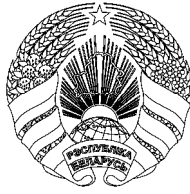


ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 20077

(13) С1

(46) 2016.04.30

(51) МПК

A 61B 5/00 (2006.01)

(54)

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК

(21) Номер заявки: а 20121035

(22) 2012.07.11

(43) 2014.02.28

(71) Заявители: Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет"; Общество с дополнительной ответственностью "Микротестмашины" (ВУ)

(72) Авторы: Стародубцева Мария Николаевна; Егоренков Николай Иванович; Суслов Андрей Анатольевич; Грицук Александр Иванович; Никитина Ирина Александровна (ВУ)

(73) Патентообладатели: Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет"; Общество с дополнительной ответственностью "Микротестмашины" (ВУ)

(56) ВУ 12868 С1, 2010.

RU 2450790 С2, 2012.

RU 2437937 С1, 2011.

JPH 0523350 А, 1993.

US 6357285 В1, 2002.

АЛЕЙНИК Д.Я. и др. Вестник новых медицинских технологий. - 2006. - Т. XIII. - № 3б. - С. 98-99.

ДРОЗД Е.С. и др. Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии: Сб. докл. VIII Международного семинара 2008. - С. 114-118.

(57)

1. Способ определения патологии биологических клеток, в котором заданный участок поверхности химически нефиксированных клеток сканируют при постоянной температуре поочередно в двух противоположных направлениях вдоль заданной линии зондом атомно-силового микроскопа, измеряют два средних значения воздействующих на зонд латеральных сил соответственно при прямом и обратном направлении сканирования и определяют полуразность указанных средних значений, повторяют сканирование при других температурах, строят температурную зависимость указанной полуразности, а затем констатируют патологию исследуемых клеток по наличию на температурной зависимости заметных изменений в сравнении с такой же зависимостью, построенной ранее для таких же эталонных здоровых клеток.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что записывают карты латеральных сил, которые включают заданное количество линий сканирования, определяют полуразность средних значений латеральных сил для всех линий сканирования каждой карты латеральных сил и анализируют их температурные зависимости аналогичным образом.

Изобретение относится к технике изучения свойств биологических клеток методом атомно-силовой микроскопии - сканирующей зондовой микроскопии, с помощью которой определяется структурно-механическое состояние поверхностного слоя клеток, которое

сопоставляется с нормой, что позволяет делать вывод о наличии или отсутствии патологии клеток.

Существуют разнообразные способы микроскопических исследований структуры и свойств поверхности клеток: световая микроскопия, включая ее специальные способы (темнопольная, фазово-контрастная, поляризационная, ультрафиолетовая, флуоресцентная или люминесцентная, иммунофлуоресцентная и др.); электронная микроскопия, включая ее специальные методы (трансмиссионная, сканирующая и др.); зондовая или атомно-силовая микроскопия, включая ее специальные методы (контактный режим, динамический режим, силовая спектроскопия и др.).

В настоящее время для изучения структуры и свойств поверхности тел получает распространение атомно-силовая микроскопия (АСМ). В отличие от световой и электронной микроскопии АСМ позволяет оценивать не только микротопографию поверхности, то есть ее геометрические характеристики, но и механические свойства поверхностного слоя и, следовательно, его структурно-механические свойства, так как осуществляется микро- и наноэластография исследуемой поверхности. Атомно-силовые микроскопы производятся во многих странах мира, в том числе в Республике Беларусь.

АСМ-метод уже используется для изучения свойств биологических клеток и тканей, включая клетки и ткани растений, животных и человека [1, 2]. Принцип работы АСМ основан на взаимодействии сканирующего зонда, представляющего собой острие, размещенное на свободном конце жестко закрепленной гибкой консоли, и поверхности образца. Управляющая система прибора следит за отклонением консоли зонда относительно поверхности образца в каждой измеряемой точке и поддерживает расстояние "острие зонда - образец" на постоянном заданном уровне. Изменения вертикальных и горизонтальных отклонений острия зонда в каждой точке от первоначального положения, вызванные как микрорельефом поверхности, так и микронеоднородностью механических свойств поверхностного слоя материала образца при перемещении по нему зонда, образуют матрицы (карты) АСМ-данных, которые записываются в файл и используются в дальнейшем для обработки, визуализации и анализа. Для анализа структурно-механических свойств поверхности образцов, включая биологические клетки, в контактном режиме сканирования используются в основном карты вертикальных (опция "топография") и горизонтальных - торсионных, латеральных, то есть боковых (опция "кручение"), отклонений зонда микроскопа - эластографические карты (эластотопография). Большим достоинством АСМ-метода является возможность использования для характеристики исследуемого объекта эластотопографии не только для описания микрорельефа поверхности, но и как микронеоднородности механических (фрикционных) свойств его поверхностного слоя.

