

РАДИОЭЛЕКТРОНИКА И ПРИБОРОСТРОЕНИЕ

УДК 576.6:612.017.1:576.3:53.088.3

*МОХАММЕД САЛЕМ А. А.¹, Н. С. КУЖЕЛЬ², А. А. МАХАНЁК², С. А. ЧИЖИК²***СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРОМБОЦИТОВ
ПРИ ИЗМЕРЕНИЯХ НА ВОЗДУХЕ МЕТОДОМ СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ***¹Белорусский национальный технический университет, Минск, Беларусь,
e-mail: salimalkobati11@mail.ru,**²Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Результаты исследования механических свойств клеток существенно зависят от методики их подготовки и условий проведения измерений для определения этих свойств. Модуль упругости вычисляется в результате обработки данных индентирования с использованием наиболее подходящей математической модели. Чаще всего применяется модель Герца. В данной работе представлены результаты исследований упругих свойств мембран, предварительно фиксированных глутаровым альдегидом и высушенных на воздухе тромбоцитов здоровых молодых людей. Модули упругости определяли на основе кривых наноиндентирования, полученных методом атомно-силовой спектроскопии. Анализ результатов измерений проводили как с применением модели Герца, так и с учетом сил адгезии согласно модели Джонсона–Кенделла–Робертса (ДКР). Определены средние значения модулей упругости и поверхностной плотности адгезионной энергии и построены гистограммы частот распределений модулей упругости разной величины.

Ключевые слова: атомно-силовая спектроскопия, модуль упругости, модель ДКР, адгезия, тромбоциты.

*MOHAMMED SALEM A. A.¹, N. S. KUZHEL², A. A. MAKHANIUK², S. A. CHIZHIK²***STRUCTURAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF PLATELETS
MEASUREMENTS ON AIR BY FORCE SPECTROSCOPY***¹Belarusian National Technical University, Minsk, Belarus,
e-mail: salimalkobati11@mail.ru,**²A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

Results of study of mechanical properties of cells depend essentially on a method of their preparation and measurement conditions for determining these properties. Determination of modulus of elasticity is performed by processing the data of indentation using the most suitable mathematical model. The most frequently used model is the one by Hertz. The paper presents the results of investigations of the elastic properties of the pre-fixed with glutaraldehyde, and air-dried platelets of healthy young people. The elastic moduli were determined by nanoindentation curves obtained by atomic force spectroscopy. Analysis of the results of measurements carried out both with Hertz model and taking into account the adhesion forces according to the model of Johnson–Kendall–Roberts (JKR) is made. Determined average values of elastic modulus and surface density of adhesion energy and histograms showing frequency distributions of the moduli of elasticity of different values are presented.

Keywords: atomic force spectroscopy, elasticity modulus, model JKR, adhesion, platelets.

Введение. Один из методов, позволяющих количественно оценить модуль упругости клеток – статическая силовая спектроскопия, реализуемая в одном из режимов работы атомно-силового микроскопа. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) и силовая спектроскопия активно используются для получения топографии поверхности и механических свойств биологических объектов на протяжении нескольких десятилетий. Исследования изменений формы, структуры поверхности и механических свойств клеток при различных патологиях способствуют разработке методик ранней диагностики многих заболеваний и оценке эффективности применения лекарственных средств и других видов терапии. Определение модуля упругости мембраны клетки

осуществляется обычно на основе модели Герца [1], не учитывающей влияния сил адгезии между поверхностями зонда и исследуемого объекта. В результате имеет место дополнительная (не связанная с механической или структурной неоднородностью) дисперсия модуля Юнга в зависимости от глубины внедрения в клетку наконечника зонда атомно-силового микроскопа. Помимо выбора теоретической модели результаты определения структурно-механических свойств клеток зависят от методики их подготовки и условий проведения наноиндентирования [2, 3].

Цель данной работы – определение методом атомно-силовой спектроскопии механических свойств тромбоцитов при измерениях в воздушной среде и применении двух моделей для обработки данных наноиндентирования: моделей Герца и ДКР [4] с выбором соответствующей каждой модели точки контакта.

Методы и материалы. Использованы тромбоциты здоровых молодых людей (студентов). Структурно-механические свойства клеток исследовались при помощи комплекса, совмещающего функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии, с использованием стандартных кремниевых зондов NSC11 («MikroMasch») в статическом режиме. Комплекс состоит из АСМ NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) и оптической системы (BelОМО «ЛЭМТ», Беларусь).

