

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **22641**

(13) **С1**

(46) **2019.08.30**

(51) МПК

**G 01Q 60/26** (2010.01)

**G 01N 33/483** (2006.01)

(54)

**СПОСОБ ОЦЕНКИ СТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ**

(21) Номер заявки: а 20170313

(22) 2017.08.23

(43) 2019.04.30

(71) Заявители: Стародубцева Мария Николаевна; Стародубцев Иван Евгеньевич (ВУ)

(72) Авторы: Стародубцева Мария Николаевна; Стародубцев Иван Евгеньевич (ВУ)

(73) Патентообладатели: Стародубцева Мария Николаевна; Стародубцев Иван Евгеньевич (ВУ)

(56) СТАРОДУБЦЕВА М.Н. и др. Материалы международной научной конференции "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем", Минск, БГУ, 2016, с. 364 - 367.  
ВУ 20077 С1, 2016.  
UA 63457 U, 2011.  
WO 2011/105847 A2.  
US 5848177 A, 1998.  
ШАЙДУК А. М. и др. Известия АГУ, 2012, т. 73, № 1, с. 233-235.

(57)

Способ оценки структуры поверхности биологической клетки, в котором сканируют выбранный участок поверхности зондом атомно-силового микроскопа, строят трехмерную карту сканируемого участка в координатах (X, Y, Z), где X и Y соответственно длина и ширина участка, а Z - величина действующих на зонд латеральных сил, многократно масштабируют построенную карту по оси Z путем умножения величин латеральных сил на заданные коэффициенты масштабирования, вычисляют фрактальную размерность участка для каждого из указанных коэффициентов, строят ее зависимость от коэффициента масштабирования в диапазоне значений фрактальной размерности от 2 до 3, а затем оценивают структуру поверхности клетки либо по значениям фрактальной размерности в максимумах построенной зависимости, либо по всей зависимости в целом.

Изобретение относится к биологии, к клеточной биологии, и может быть использовано для количественной характеристики геометрических параметров структуры поверхности биологической клетки на основе получаемых методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) трехмерных карт локальных значений латеральных сил участков ее поверхности.

Атомно-силовая микроскопия (сканирующая зондовая микроскопия) является современным методом исследования свойств поверхностей биологических клеток. При использовании контактного режима сканирования получают трехмерные карты рельефа (топографические карты) поверхности в координатах X (длина), Y (ширина), Z (высота) и карты латеральных сил поверхности в координатах X (длина), Y (ширина), Z (значение

**ВУ 22641 С1 2019.08.30**

боковых сил - сил, поперечных к направлению движения зонда-индентора по исследуемой поверхности, сил трения скольжения). Для количественной оценки топографических карт и карт латеральных сил поверхностей биологических клеток используют значения фрактальной (дробной) размерности поверхностей ( $D_F$ ) [1-4]. Фрактальная размерность характеризует степень "развитости" (шероховатости) исследуемой поверхности, включая карты латеральных сил, и может изменяться в диапазоне ( $2 < D_F < 3$ ).

В случае топографических карт проблем с оценкой значений фрактальной размерности известными способами не возникает, так как все три координаты имеют одну и ту же размерность (размерность длины).

АСМ-карты латеральных сил являются поверхностью, характеризующей пространственное распределение значений латеральных сил, измеряемых в единицах силы ( $Z = f(X, Y)$ ). Карты латеральных сил содержат в себе информацию не только о распределении сил трения скольжения, обусловленных свойствами вещества исследуемой поверхности (материала), то есть механическими свойствами, но и о силах сопротивления движению зонда-индентора, связанных с рельефом (топографией) поверхности. Известен способ исключения сил, обусловленных топографией (шероховатостью) поверхности, из значений латеральных сил [5, 6]. Существуют методики калибровки латеральных сил [7-11], в результате которых регистрируемые значения боковых отклонений АСМ-зонда (консоли), измеряемые в вольтах или условных единицах, преобразуются в значения латеральных сил, измеряемых в ньютонах или кратных им единицах (например, в нано- или микро- ньютонах). Оцениваемые значения латеральных сил в ньютонах в значительной степени относительны, так как точность оценки этих значений зависит от многих факторов, включающих геометрические и механические свойства консоли и иглы-зонда, а также используемую модель (функциональную зависимость между латеральными силами, свойствами АСМ-зонда и регистрируемым сигналом). Таким образом, карты латеральных сил имеют несопоставимые по единицам измерения координаты и произвольный коэффициент масштабирования по одной из них ( $Z$ ), обусловленный выбранным исследователем методом масштабирования латеральных сил. Очевидно, что это касается карт любых механических свойств, включая упругие, адгезионные и др. С другой стороны, от значения масштаба, точнее от коэффициента масштабирования по оси  $Z$ , зависят значения фрактальной размерности карт механических свойств изучаемой поверхности. Следовательно, существует проблема "стандартизации" оценки фрактальной размерности карт механических свойств поверхности клеток для сопоставимости результатов исследования, во-первых, в норме и при патологиях, а во-вторых, исследований, выполняемых разными исследователями.