АСМ-метод сочетает простую и предельно щадящую процедуру подготовки биологических клеток, возможность проводить исследования в обычных условиях (на воздухе, в жидкой, включая физиологическую, среде), относительно высокое (нанометровое) разрешение, возможность одновременной оценки топографических и механических параметров исследуемых объектов.

Известен способ АСМ-диагностики патологии соединительной ткани (компактной кости), содержащей коллаген (дентин, кость, сухожилие, кожа), основанный на сравнительном анализе морфологических характеристик коллагена (среднее выборочное расстояние между фибриллами и его распределение) образцов ткани (исходные волокна и контрольные), полученных с помощью опции "топография" [3].

Известен способ АСМ-диагностики патологии клеток человека (например, при раковых заболеваниях), основанный на анализе их наномеханических характеристик, полученных с помощью опции "силовая спектроскопия" (среднее выборочное значение модуля Юнга и адгезивности клеток), включая сравнительный анализ статистического распределения исходных и контрольных значений [4].

Известен способ АСМ-диагностики раковых клеток с помощью атомно-силовой микроскопии, включающий фиксацию структуры клеток с помощью химических агентов, сканирование с использованием различных опций АСМ, анализ данных с помощью специально разработанного алгоритма, который позволяет идентифицировать, являются ли клетки раковыми или нормальными [5].

Известен способ определения характеристик биологических клеток, включающий АСМ-исследование, основанный на анализе свойств мембраны клеток путем фиксации значений вертикальных и горизонтальных (латеральных) сил при движении зонда по их поверхности [6].

Известен способ исследования нативных клеток с помощью АСМ, при котором осуществляют забор крови, проводят приготовление образцов крови, сканирование клеток в режиме полуконтактной атомно-силовой микроскопии и проводят измерение геометрических параметров клеток. При этом образец готовят из суспензии нативных клеток путем нанесения капли на чистое обезжиренное предметное стекло, помещают образец во влажную камеру, насыщенную парами воды, закрытую мембраной, и проводят сканирование в парах воды в полуконтактном режиме, используя кантилевер серии NSG 03 с жесткостью 0,4 Н/м, длиной балки 100 мкм и резонансной частотой в пределах 62-123 КHz [7].

Известны также другие способы АСМ-диагностики биологических клеток и их компонентов: анализ текстуры клеток [8], анализ зрелости (жесткости) коллагеновых волокон [9], анализ клеток злокачественных новообразований, использующий измерение вертикальных размеров клеточных элементов [10] и др.

Наиболее близким к предлагаемому способу является способ АСМ-исследования состояния мембранного скелета эритроцитов, включающий изучение с помощью карт латеральных сил неоднородности механических свойств поверхностного слоя клеток (прототип) [11]. Сущность известного способа заключается в том, что перед АСМ-исследованием закрепленные на подложке эритроциты высушивают на воздухе при комнатной или физиологической температуре, АСМ-сканирование проводят в контактном (статическом) режиме. При этом карты латеральных сил дополнительно контрастируют стандартными фильтрами изображений, а для количественной оценки сложности структуры цитоскелета применяют фрактальный анализ карт латеральных сил. Способ использует серийно выпускаемое оборудование - атомно-силовой микроскоп, имеющий контактный режим сканирования.

Недостатком описываемого известного способа (прототипа) является его ограниченность - использование для изучения цитоскелета одной из множества клеток крови - эритроцитов. При этом для количественной характеристики структуры из параметров карт латеральных сил, получаемых при прямом однократном сканировании участка поверхности, используется только фрактальная размерность.

