

сии маркеров, входящих в стандартную панель ИГХ-исследования (Er, Pg, Ki-67, HER2).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей / Ю. Ю. Андреева [и др.]; под ред. Г. А. Франк, Л. Э. Завалишиной, К. М. Пожарисского. — М.: Практическая медицина, 2014. — 176 с.

2. Оценка скорости и полноты фиксации биопсийного материала добавлением в формалин пищевого красителя / А. Ю. Крылов [и др.] // Журнал «Судебная экспертиза Беларуси». — 2017. — № 1 (4). — С. 52–54.

3. Оценка скорости и качества фиксации биопсийного материала при раке молочной железы / А. Ю. Крылов [и др.] // Охрана материнства и детства». — 2016. — № 2(28). — С. 13–15.

Поступила 09.10.2017

УДК 618.19-006.6:53.086

ПАРАМЕТРЫ АРХИТЕКТониКИ АСМ-КАРТ ПОВЕРХНОСТИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7

М. Н. Стародубцева

Гомельский государственный медицинский университет
Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель

В связи с расширением использования атомно-силовой микроскопии (АСМ) в медико-биологической науке актуальным становится нахождение параметров, количественно характеризующих распределение значений различных свойств поверхности клеток на наномасштабном уровне. Целью исследования являлось выявление особенностей поведения параметров шероховатости (R_q) и фрактальной размерности (D_F), оцененных для АСМ-изображений поверхности фиксированных глутаровым альдегидом эпителиальных клеток карциномы молочной железы MCF-7 при изменении разрешения изображения, размеров области сканирования и участков поверхности клеток. Показано, что величина D_F АСМ-карт ограничена минимально достижимым шагом сканирования. Совместный анализ R_q и D_F АСМ-изображений выявил различие возможностей этих параметров и преимущество использования параметра зависимости D_F от коэффициента масштабирования по оси Z ($D_F = f(t)$) для характеристики тонкой структуры распределения значений локальных параметров карт топографии и механических свойств по поверхности клетки. Применяя зависимость $D_F = f(t)$ к АСМ-изображениям, можно количественно охарактеризовать различные по структурным свойствам части клетки (лидирующий край, центр с ядром и переходная область).

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, клетки карциномы молочной железы MCF-7, шероховатость, фрактальная размерность.

THE ARCHITECTONICS PARAMETERS OF AFM MAPS OF THE EPITHELIAL CELL SURFACE OF MCF-7 BREAST CARCINOMA

M. N. Starodubtseva

Gomel State Medical University,
Institute of Radiobiology of NAS of Belarus, Gomel

Due to the wide application of atomic force microscopy (AFM) in medical and biological sciences, the finding of parameters qualitatively characterizing the distribution of the values of various cell surface properties at the nanoscale level is becoming topical. The aim of the study was to reveal the features of the behavior of the parameters of roughness (R_q) and fractal dimension (D_F) assessed for AFM images of the surface of glutaraldehyde-fixed breast carcinoma cells (MCF-7 cells) with changing of the image resolution, the scanning area size, and the regions of the cells. It has been proved that the value of D_F for AFM images is limited by the minimal achieved scanning step. The mutual analysis of R_q and D_F of AFM images has revealed some difference in the prospects of these parameters and the advantage of the application of the parameter $D_F = f(t)$ (dependence of the fractal dimension on the scale coefficient along the axis Z) to characterize the fine structure of the spatial distribution of the local topographic parameters and parameters of mechanical properties on the cell surface. The application of the dependence of the parameter $D_F = f(t)$ on AFM images, makes it possible to quantitatively characterize the different cell regions (the leading edge, central area over the nucleus, transitional (middle) area).

Key words: atomic force microscopy, MCF-7 breast carcinoma cells, roughness, fractal dimension.