Исследования зависимости от коэффициента масштабирования ( $t$ ) по оси  $Z$  значений фрактальной размерности сеточных моделей различных поверхностей (волнообразные поверхности и плоскость с несколькими пиками Гаусса, расположенных на ней случайным образом) выявили ее нелинейный характер и показали, что он связан со структурой карт распределения значений локальных высот неровностей рельефа [12].

Рассматриваемый способ анализа (масштабирование по оси  $Z$ ) сеточных моделей поверхностей [12] был взят за прототип для оценки с помощью фрактальной размерности структуры поверхности биологической клетки по численным трехмерным АСМ-картам распределения локальных значений механических свойств.

Недостатком прототипа является его использование только для поверхностей, представляющих карту высот рельефа, соответствующего вертикальным отклонениям зонда в АСМ-картах, а также отсутствие конкретного алгоритма построения характеристики  $D_F = f(t)$  и способа выбора значения  $D_F$  для оценки структуры исследуемой поверхности.

Задача, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, заключается в улучшении оценки свойств поверхности биологической клетки с помощью метода масштабирования АСМ-карт ее механических свойств (латеральных сил).

Технический результат способа заключается в повышении объективности количественной оценки структуры карт латеральных сил поверхности клеток с помощью критерия фрактальной размерности, повышении точности определения фрактальной размерности и достоверности ее измерений. Масштабирование по оси  $Z$  является эффективным средством не только для изучения АСМ-карт поверхности биологической клетки, когда одна из трех осей координат имеет иную размерность, чем две другие оси, и для анализа структуры АСМ-карт, а также для сравнительного анализа различных АСМ-карт.

Задача решается предлагаемым способом, в котором сканируют выбранный участок исследуемой поверхности биологической клетки зондом атомно-силового микроскопа, строят трехмерную карту сканированного участка в координатах  $(X, Y, Z)$ , где  $X$  и  $Y$  соответственно длина и ширина участка, а  $Z$  - величина действующих на зонд латеральных сил, многократно масштабируют построенную карту по оси  $Z$  путем умножения величин латеральных сил на заданные коэффициенты масштабирования, вычисляют фрактальную размерность участка для каждого из указанных коэффициентов, строят ее зависимость от коэффициента масштабирования в диапазоне значений фрактальной размерности от 2 до 3, а затем оценивают структуру поверхности клетки либо по значениям фрактальной размерности в максимумах построенной зависимости, либо по значениям всей зависимости в целом.

Изобретение иллюстрируется фигурой.

Фигура - зависимость фрактальной размерности ( $D_F$ ) записанных в контактном режиме сканирования на воздухе карт латеральных сил от коэффициента масштабирования ( $t$ ) по оси  $Z$  ( $D_F = f(t)$ ) для участков поверхности трех типов клеток. Размеры области сканирования -  $2,5 \text{ мкм} \times 2,5 \text{ мкм}$ , разрешение -  $256 \times 256$  пикселей. Данные представлены в виде границ 95 % доверительного интервала для выборок размера  $n = 6-9$ .

### **Пример.**

Были исследованы образцы первичных фибробластов кожи (ФБ) и раковых эпителиальных клеток (эпителиальные клетки карциномы гортани (HEp-2c), эпителиальные клетки карциномы молочной железы (MCF-7)) человека. На специально подготовленные стеклянные пластины, помещенные в чашки Петри, наносили суспензию клеток в питательной среде и инкубировали в течение 24 ч при  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  и 5 %  $\text{CO}_2$ , затем клетки фиксировали в 0,5 %-ном солевом буферном растворе глутарового альдегида (30 мин), трижды отмывали препараты клеток деионизированной водой и высушивали в вертикально-наклонном положении ( $75-85 \text{ }^\circ$ ) в ламинарном потоке воздуха ( $0,42 \text{ м/с}$ ) при комнатной температуре. АСМ-исследование проводили на атомно-силовом микроскопе "NT-206" (ОДО "Микротестмашины", Беларусь), используя стандартные иглы-зонды CSC38 (уровень В). Сканирование проводили на воздухе при температурах  $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  и влажности  $55 \pm 10 \text{ } \%$ . Используя контактный режим сканирования, регистрировали карты латеральных сил участков поверхности клеток размером  $2,5 \text{ мкм} \times 2,5 \text{ мкм}$  и разрешением  $256 \times 256$  пикселей. Для оценки зависимости фрактальной размерности поверхности от коэффициента масштабирования по оси  $Z$  создавали массив изображений, получаемый при умножении значений  $Z$  на коэффициент  $t$  в диапазоне от 0,0001 до 22027 с шагом  $e = 2,71828$ . Фрактальную размерность каждого из полученных АСМ-изображений массива рассчитывали с использованием метода подсчета кубов с помощью программного обеспечения [12]. Для этого область пространства, включающую исследуемую поверхность, разбивали кубической решеткой, подсчитывали количество кубов решетки, в которых есть точки исследуемого АСМ-изображения, и ребро куба решетки уменьшали в 2 раза, после чего процесс повторяли до тех пор, пока ребро куба не становилось меньше шага сканирования. По полученным данным строили массив пар - логарифм количества кубов и логарифм величины, обратной размеру ребра куба. Тангенс угла наклона на линейном участке полученной зависимости логарифма количества кубов от логарифма величины, обратной размеру ребра куба, является фрактальной размерностью исследуемой

