериментальным путем установлено, что модель работает и при использовании сферических игл, но при условии, если глубина индентирования не превышает величины 0,3 радиуса иглы. Для случая сферической иглы с радиусом  $R$  задача Герца приобретает следующий вид:

$$F(h) = \frac{4\sqrt{R}}{3} E^* h^{3/2},$$

где  $h$  — глубина индентирования,

$E^*$  — эффективный модуль упругости.

Для клеточных поверхностей, когда материал иглы намного жестче, чем материал образца,  $E^*$  рассчитывается из уравнения:

$$E^* \approx \frac{E_{sample}}{1 - \nu_{sample}^2},$$

где  $E_{sample}$ ,  $\nu_{sample}$  — модуль Юнга и коэффициент Пуассона исследуемой поверхности.

При работе с коническими иглами используют модификацию расчетов, предложенную Снеддоном [3].

Итак, иглы могут быть различными, но их форма должна учитываться при выборе теоретической модели.

Относительно второго ограничения следует сказать, что во многих работах, где модель Герца удовлетворительно описывает экспериментальные данные, допустимые пре-

делу глубины индентирования значительно превышаются, достигая даже несколько сотен нанометров, что сопоставимо с толщиной самой клетки. Однако эта сторона вопроса обсуждается лишь в единичных работах [4].

В-третьих, оригинальная теория Герца не допускает адгезивных взаимодействий между острием и исследуемой поверхностью, требуя соответствующих модификаций [5].

И наконец, в-четвертых, теория описывает взаимодействие тел, каждое из которых однородно по своим свойствам. То, что модель не учитывает неоднородность клеточной поверхности, является серьезной проблемой, поскольку при расчете модуля упругости в результате закладывается определенная ошибка. К сожалению, этот вопрос не поднимается ни в одной из известных нам работ.

Чаще всего модель Герца, как и ее варианты используются для расчетов величины статического модуля Юнга, но иногда с их помощью рассчитывают и динамические модули упругости для описания упругих свойств клеток [6].

Другая теоретическая модель, используемая в силовой спектроскопии, это *теория эластических оболочек* [7, 8], когда клетки рассматриваются как оболочки, заполненные жидкостью и прогибающиеся под действием силы индентора. При таком подходе модуль Юнга выводится на основе модуля изгиба, при расчете которого учитываются: кривизна оболочки, сила, приходящаяся на единицу длины периметра контактной зоны образца и иглы, радиус зоны, в которой действует прилагаемая сила, и некоторые другие характеристики. Существенным недостатком этой модели является сложность определения некоторых констант, а также четкого определения радиуса контактной зоны образца и иглы.

Для расчетов механических параметров клеточных поверхностей некоторые авторы применяют *модель конечных элементов* [9], однако она более популярна в технических областях.

С 1998 года стал развиваться новый экспериментальный подход, названный *FIEL-mapping* [10], позволяющий создавать карты относительных значений механических свойств вдоль поверхности живых клеток. FIEL-теория рассматривает простое отношение величины работы, про-

изведенной консолью прибора при индентировании клетки, к величинам модулей упругости в разных точках клеточной поверхности. Автоматическая запись кривых силы при сканировании определенных областей клетки и формирует карту упругости.

Такое разнообразие методов и теоретических моделей, с одной стороны, отражает активное развитие АСМ как нового направления, а с другой стороны, объясняет высокую вариабельность абсолютных значений клеточных модулей упругости, которые приводятся в литературе. Так, эти значения для одинаковых клеток, полученные в сходных экспериментах, но рассчитанные с использованием двух разных моделей, могут отличаться друг от друга более чем на порядок [11].

#### **Методологические факторы, влияющие на величину механических характеристик клетки**

Хорошо известно, что как разрешающая способность, так и чувствительность различных методов АСМ зависят от технических параметров самого прибора, в частности, от характеристик иглы и консоли (форма, радиус кривизны, материал) [12]. Но помимо этого значительное влияние на величину измеряемых механических характеристик оказывают и *методы подготовки клеток*, а также статус клетки, определяемый как внутренними, так и внешними факторами.