Прямое однократное сканирование характерно и для других вышеописанных способов АСМ-диагностики патологий биологических клеток, в том числе с помощью латеральных сил.

Задача, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, заключается в расширении возможностей и повышении точности способа АСМ-диагностики нормы и патологии биологических клеток с помощью латеральных (фрикционных) сил.

Задача решается за счет того, что используют химически нефиксированные клетки, сканируют при постоянной температуре участок поверхности клеток в двух противоположных по линии сканирования направлениях, рассчитывают средние значения латеральных сил соответственно при прямом и обратном направлениях сканирования, определяют значение полуразности этих средних значений и констатируют патологию по наличию отклонений полученного значения полуразности от значения для эталонных здоровых клеток. Для повышения точности диагностики осуществляют сканирование при других значениях температур, строят температурную зависимость значений полуразности, а за-

тем констатируют патологию исследуемых клеток по наличию на температурной зависимости заметных изменений в сравнении с такой же зависимостью, построенной ранее для эталонных здоровых клеток. Для еще большего повышения точности диагностики записывают включающую заданное количество линий сканирования карту латеральных сил участка клеток при прямом и обратном направлениях его сканирования при постоянных температурах, определяют полуразность средних значений латеральных сил для карт, проводят сравнительный анализ полуразностей для карт латеральных сил, полученных при постоянной температуре, а также их температурных зависимостей для исследуемых и эталонных здоровых клеток.

Обоснование и примеры осуществления предлагаемого способа были выполнены нами при анализе контрольных (норма) и химически модифицированных (патология) двух видов биологических клеток, имеющих разные типы подмембранного (кортикального) цитоскелета (эритроцитов человека - двумерная спектрин-актиновая структура, тимоцитов крысы - трехмерная актиновая структура). Измерения вертикальных и латеральных сил поверхности образцов производили на атомно-силовом микроскопе марки NT-206 производства фирмы "Микротестмашины" (Республика Беларусь), укомплектованном термоплатформой ТТ-1 с автономным контроллером (максимальная температура нагрева + 150 °С; точность измерений температуры - 0,1 °С). Использовались консоли-зонды CSC38 (уровень В, средний коэффициент упругости 0,03 Н/м). После сканирования участков поверхности образцов анализировали гистограммы распределения латеральных сил (или высот) на этих участках. Радиус острия зонда определялся по стандартной силиконовой решетке TGT01 (NT-MDT, Россия) и составлял от 10 до 30 нм, скорость сканирования от 0,2 до 0,5 Гц, нагрузка на консоль варьировалась в зависимости от типа клеток в диапазоне от 1,2 до 3,6 нН. Для анализа использовали следующие статистические параметры: среднее значение латеральных сил (или высот) на участке и разброс значений вокруг среднего значения (среднеквадратическое отклонение).

Поверхностный слой отдельной клетки, исследование структурно-механических свойств которого осуществимо с помощью АСМ, представляет собой композиционный материал, состоящий из трех основных слоев - слоя гликокаликса, плазматической мембраны (липидный бислой с белками или белковыми комплексами) и слоя цитоплазмы, содержащего кортикальный цитоскелет. При патологических процессах, имеющих место в клетке, структура и механические свойства всех выделенных подслоев поверхностного слоя клетки претерпевают различной степени изменения.

Прежде всего, было экспериментально подтверждено, что при температурных исследованиях клеток с помощью АСМ основное влияние на получаемые значения латеральных сил оказывают объемные свойства поверхностного слоя, а не микрорельеф поверхности, а также экспериментально подтверждена возможность характеристики объемных свойств поверхностного слоя клеток с помощью средних значений сил трения между острием АСМ-зонда и поверхностью исследуемой клетки, полученных как полуразность их значений при прямом и обратном сканировании исследуемых участков клетки. Исследования были выполнены на эритроцитах человека и тимоцитах крысы. Тимоциты были изъяты из тимуса 3-месячных крыс и ресуспендированы в фосфатном буфере (рН 7,4). Эритроциты выделены из периферической крови здоровых добровольцев и обработаны пероксинитритом в концентрации 700 мкМ. Суспензии клеток помещали на стеклянные обезжиренные пластинки в виде клеточного монослоя. Образцы тимоцитов инкубировали 60 мин при комнатной температуре во влажной камере. Образцы клеток были высушены на воздухе при комнатной температуре. Размеры области сканирования составляли: для тимоцитов - $3,0 \times 3,0$ мкм, для эритроцитов - $1,5 \times 1,5$ мкм, скорость сканирования - 0,3 Hz, скорость нагрева - около 0,5 К в минуту. Проводили 3-7 сканирований различных отдельных клеток при каждой температуре. Исследования проводили в диапазоне температур 298-363 К. Для образцов эритроцитов было осуществлено сканирование