Введение

В связи со стремительным развитием исследований клеток и клеточных структур на наномасштабном уровне, ускоренным, в свою очередь, созданием атомно-силовой микроскопии, актуальным в медико-биологической науке становится нахождение параметров, ко-

личественно характеризующих распределение значений различных свойств поверхности клеток на исследуемых участках [1]. Атомно-силовая микроскопия позволяет получать трехмерные карты не только рельефа участка натуральной поверхности, то есть характеристику его неровностей в вертикальном и горизонтальном

направлениях (этот режим работы прибора обычно именуется «топография»), но и трёхмерные карты распределения значений физико-механических свойств (например, упругих, фрикционных, адгезионных и др.). Среди параметров, используемых при анализе данных о свойствах трёхмерных карт поверхности, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии, наиболее широко распространёнными являются шероховатость и фрактальная размерность [2–5]. Шероховатость является усреднённой характеристикой отклонений профиля от среднего значения на заданном участке поверхности, например, среднее арифметическое отклонение профиля (R_a), среднее квадратическое отклонение профиля (R_q) и др. [2]. Фрактальная размерность (D_F) поверхности в трёхмерном пространстве даёт численную оценку степени заполнения этого пространства поверхностью [3, 4]. Так как топологическая (целочисленная) размерность плоскости 2, а куба — 3, то фрактальная (дробная) размерность поверхности лежит в пределах от 2 до 3.

Цель исследования

Выявить особенности поведения параметров шероховатости R_q и фрактальной размерности D_F , оценённых для изображений (трёхмерных карт) поверхности эпителиальных клеток карциномы молочной железы MCF-7, полученных с помощью атомно-силового микроскопа, при изменении разрешения изображения, размеров области сканирования и участков поверхности клеток.

Материалы и методы

В работе использована культура эпителиальных клеток карциномы молочной железы (MCF-7). Для приготовления образцов клеток для АСМ-исследования на специально подготовленные стеклянные пластины, помещённые в чашки Петри, вносили суспензию клеток в питательной среде и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С и 5 % CO_2 , затем клетки фиксировали в 0,5 % солевом буферном растворе глутарового альдегида (15 мин), трижды отмывали препараты клеток деионизированной водой и высушивали в вертикально-наклонном положении (75–85°) в ламинарном потоке воздуха (0,42 м/с) при комнатной температуре [5]. АСМ-исследования клеток проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашины», Беларусь) в контактном режиме сканирования с использованием иглзондов CSC38 («MikroMasch», Эстония): уровень В, коэффициент жесткости 0,01–0,08 Н/м. Сканирование проводили при температурах 22 ± 5 °С и влажности 55 ± 10 % на воздухе. Термостатирование образцов клеток во время АСМ-сканирования осуществляли с помощью термоплатформы ТТ-01. Использовали режимы

работы прибора «топография» и «латеральные силы». Обработку АСМ-данных, включая расчет шероховатости, осуществляли с помощью программы «SurfaceExplore 1.3.11» («МикроТестМашины», Беларусь). Расчет фрактальной размерности проводили с помощью разработанного нами программного комплекса, основанного на методе подсчета кубов. Оценку среднего значения фрактальной размерности для участка поверхности клетки осуществляли с помощью разбиения участка на 9 или 4 квадратных участков одинаковой площади, оценки значения фрактальной размерности для каждого из участков и расчета среднего значения и границ 95 % доверительного интервала для целой выборки. Зависимость D_F от коэффициента масштабирования t по оси Z ($D_F = f(t)$), которая описывает структурные свойства поверхности лучше, чем единичное значение D_F , строили на основе массива дополнительно созданных цифровых поверхностей, полученных с помощью умножения данных реального АСМ-изображения на коэффициент t , изменяемый в широком диапазоне (от 0,0001 до 22027 с шагом $e = 2,71828$) [3].