Прекрасной иллюстрацией значимости способа подготовки клеток к АСМ-анализу являются эритроциты. За последние время были исследованы и живые [13], и фиксированные эритроциты как в воздушной среде [14], так и в растворе [15]. Очевидно, что наибольшей информационной ценностью обладают результаты, полученные при исследовании живых клеток. Однако живые эритроциты являются крайне «деликатными» объектами, что затрудняет их АСМ-изучение в растворе. Нестабильность живых эритроцитов является причиной «размытых» АСМ-изображений, а максимальное разрешение в этом случае не превышает 200 нм [16]. Хорошая воспроизводимость результатов, высокое разрешение (порядка 10 нм) и особенно выявление подмембранных структур достигаются только в воздушной среде, что в свою очередь требует предварительной фиксации.

Клетки могут быть зафиксированы различными способами: химическими агентами,

высушиванием или замораживанием. К сожалению, любая из этих процедур будет в определенной мере искажать структурно-механические свойства клеточных мембран. Например, 5% раствор формалина увеличивает модуль Юнга в несколько раз по сравнению с живыми эритроцитами ( $119,5 \pm 15$  кПа — для фиксированных и  $16,05 \pm 2,3$  кПа — для живых эритроцитов) [16]. Жесткость кардиомиоцитов при такой фиксации увеличивается примерно в 16 раз [17].

Сравнив различные методы подготовки эритроцитарных теней, Такеучи с соавторами [18] делает заключение, что и сама процедура высушивания образцов на воздухе, даже после предварительной фиксации в глутаровом альдегиде, несколько искажает результаты АСМ-тестирования. С другой стороны, наноструктурное исследование таких внутриклеточных элементов, как цитоскелет становится возможным именно после фиксации [17, 19].

Наш экспериментальный опыт позволяет определить «золотую середину», которая включает мягкую фиксацию в 0,5–1% растворе глутарового альдегида и последующее высушивание при комнатной температуре.

Большинство методов АСМ требует **иммобилизации клеток на подложке**. Зачастую именно прочность закрепления образца определяет стабильность результатов и высокое разрешение. Эта проблема встает наиболее остро при работе с клеточными суспензиями в жидких средах. Для этих случаев хорошо зарекомендовал себя метод адгезии живых эритроцитов к стеклянной подложке, предварительно покрытой слоем поли-L-лизина. Он обеспечивает надежное прикрепление клеток к стеклу благодаря электростатическому взаимодействию между отрицательно заряженной поверхностью живых эритроцитов и положительно заряженной поверхностью поли-L-лизина [20]. Однако следует учитывать, что поли-L-лизин индуцирует структурную перестройку в мембране с образованием деформированных участков в области контакта клетки с подложкой [21].

Недавно был предложен новый способ закрепления клеток в специальных микрокамерах, который показал хорошие результаты при индентировании лейкозных клеток [22]. Однако использование микрокамер не только обеспечивает механическую иммобилизацию, но и уменьшает макро-

деформацию клеточной мембраны, связанную с давлением индентора. Это, в свою очередь, будет также изменять и величину модуля Юнга для закрепленных в ячейке клеток по сравнению с лейкоцитами, распластанными на подложке.

Следующая группа факторов, определяющих вариабельность значений модулей упругости в отдельных локусах клеточной поверхности, связана с высокой **пространственной неоднородностью механических свойств** каждой отдельной клетки. Вполне понятно, что такая вариабельность сама по себе представляет интересный объект исследования. Так, было установлено, что различные участки эндотелиальных клеток пупочных вен человека существенно различаются по своим упругим свойствам: модули Юнга, измеренные над ядром, в безъядерной части клетки и на ее краю составили:  $7,22 \pm 0,46$  кПа,  $2,97 \pm 0,79$  кПа и  $1,27 \pm 0,36$  кПа соответственно [23]. Центральная часть эндотелиоцитов легочной артерии быка, напротив, оказалась в 2–3 раза мягче, чем периферия клетки [24].

Картирование модулей Юнга на поверхности живых кардиомиоцитов цыпленка [19] выявило присутствие натянутых волокон с модулем упругости 100–200 кПа, которые были погружены в более мягкие участки клетки с модулем упругости от 5 до 30 кПа.