при разных температурах в ходе последовательных операций нагрева и охлаждения образца. Установлено, что с увеличением температуры испытаний фиксируемые регистрирующей системой прибора значения латеральных сил при прямом проходе (Z_1) увеличиваются, а при обратном проходе (Z_2) уменьшаются. Их полусумма ($1/2|Z_1 + Z_2|$) практически не зависит от температуры испытаний во всем исследованном интервале температур (фиг. 1, а). С другой стороны, при изменении температуры испытаний (нагрев или последовательные нагрев и охлаждение клеток) латеральные отклонения зонда прибора, характеризующие силы трения между поверхностями острия АСМ-зонда и клетки ($F_{тр} = 1/2|Z_1 - Z_2|$), изменяются существенно, а его вертикальные отклонения ($1/2|h_1 + h_2|$), характеризующие микрорельеф (топографию) поверхности клетки, практически не зависят от температуры испытаний (фиг. 1, б, в, г). Это свидетельствует о том, что топография (микрорельеф) поверхности клетки не вносит заметного вклада в латеральные силы при АСМ-сканировании. В то же время при увеличении температуры испытаний сила трения ($F_{тр}$) практически не изменяется лишь до определенной температуры (T_g), а затем увеличивается (фиг. 1, б). Аналогичный характер имеет температурная зависимость силы трения сферического индентора по поверхности линейных и сетчатых аморфных высокомолекулярных соединений (например, по поливинилбутиралу, эпоксидным смолам) при переходе через их температуру стеклования [12]. Это свидетельствует о том, что значения латеральных сил клеток при АСМ-сканировании определяются объемными свойствами поверхностного слоя, и показывает также, что полуразность значений латеральных сил (сила трения) при исследованиях биологических клеток можно использовать для характеристики объемных свойств их поверхностного слоя, которые определяются, в основном, свойствами кортикального цитоскелета клеток [2].

На фиг. 1 представлены температурные зависимости АСМ-параметров для образцов тимоцитов (а, б) и эритроцитов (в, г). Зависимости на фиг. 1 (а, б) получены при однократном нагреве образцов клеток, зависимости на фиг. 1 (в, г) получены при последовательном нагреве и охлаждении образцов клеток. Изображены зависимости для следующих АСМ-параметров: (а) полусумма средних значений латеральных сил ($1/2|Z_1 + Z_2|$), (б, г) сила трения, оцененная как полуразность средних значений латеральных сил ($F_{тр} = 1/2|Z_1 - Z_2|$), (в) среднее значение вертикальных отклонений АСМ-зонда (топография, $1/2|h_1 + h_2|$) при прямом и обратном сканировании исследуемых участков клетки. Z_1 и Z_2 - фиксируемые регистрирующей системой прибора значения латеральных сил при прямом и обратном проходах соответственно, h_1 и h_2 - полученные значения топографии при прямом и обратном проходах соответственно. Данные представлены в виде среднего значения параметра и его среднеквадратического отклонения ($M \pm \sigma$). Индексы "н" и "о" при значениях температуры на фиг. (в, г) означают нагрев и охлаждение соответственно.

На фиг. 2 представлены температурные зависимости силы трения ($F_{тр} = 1/2|Z_1 - Z_2|$) для образцов эритроцитов. Z_1 и Z_2 - фиксируемые регистрирующей системой прибора значения латеральных сил при прямом и обратном проходах соответственно. Данные представлены в виде среднего значения параметра и его среднеквадратического отклонения ($M \pm \sigma$). Зависимости силы трения получены для контрольных эритроцитов (а), эталонный образец, и эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом (1 % раствор глутарового альдегида; фосфатный буфер, рН 7,4; 30 мин) в суспензии до приготовления образцов для АСМ (б), опытный образец.