Результаты и их обсуждение

Влияние разрешения АСМ-изображения на значения шероховатости и фрактальной размерности. Ранее было показано, что фрактальная размерность АСМ-изображений зависит от коэффициента масштабирования по оси Z . Эта зависимость описывается кривой с несколькими максимумами в области значений фрактальной размерности от 2 до 3. Соотношение и положение этих максимумов являются уникальной характеристикой изображения, отражающей особенность строения изучаемой поверхности. Однако как характеристика цифрового изображения она зависит от количества пикселей этого изображения и, следовательно - от разрешения. На рисунке 1 (а) представлены кривые $D_F = f(t)$ для карт латеральных сил (карты, описывающие распределение механических свойств по поверхности) одного и того же участка поверхности клетки MCF-7, записанные с разным разрешением.

На рисунке 1 (в и г) представлены карты латеральных сил для участка клеточной поверхности с разрешением 64 × 64 пикселей и 500 × 500 пикселей. Фрактальная размерность карт латеральных сил возрастает с увеличением разрешения. Но с увеличением разрешения уменьшается шаг сканирования, что при увеличении количества точек на единицу длины сканирования ($l = 2500$ нм) до $N = 250$ приводит к достижению шага сканирования в 10 нм, сравнимого с радиусом кривизны используемого зонда. Дальнейшее уменьшение шага сканирования существенно не изменяет достигнутого значения фрактальной размерности изображе-

ния (рисунок 1 (б)). При этом для шероховатости карт латеральных сил участка поверхности клет-

ки какой-либо зависимости от разрешения изображения не наблюдается (рисунок 1 (д)).