Подобные карты эластичности, полученные для живых астроцитов, показали, что клеточная поверхность над ядерной областью была мягче (2–3 кПа), чем прилегающие части, а мембрана над гребневидными структурами, определяемыми как нити F-актина, была на порядок жестче. С другой стороны, картирование локальных модулей упругости фиксированных астроцитов выявило однородность механических свойств их поверхности, не зависящую от расположения внутриклеточных структур [25].

Еще одним важным фактором является **высота клетки в точке индентирования**. Полагают, что вкладом субстрата в величину модуля можно пренебречь, если глубина индентирования не превышает 10% толщины клетки [26]. В случае если исследуемая часть клетки очень тонкая (примером могут служить ламеллоподии мигрирующих фибробластов), необходимо вносить ряд поправок в количественную оценку вязко-эластических свойств.

Таким образом, можно заключить, что существует широкий набор факторов, значительно влияющих на результаты количественных АСМ-измерений модулей упругости клеток. Поэтому эти параметры должны с осторожностью использоваться в качестве абсолютных значений. Несмотря на это, модули Юнга оказываются очень полезными и информативными в качестве сравнительных характеристик клеток, исследуемых в конкретном эксперименте. Анализ литературы убеждает [27], что многие внешние воздействия сильнее сказываются на упругих свойствах клеточных мембран, чем на морфологии клетки.

Оценка механических свойств клеточных поверхностей, а особенно комплексная оценка позволяет понять фундаментальные основы клеточной биологии, а также решить целый ряд конкретных прикладных задач биологии и медицины.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Morris, V. J.* Atomic Force Microscopy for Biologists / V. J. Morris, A. R. Kirby, A. P. Gunning. — Imperial College Press, 1999. — 332 p.
2. *Magonov, S. N.* Phase imaging a stiffness in tapping mode atomic force microscopy / S. N. Magonov, V. Elings, M. H. Whangbo // *Surf. Sci. Lett.* — 1997. — Vol. 375. — P. 385–391.
3. Gradient of Rigidity in the Lamellipodia of Migrating Cells Revealed by Atomic Force Microscopy / V. M. Laurent [et al.] // *Biophysical Journal.* — 2005. — Vol. 89. — P. 667–675.
4. Nanoindentation: Toward the sensing of atomic interactions / J. Fraxedas [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 2002. — Vol. 99. — P. 5228–5232.
5. *Johnson, K. L.* Surface energy and the contact of elastic solids / K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts // *Proceeding of the Royal Society of London.* — 1971. — Series A. — Vol. 324. — P. 301–321.
6. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy / R. E. Mahaffy [et al.] // *Biophysical Journal.* — 2004. — Vol. 86. — P. 1777–1793.
7. *Timoshenko, S. P.* Theory of Plates and Shells / S. P. Timoshenko, S. Woinowsky-Krieger. — New-York: McGraw-Hill, 1970. — 113 p.
8. Atomic force pulling: probing the local elasticity of the cell membrane / L. Scheffer [et al.] // *European Biophysics Journal.* — 2001. — Vol. 30. — P. 83–90.
9. *Gibbons, M. M.* Nonlinear finite element analysis of nanoindentation of viral capsids / M. M. Gibbons, W. S. Klug // *Biophysical Journal.* — 2006. — Vol. 90. — P. 1817–1828.
10. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy / E. A-Hassan [et al.] // *Biophysical Journal.* — 1998. — Vol. 74. — P. 1564–1578.
11. Experimental and numerical analyses of local mechanical properties measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells / T. Ohashi [et al.] // *Bio-Medical Materials and Engineering.* — 2002. — Vol. 12. — P. 319–327.
12. AFM: a versatile tool in biophysics / A. Alesandrini, P. Facci // *Measurement Science and Technology.* — 2005. — Vol. 16. — P. 65–92.
13. *Nowakowki, R.* Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy / R. Nowakowki, P. Luckham, P. Winlove // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2001. — Vol. 1514. — P. 170–176.
14. From atoms to integrated circuit chips, blood cells, and bacteria with the atomic force microscope / S.A.C. Gould [et al.] // *The Journal of Vacuum Science and Technology.* — 1990. — Vol. 8. — P. 369–373.
15. Imaging cells with the atomic force microscope / H-J. Butt [et al.] // *Journal of Structural Biology.* — 1990. — Vol. 105. — P. 54–61.
16. *Mozhanova, A. A.* Local elastic properties of biological materials studied by SFM / A. A. Mozhanova, N. I. Nurgazizov, A. A. Bukharaev // *SPM-2003: Proceedings., Nizhni Novgorod, March 2–5, 2003 / NNU.* — Nizhni Novgorod, 2003. — P. 266–267.
17. *Shroff, S. G.* Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy / S. G. Shroff, D. R. Saner, R. Lal // *American Journal of Physiology.* — 1995. — Vol. 269. — P. 286–292.
18. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy / M. Takeuchi [et al.] // *Biophysical Journal.* — 1998. — Vol. 74. — P. 2171–2183.
19. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope / U.G. Hoffmann [et al.] // *Journal of Structural Biology.* — 1997. — Vol. 119. — P. 84–91.
20. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy / I. Dulinska [et al.] // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* — 2006. — Vol. 66. — P. 1–11.
21. Adhesively-tensed cell membranes: lysis kinetics and atomic force microscopy probing / A. Hategan [et al.] // *Biophysical Journal.* — 2003. — Vol. 85, № 4. — P. 2746–2759.
22. *Rosenbluth, M. J.* Force Microscopy of Nonadherent Cells: A Comparison of Leukemia Cell Deformability / M. J. Rosenbluth, W. A. Lam, D. A. Fletcher // *Biophysical Journal.* — 2006. — Vol. 90. — P. 2994–3003.