На фиг. 3 представлены температурные зависимости силы трения ($F_{тр} = 1/2|Z_1 - Z_2|$) для образцов тимоцитов. Z_1 и Z_2 - фиксируемые регистрирующей системой прибора значения латеральных сил при прямом и обратном проходах соответственно. Данные представлены в виде среднего значения параметра и его среднеквадратического отклонения ($M \pm \sigma$). Зависимости силы трения получены для тимоцитов, обработанных глутаровым альдегидом (а) (1 % раствор глутарового альдегида; фосфатный буфер, рН 7,4; 30 мин) или пероксинитритом (б) (30 мкМ пероксинитрита; фосфатный буфер, рН 7,4; 10 мин) в

суспензии до приготовления образцов для АСМ. Температурная зависимость силы трения для эталонного образца тимоцитов представлена на фиг. 1, б.

Примеры осуществления способа.

Пример 1.

АСМ-анализ патологических изменений эритроцитов человека, обусловленных обработкой их глутаровым альдегидом.

Глутаровый альдегид широко используется в гистологии как эффективный сшивающий клеточные биомолекулы, включая молекулы цитоскелета, агент. Эритроциты были обработаны глутаровым альдегидом (1 % раствор глутарового альдегида; фосфатный буфер, рН 7,4; 30 мин) в суспензии, затем отмыты дистиллированной водой. С целью подготовки клеток для АСМ-сканирования капли суспензии эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом (опытный образец), или цельной крови (контрольные эритроциты - эталонный образец) помещали на обезжиренные стеклянные пластинки в виде клеточного монослоя. Затем образцы высушивались на воздухе при комнатной температуре. Исследования проводили в диапазоне температур 313-343 К. Размеры области сканирования составляли $1,5 \times 1,5$ мкм, скорость сканирования - 0,3 Hz, скорость нагрева - около 0,5 К в минуту. Проводили 3-7 сканирований различных отдельных эритроцитов при каждой температуре. Обработка эритроцитов глутаровым альдегидом существенно влияла на абсолютные значения сил трения и их зависимость от температуры (фиг. 2, а, б). После обработки эритроцитов глутаровым альдегидом практически полностью теряется ярко выраженная зависимость сил трения от температуры (фиг. 2, б). В наибольшей степени этот эффект проявляется при температурах, превышающих физиологические температуры на 10-30 К.

Пример 2.

АСМ-анализ патологических изменений тимоцитов, обусловленных обработкой их глутаровым альдегидом и пероксинитритом.

Тимоциты были обработаны глутаровым альдегидом, а также синтетическим пероксинитритом.

Пероксинитрит вырабатывается многими клетками живых организмов. Пероксинитрит изменяет химический состав и структуру клеточных мембран и цитоскелета. Пероксинитрит в малых концентрациях является агентом, стимулирующим перестройку актинового цитоскелета.

Обработку тимоцитов пероксинитритом (30 мкМ) проводили в суспензии клеток (10 мин). Обработку тимоцитов глутаровым альдегидом осуществляли по методике, описанной в примере 1.

Капли обработанной химическими агентами суспензии тимоцитов наносили на обезжиренные стеклянные пластинки. Полученные образцы выдерживали во влажной камере 60 мин, а затем высушивали на воздухе при комнатной температуре.

АСМ-исследование клеток проводили в диапазоне температур 303-363 К, скорость нагрева до исследуемой температуры составляла около 0,5 К в минуту. Размеры области сканирования составляли $3,0 \times 3,0$ мкм, скорость сканирования - 0,3 Hz. Осуществляли 3-7 сканирований различных отдельных клеток при каждой температуре.

Обработка тимоцитов глутаровым альдегидом (фиг. 3, а) и пероксинитритом (фиг. 3, б) существенно влияет на значения сил трения (фиг. 3, а, б). Этот эффект наиболее выражен при температурах, превышающих физиологические температуры на 20-50 К.