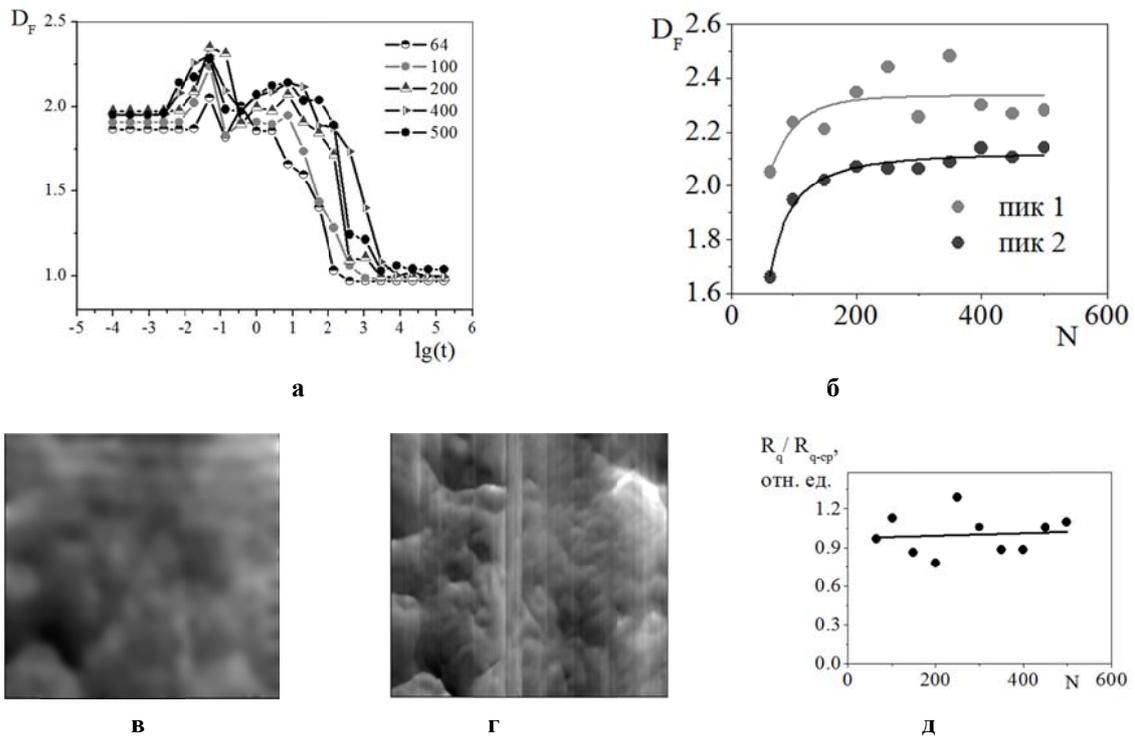


Рисунок 1 — Зависимость фрактальной размерности (D_F) и шероховатости (R_q) АСМ-изображений (карт латеральных сил) поверхности клетки MCF-7 от разрешения ($N \times N$): а — зависимости $D_F = f(t)$ для изображений с разным разрешением (от 64×64 пикселей до 500×500 пикселей); б — зависимости значений максимумов кривой $D_F = f(t)$ от разрешения изображения; д — зависимость шероховатости карт латеральных сил от разрешения изображения. Карты латеральных сил одного участка поверхности клетки MCF-7 размером $2,5 \times 2,5$ мкм с разрешением 64×64 пикселей (в) и 500×500 пикселей (г). Фрактальная размерность оценена с использованием деления изображения на 9 квадратных участков одинаковой площади

Влияние размера области сканирования на значения шероховатости и фрактальной размерности АСМ-изображений. Клетка не является гомогенным объектом или объектом, сохраняющим свои структурные свойства на разных масштабах, то есть самоподобной структурой. На масштабах порядка нескольких десятков микрометров единичная распластанная на жесткой поверхности эпителиальная клетка является целым объектом, в то время как на участках с размером порядка одного и менее микрометра мы имеем дело с ее частью. Различные участки клетки имеют разную топографию, физико-механические и другие свойства. На рисунке 2 (и-о) видно, как изменяется структура топографических изображений поверхности клетки с изменением размеров площади сканирования. Крупные, характерные изменения рельефа поверхности на изображениях с размером $l \times l = 1 \times 1$ мкм оказываются мелкими особенностями структуры изображения с размером 6×6 мкм той же поверхности клетки (и, о). С увеличением размера участка поверхности увеличивается ше-

роховатость как топографического изображения, так и карт латеральных сил (рисунок 2 (б)). При этом шероховатость карт латеральных сил является более чувствительной к изменению размера участка поверхности клетки характеристикой в сравнении с шероховатостью топографических изображений. Фрактальная размерность топографических изображений, оцененная по первому максимуму кривой $D_F = f(t)$, увеличивается с увеличением размера участка поверхности (рисунок 2 (а)) и достигает стабильных значений при размере участков 3×3 мкм и больше (рисунок 2 (а)). При этом фрактальная размерность карт механических свойств (карт латеральных сил) участков поверхности клетки MCF-7 уменьшается в области малых размеров участка, достигает минимума при величине $l = 3-4$ мкм, а затем увеличивается (рисунок 2 (а)). На картах латеральных сил (рисунок 2 (в, г)) при малом размере участка видны мелкие особенности структуры, не различимые на соответствующих топографических изображениях (рисунок 2 (и, к)).