поверхности. Оценку среднего значения фрактальной размерности для участка поверхности клетки осуществляли с помощью его разбиения на 8 участков одинаковой площади, оценки максимального значения фрактальной размерности для каждого из участков и расчета среднего значения для целой выборки. По средним значениям фрактальных размерностей для АСМ-изображений при определенных значениях коэффициента масштабирования по оси  $Z(t)$  строили зависимость  $D_F = f(t)$ . Для исследуемого типа клеток зависимости усредняли по данным 6-9 изображений, включающих изображения участков 3 отдельных клеток.

На фигуре зависимости  $D_F = f(t)$  для карт латеральных сил участков поверхности исследуемых типов клеток характеризуются одним или несколькими максимумами. Для характеристики карт механических свойств поверхности клеток целесообразно использовать либо всю зависимость  $D_F = f(t)$ , либо значения фрактальной размерности в максимумах этой зависимости, характеризующих масштабные интервалы, в которых фрактальные свойства поверхности исследуемых клеток максимальны. Например, для сравнительного анализа структуры поверхности (распределения механических свойств по поверхности) трех разных типов исследуемых клеток целесообразно использовать значения фрактальной размерности при коэффициентах масштабирования  $t = 0,0183$  и  $2,7183$ , что соответствует двум максимумам зависимости  $D_F = f(t)$ , характерной для фибробластов (таблица).

**Значения фрактальной размерности ( $D_F$ ) карт латеральных сил участков поверхности трех типов клеток при коэффициентах масштабирования ( $t$ ), соответствующих максимальным значениям фрактальной размерности зависимости  $D_F = f(t)$  для фибробластов (данные представлены в виде границ 95 % доверительного интервала для выборок размера  $n = 6-9$ .)**

Клетки	t = 0,0183	t = 2,7183
ФБ	2,27±0,07	2,32±0,04
МСF-7	2,07±0,04	2,15±0,08
HEp-2c	1,93±0,06	2,02±0,05

Источники информации:

1. Smith Jr. T.G., Lange G.D., Marks W.B. Fractal methods and results in cellular morphology - Dimensions, lacunarity and multifractals // J. Neurosci. Methods. - Vol. 199669. - P. 123-136.
2. Патент РБ 12868, МПК G01N 13/10 (2009), 2010.
3. Starodubtseva M.N., Kuznetsova T.G., Chizhik S.A., Yegorenkov N.I. Atomic force microscopic observation of peroxynitrite-induced erythrocyte cytoskeleton reorganization Micron. - 2007. - V. 38(8). - P. 782-786.
4. Стародубцева М.Н., Дрозд Е.С., Никитина И.А., Егоренков Н.И. Применение атомно-силового микроскопа в медико-биологических исследованиях // Приложение к руководству пользователя для атомно-силового микроскопа NT-206/ ОДО "Микротестмашины" / Под ред. А.А. Суслова. - Гомель, 2013. - Режим доступа: <http://microtm.com/download/manual-bio-20131029.doc>.
5. Патент РБ 20077, МПК A61B 5/0 (2006.01), 2016.
6. Bhushan B. Handbook of Micro/Nanotribology. - 2d ed. - Boca Raton: CRC press, 1999. - 859 p.
7. Hong D.K., Han S.A., Park J.H., Soon Huat Tan, Naesung Lee, Yongho Seo. Frictional force detection from lateral force microscopic image using a Si grating // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. - 2008. - Vol. 313-314. - P. 567-570.
8. Munz M. Force calibration in lateral force microscopy: a review of the experimental methods // J. Phys. D: Appl. Phys. - 2010. - Vol. 43. - P. 063001.

9. Palacio M.L.B., Bhushan B. Normal and Lateral Force Calibration Techniques for AFM Cantilevers // Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences. - 2010. - Vol. 35. - No. 2. - P. 73-104.

10. Cannara R.J., Eglin M., Carpick R.W. Lateral force calibration in atomic force microscopy: A new lateral force calibration method and general guidelines for optimization // Rev. Sci. Instrum. 2006. - Vol. 77. - P. 053701.

11. Xie H., Vitard Ju., Haliyo S., Régnier S., Boukallel M. Calibration of lateral force measurements in atomic force microscopy with a piezoresistive force sensor // Rev. Sci. Instrum. - 2008. - Vol. 79. - P. 033708.

12. Стародубцева М.Н., Стародубцев И.Е., Стародубцев Е.Г. Методологические аспекты расчета фрактальной размерности АСМ-изображений поверхности клеток // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Междунар. науч. конф. Двенадцатый съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, 28-30 июня 2016: Сб. ст. в 2 ч. Ч. 2 / Редкол.: И.Д. Болотовский и др. - Минск: Изд. центр БГУ, 2016. - С. 364-367.