Таким образом, в предлагаемом способе диагностики состояния нормы или патологии биологических клеток с помощью АСМ используются, во-первых, нефиксированные клетки; во-вторых, исследуется не состояние топографии (микрорельефа) их поверхности, как это обычно практикуется, а латеральные силы клетки (силы трения между острием АСМ-зонда и поверхностью клетки при ее сканировании), значения которых определяются свойствами подмембранного (кортикального) цитоскелета; в-третьих, учитываются

значения латеральных сил при прямом и обратном проходах зонда при сканировании; в-четвертых, диагностирование осуществляется по средним значениям этих сил; в-пятых, используются результаты, полученные в диапазоне температур (минимум при двух температурах). Использование значений латеральных сил при прямом и обратном проходах при АСМ-сканировании позволяет расширить базу опытных данных, исключить вклад микро-рельефа в значения латеральных сил и оценивать норму и патологию клеток по свойствам поверхностного слоя, определяемых свойствами цитоскелета, то есть увеличить точность диагностики. Этому способствует также использование умеренно повышенных температур испытаний - превышающих физиологические температуры на 10-50 К. Используя мазки, получаемые и хранящиеся в обычных условиях, предлагаемый способ позволяет упростить препарирование клеток для АСМ-исследования. Он может быть использован для диагностики различного рода заболеваний живых организмов как многоклеточных систем, так как практически все заболевания вызывают патологические изменения в биологических клетках.

Источники информации:

1. Starodubtseva M. et al. Study of the mechanical properties of single cells as biocomposites by atomic force microscopy // *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education in 3 Vol.* - Vol. 1. / Eds. AO.Mendez-Vilas, J.D.Alvarez-Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010. - P. 470-477.

2. Стародубцева М.Н., Егоренков Н.И. Анализ релаксационных состояний полимеров и биополимеров на основе карт латеральных сил, получаемых методом атомно-силовой микроскопии // *Вестник Фонда фундаментальных исследований.* - 2010. - № 4. - С. 51-57.

3. Патент США 20110189716 А1, МПК С 12Q 1/02, 2011.

4. Патент США 20110070604 А1, МПК С 12Q 1/02, 2011.

5. Патент США 2011/0182494 А1, МПК G 06K 9/00, 2011.

6. Патент США 2005/0239047 А1, МПК С 12Q 1/00, 2005.

7. Патент Российской Федерации на изобретение 2398234 С1, МПК G 01N 33/49, 2010.

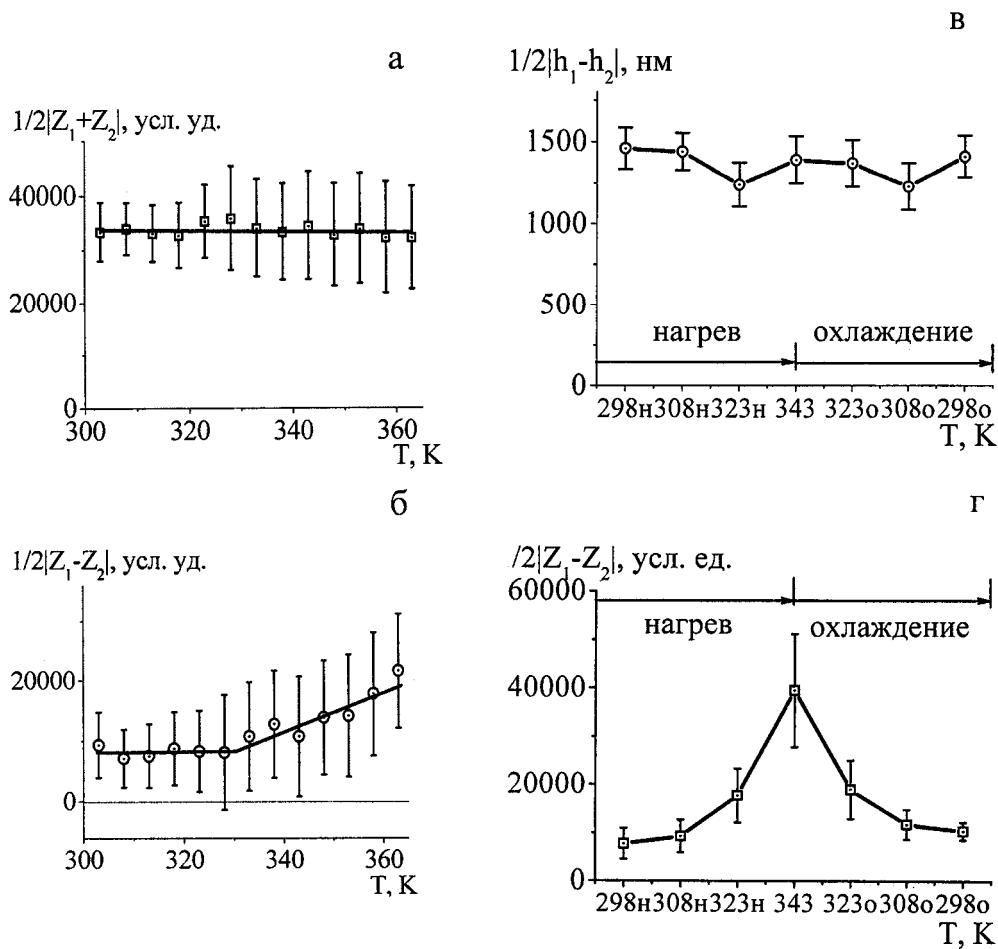
8. Патент Российской Федерации на изобретение 2385494 С1, 2010.