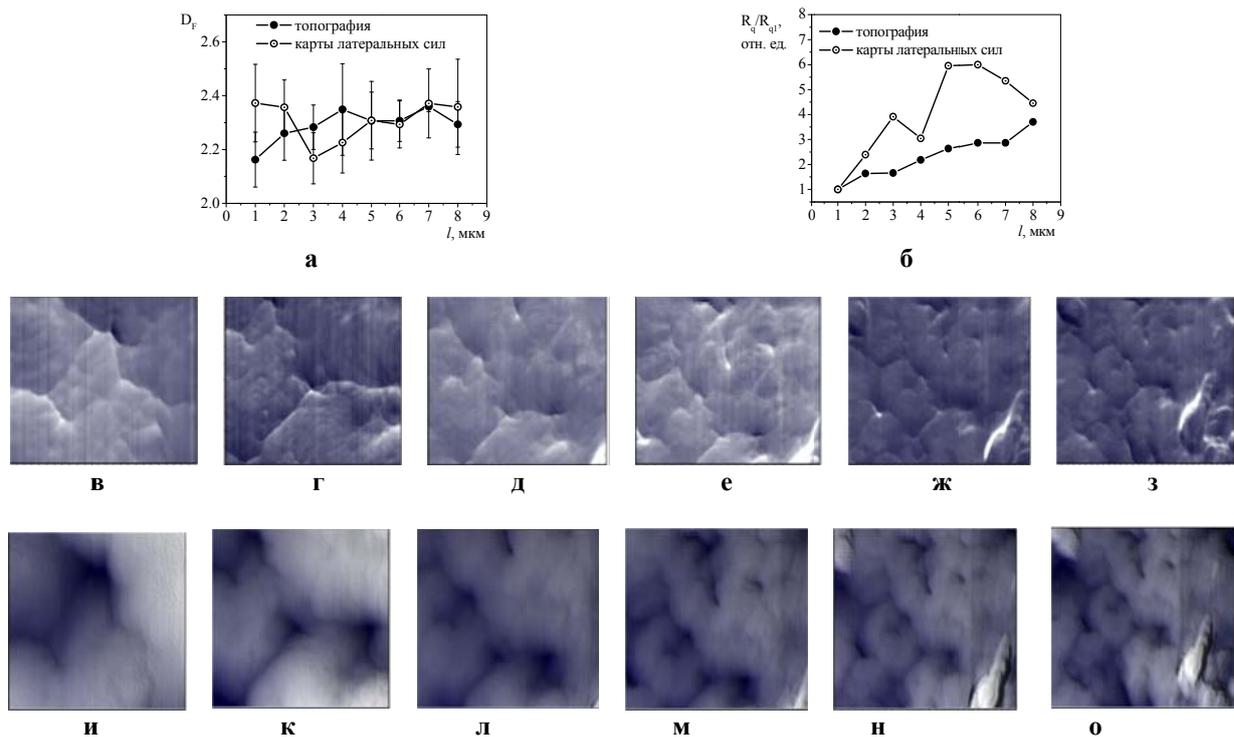


Рисунок 2 — Зависимость фрактальной размерности (D_F) и шероховатости (R_q) АСМ-изображений от размеров области сканирования поверхности клетки MCF-7:

а, б — влияние размера изображения на величину первого максимума зависимости $D_F = f(t)$ (а) и на величину шероховатости (R_q) (б) для топографического изображения и карты латеральных сил участка поверхности клетки MCF-7; R_{q-1} – шероховатость изображения участка поверхности размером 1×1 мкм; в-о — топографические изображения (в-з) и карты латеральных сил (и-о) поверхности клетки MCF-7 с размерами 1×1 мкм (в, и), 2×2 мкм (г, к), 3×3 мкм (д, л), 4×4 мкм (е, м), 5×5 мкм (ж, н), 6×6 мкм (з, о). Фрактальная размерность оценена с использованием деления изображения на 9 и 4 квадратных участков одинаковой площади

При больших размерах участка клеточной поверхности структурные особенности обоих типов АСМ-изображений (карт) сходны (рисунок 2 (ж, з, н, о)). При записи изображений поверхности клетки с помощью АСМ боковые отклонения (латеральные, торсионные отклонения) зонда оказываются более чувствительными к изменению свойств сканируемой поверхности в сравнении с вертикальными отклонениями иглы-зонда микроскопа. Следовательно, карты латеральных сил для изучения малых участков поверхности клетки подходят лучше, чем топография.

Это подтверждается и тем, что фрактальная размерность карт латеральных сил на участках малых размеров достоверно выше фрактальной размерности топографических изображений этого же участка поверхности клетки. Карты латеральных сил, записанные на участках малых размеров ($l = 1-3$ мкм), позволяют изучать особенности структуры, обусловленные кортикальным цитоскелетом.