23. Mathur, A. B. Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells / A. B. Mathur, G. A. Truskey, W. M. Reichert // *Biophysical Journal*. — 2000. — Vol. 78. — P. 1725–1735.

24. Costa, K. D. Analysis of indentation: implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy / K. D. Costa, F.C.P. Yin // *Journal of Biomechanical Engineering*. — 1999. — Vol. 121. — P. 462–471.

25. Quantitative analyses of topography and elasticity of living and fixed astrocytes / Y. Yamane [et al.] //

*Journal of Electron Microscopy (Tokyo)*. — 2000. — Vol. 49, № 3. — P. 463–471.

26. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy / A. B. Mathur [et al.] // *Journal of Biomechanics*. — 2001. — Vol. 34. — P. 1545–1553.

27. You, H. X. Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects / H. X. You, L. Yu // *Methods Cell Sci*. — 1999. — Vol. 21, № 1. — P. 1–17.

*Поступила 15.05.2007*

УДК 576.3/7:616-076

## АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

И. А. Никитина, М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков

Гомельский государственный медицинский университет

С помощью методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучены поверхностные слои лимфоцитов периферической крови человека, адгезированных на стеклянной подложке и фиксированных 1% глутаровым альдегидом. Выявлены качественные и количественные различия в тонкой структурной организации мембраны и подмембранных областей малых и средних лимфоцитов. Для оценки количественных различий структур был использован фрактальный анализ АСМ изображений.

Ключевые слова: лимфоциты, атомно-силовая микроскопия, фрактальный анализ.

## ANALYSIS OF PECULIARITIES OF HUMAN LYMPHOCYTE SURFACE STRUCTURE BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

I. A. Nikitina, M. N. Starodubtseva, T. G. Kuznetsova, N. I. Yegorenkov

Gomel State Medical University

Surface layers of peripheral blood lymphocytes which were adhered on glass plate and fixed with 1% glutaraldehyde were examined with atomic force microscopy methods. Qualitative and quantitative differences in fine structural organization of membrane and underlying layers of small and middle lymphocytes were revealed. Fractal analysis was used for quantitative evaluation of the structure differences.

Key words: lymphocytes, atomic force microscopy method, fractal analysis.

### **Введение**

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет изучать структуру и механические свойства мембран и подмембранных слоев клеток с высоким пространственным разрешением (нанометровым разрешением). Ранее нами были с успехом применены методы АСМ к изучению особенностей изменения мембранных структур эритро-

цитов человека при действии активных форм азота [1]. Целью данной работы являлось выявление АСМ методами особенностей структуры мембран и подмембранных слоев различных типов лимфоцитов периферической крови человека.

### **Материалы и методы**

*Выделение лимфоцитов.* Лимфоциты выделялись из периферической крови здоро-