9. Заявка РФ на изобретение 2009118749/15, МПК G 01N 33/15, 2010.

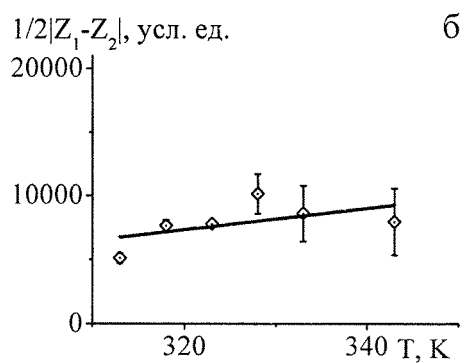
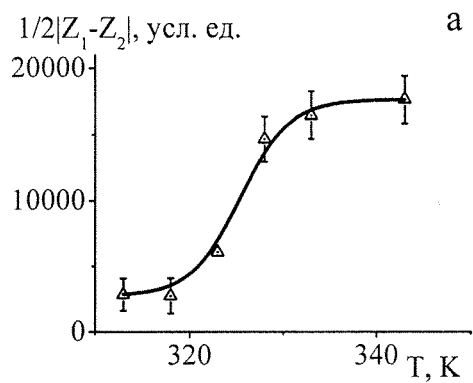
10. Заявка Российской Федерации на изобретение 2010/118747/14, МПК А 61В 5/00. - Заявл. 12.05.2010; опубл. 27.11.2011.

11. Патент РБ на изобретение 12868 С2, МПК 2009 G 01 N 13/10, 2009.

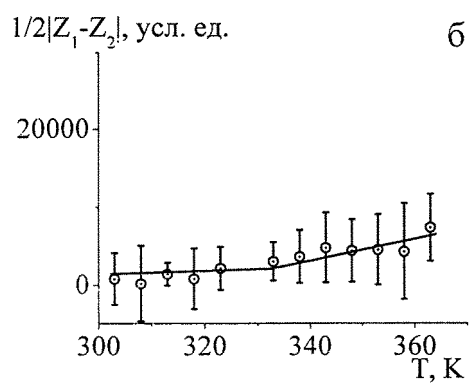
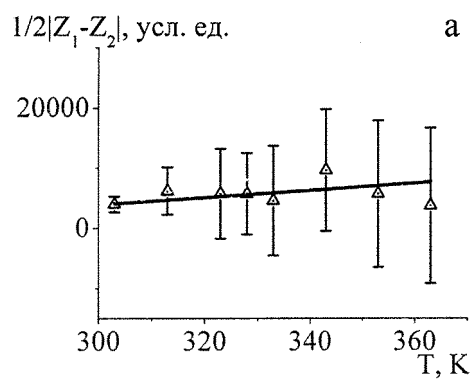
12. Егоренков Н.И. Закономерности изменения адгезионных, фрикционных и физико-химических свойств полимерных пленок на металлах при термических воздействиях: Автореф. дис. ... докт. хим. наук: 01.04.19. Институт химии высокомолекулярных соединений АН УССР. - Киев, 1986. - 32 с.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3