Влияние выбора участка клеточной поверхности на значения шероховатости и фрактальной размерности его АСМ-изображения. Жесткая подложка (например, стекло) активирует цитоскелет эпителиальной клетки, способствуя созданию упорядоченных структур из актино-

вых филаментов (ламеллоподий, филоподий, стресс-фибрилл и др.). Клетка расплывается и поляризуется, образуя лидирующий край со структурами из актиновых филаментов (ламеллоподиями). На рисунке 3 представлено АСМ-изображение и основанное на нем схематическое изображение эпителиальной клетки карциномы молочной железы MCF-7 на стеклянной пластине. На рисунке можно выделить лидирующий край клетки, область с ядром и переходную область. Первая область характеризуется развитой дендритоподобной структурой актинового цитоскелета, свойства третьей области определяются подлежащим под мембраной ядром с ядрышками. Вторая область является переходной, без существенного влияния цитоскелетных структур и ядра на свойства поверхности. На рисунке 4 (в-д и ж-и) представлены типичные АСМ-изображения из трех областей поверхности клеток MCF-7.

Существенных различий в значениях шероховатости топографических изображений и карт латеральных сил для трех выбранных участков поверхности клетки не обнаружено (рисунок 4 (е и ж)). Зависимости $D_F = f(t)$ для топографии и карт латеральных сил трех участков поверхности клетки различаются по форме. Для некоторых значений коэффициента масшта-

бирования по оси Z различия статистически значимы. Для топографии имеет место уменьшение значения второго максимума зависимости $D_F = f(t)$ (при $t = 2,17$ $D_{F2} = 2,28 \pm 0,16$; $2,14 \pm 0,12$; $2,04 \pm 0,12^*$ для края, центральной области и переходной области соответственно, $*p < 0,05$ в сравнении с краевой областью). Для карт лате-

ральных сил первый максимум кривой сдвинут влево для образцов с краевой области клетки ($t = -2,17$: $D_F = 2,09 \pm 0,07$; $1,87 \pm 0,01^*$; $1,89 \pm 0,03^*$ для края, центральной области и переходной области соответственно, $*p < 0,05$ в сравнении с краевой областью). Есть различия и в параметрах второго максимума.

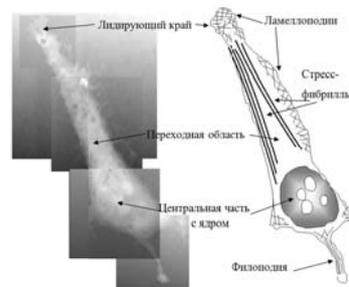


Рисунок 3 — Эпителиальная клетка карциномы молочной железы MCF-7 на стеклянной пластине: а — АСМ-изображение (топография) целой клетки, реконструированное из более мелких АСМ-изображений частей клетки; б — схематичное изображение поляризованной эпителиальной клетки на жестком субстрате с указанием структурных элементов цитоскелета и частей клетки, используемых при АСМ-исследовании

Например, при $t = 1,73$ $D_F = 2,16 \pm 0,07^*$; $2,32 \pm 0,04$; $2,15 \pm 0,06^*$ для края, центральной области и переходной области соответственно, $*p < 0,05$ в сравнении с центральной областью. Эти изменения количественно подтверждают сглаживание рельефа поверхности в ряду: краевая область, центральная область и переходная область. Сдвиг влево первого максимума D_F

для карт латеральных сил участка лидирующего края клетки свидетельствует о присутствии в его структуре более выраженных мелких структурных элементов — актиновых микрофиламентов. Кроме того, различия в распределении механических свойств наблюдаются на более крупных масштабах между участками центральной области и участками края и переходной области.

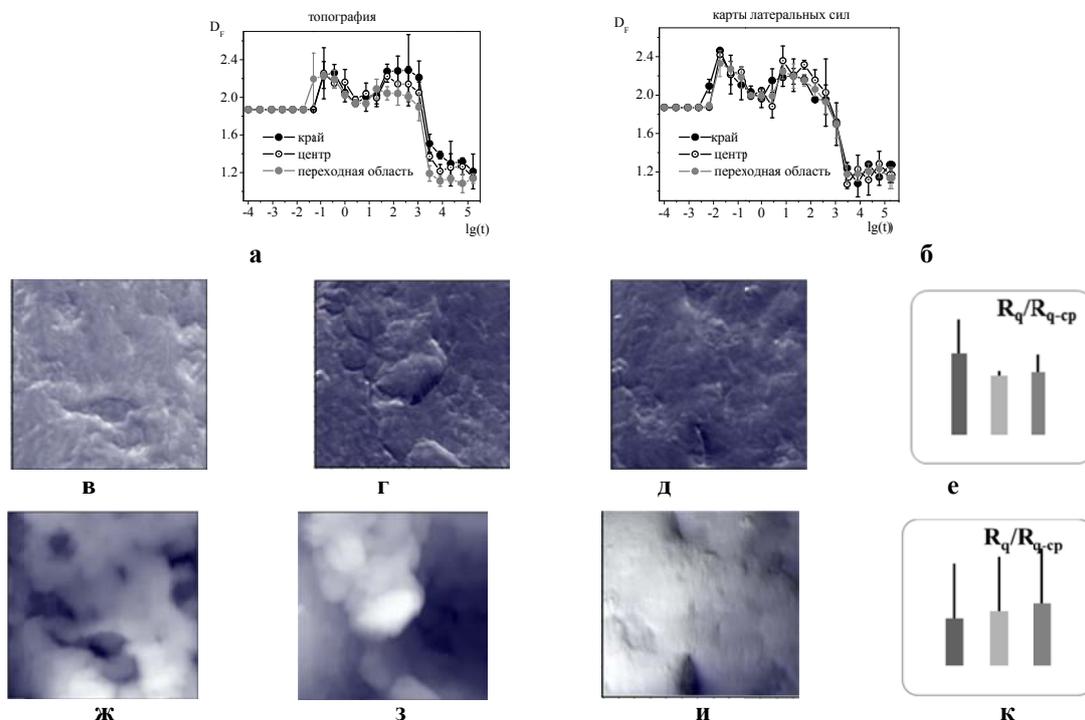


Рисунок 4 — Влияние на значения фрактальной размерности (D_F) и шероховатости (R_q) выбора участка поверхности клетки MCF-7

а, б — зависимости $D_F = f(t)$ для топографических изображений (а) и карт латеральных сил (б) участков поверхности клетки; в-д — типичные топографические изображения участков поверхности клетки с края (в), в центре (г) и в переходной области (д); е — шероховатость топографических изображений поверхности клетки (с края, 1; в центре, 2; в переходной области, 3); ж-и — типичные карты латеральных сил участков поверхности клетки с края (ж), в центре (з) и в переходной области (и); к — шероховатость карт латеральных сил для клетки (с края, 1; в центре, 2; в переходной области, 3)

Заключение

Совместный анализ шероховатости и фрактальной размерности АСМ-изображений эпителиальных клеток карциномы молочной железы MCF-7 выявил различие возможностей этих параметров и преимущество использования параметра $D_F = f(t)$ для характеристики тонкой структуры распределения значений локальных параметров карт топографии и механических свойств по поверхности клетки. Применяя зависимость $D_F = f(t)$ к АСМ-изображениям, можно количественно охарактеризовать различные по структурным свойствам части клетки. Параметр $D_F = f(t)$ для карт латеральных сил участков поверхности микрометрового масштаба может использоваться для количественной характеристики развитости кортикального цитоскелета, обуславливающего тонкую струк-

туру карт механических свойств поверхности клетки. Величина фрактальной размерности АСМ-карт ограничена минимально достижимым шагом сканирования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Multifractal characterization of morphology of human red blood cells membrane skeleton / Ş. Ţălu [et al.] // J. Microsc. — 2016. — Vol. 262(1). — P. 59–72.
2. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: A quantitative atomic force microscopy investigation / M. Girasole [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. — 2007. — Vol. 1768. — P. 1268–1276.
3. Starodubtseva, M. N. Novel fractal characteristic of atomic force microscopy images / M. N. Starodubtseva, I. E. Starodubtsev, E. G. Starodubtsev // Micron. — 2017. — Vol. 96. — P. 96–102.
4. Fractal properties of cell surface structures: A view from AFM / A. Bitler, R. S. Dover, Y. Shai // Semin. Cell Dev. Biol. — 2017. — pii: S1084-9521(17)30017-4. doi:10.1016/j.semdb.2017.07.034.
5. Physical-mechanical image of the cell surface on the base of AFM data in contact mode / M. N. Starodubtseva [et al.] // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. — 2017. — Vol. 256. — P. 012016.

Поступила 31.10.2017

ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА

УДК 616.12-008.331.1-084

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРИВЕРЖЕННОСТИ
К ЛЕЧЕНИЮ ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ
ПОСЛЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ, ПРОВОДИМОГО
ВРАЧАМИ-ТЕРАПЕВТАМИ УЧАСТКОВЫМИ И ПОМОЩНИКАМИ ВРАЧА**

Я. И. Будник

Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель

Цель: провести сравнительный анализ приверженности к лечению пациентов с артериальной гипертензией после профилактического консультирования, проводимого врачами-терапевтами участковыми и помощниками врача в амбулаторных условиях.

Материал и методы. Исследование проведено на базе филиалов центральной городской поликлиники г. Гомеля. Выборочную совокупность составили 210 пациентов трудоспособного возраста (средний возраст $47,1 \pm 3,4$ года), страдающих артериальной гипертензией. Вся выборка была разделена на 2 группы: 1-ю группу составили 110 человек — мужчины и женщины, с которыми провели индивидуальное профилактическое консультирование помощники врача, 2-ю — 100 пациентов, которых консультировали врачи-терапевты участковые.

Результаты. На основании полученных результатов были рассчитаны индексы ожидаемой эффективности модификации образа жизни (EUWL), лекарственной терапии (EMT) и медицинского сопровождения (EMS). Оказалось, что они свидетельствуют о высокой результативности профилактического консультирования, в обеих группах ожидаемая эффективность лекарственной терапии (1,5) и медицинского сопровождения (1,3) одинакова. Итоговый показатель прогнозируемой эффективности лечения (IEET) не имел различий в выборках 1-й и 2-й групп (1,4).

Заключение. Профилактическое консультирование, проводимое медицинскими работниками в амбулаторных условиях, имеет сопоставимую эффективность. Результаты исследования по оценке приверженности к лечению пациентов трудоспособного возраста с артериальной гипертензией после профилактического консультирования, проводимого как врачами-терапевтами участковыми, так и помощниками врача, показали, что это способствовало позитивным изменениям в их образе жизни, что касалось, в частности, модификации образа жизни, лекарственной терапии и постоянного медицинского сопровождения.

Ключевые слова: профилактическое консультирование, факторы риска, болезни системы кровообращения, артериальная гипертензия, приверженность лечению, помощник врача, профилактика.

**THE COMPARATIVE ANALYSIS OF ADHERENCE OF PATIENTS WITH ARTERIAL
HYPERTENSION TO THE TREATMENT AFTER PREVENTIVE CONSULTATION
PROVIDED BY LOCAL THERAPISTS AND PHYSICIAN ASSISTANTS**

Ya. I. Budnik

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Purpose: to perform the comparative analysis of adherence of patients with arterial hypertension to the treatment after preventive consultation provided by local therapists and physician assistants in outpatient conditions.