Тромбоциты выделяли путем центрифугирования венозной крови, стабилизированной 3,8%-ным раствором цитрата натрия, в течение 10 мин при 200 г. Полученную обогащенную тромбоцитами плазму фиксировали в 1,5 мл 0,5%-ного буферного раствора глутарового альдегида в течение 30 мин. Тромбоциты отделяли от фиксатора путем центрифугирования суспензии в течение 10 мин при 2000 г. Супернатант отбирали, а к осадку добавляли 700 мкл фосфатного буфера, ресуспендировали и центрифугировали 10 мин при 2000 г, процедуру повторяли два раза. Затем к осадку добавляли 700 мкл дистиллированной воды, ресуспендировали и центрифугировали 10 мин при 2000 г, процедуру повторяли два раза. Осадок с клетками наносили на пластинки слюды размером 1×1 см и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч.

Наноиндентирование клеток производилось на воздухе. Жесткость консоли составляла 3 Н/м, радиус наконечника зонда – 54 нм. Для исключения эффектов вязкоупругости задержка между измерениями в соседних точках задавалась 50 мс. Деформацией зонда пренебрегали. Коэффициент Пуассона принимался равным 0,5 [5].

Математическая модель и методика анализа экспериментальных данных. В ходе проведения силовой спектроскопии измеряли зависимость между силой, действующей на зонд, и величиной перемещения рабочей площадки с исследуемым объектом (клеткой). Эта зависимость устанавливается на этапах как подвода, так и отвода рабочей площадки с образцом от зонда. Обработку кривых подвода и отвода осуществляли совместно, согласно методикам [6, 7], для коррекции гистерезиса пьезосканера и определения точек контакта, наилучшим образом соответствующих моделям Герца и ДКР. Точка контакта для применения модели Герца находилась на пересечении кривой отвода, восстановленной после коррекции гистерезиса пьезотрубки, с линией нулевого уровня измеряемой силы (отклонения консоли). В этой точке величина внедрения наконечника зонда в поверхность исследуемого объекта равна нулю. В точке контакта, соответствующей модели ДКР, величина внедрения зонда в образец равна нулю, когда действующая на зонд сила составляет 8/9 от величины силы адгезии в момент отрыва зонда от поверхности клетки [7]. У однородного и изотропного материала модуль упругости, вычисляемый согласно модели Герца вблизи точки контакта, обычно монотонно убывает с ростом величины внедрения и принимает постоянное значение, когда это внедрение достаточно велико. Если механические свойства разных участков поверхности исследуемого объекта сильно различаются, то на некоторых из них могут быть получены слишком малые величины внедрения, а оценка модуля упругости окажется слишком грубой. Учет сил адгезии в рамках модели ДКР позволяет уменьшить дисперсию вычисляемых модулей упругости вблизи точки контакта и получать искомым модуль при меньших величинах внедрения наконечника зонда в клетку. В итоге уменьшается также вероятность повреждения мембраны клетки и грубых ошибок в определении ее механических свойств.

Согласно модели ДКР, нагрузка $F_{\text{ДКР}}$ зависит от радиуса контакта a и плотности адгезионной энергии γ следующим образом [8]:

$$F(a)_{\text{ДКР}} = \frac{4E^* a^3}{3R} - (8\pi a^3 E^* \gamma)^{1/2}, \quad (1)$$

где R – радиус наконечника зонда, имеющего форму полусферы, $E^* = E/(1-\nu^2)$ – приведенный модуль упругости (предполагается, что зонд намного жестче, чем исследуемый образец), E – модуль упругости материала, ν – коэффициент Пуассона.

Связь глубины внедрения δ зонда в образец с радиусом контакта a описывается соотношением

$$\delta_{\text{ДКР}}(a) = \frac{a^2}{R} - \left(\frac{2\pi a \gamma}{E^*} \right)^{1/2}. \quad (2)$$

Плотность адгезионной энергии можно найти из выражения для минимальной силы взаимодействия зонда и поверхности материала:

$$F_a = -\frac{3}{2} \pi R \gamma. \quad (3)$$

Чаще всего анализ механических свойств клеток ограничивается набором статистики и определением средних значений модуля упругости и доверительного интервала при заданном уровне значимости. В данной работе наряду с вычислением этих показателей строится гистограмма распределения модулей упругости в интервалах от 0 до 250 МПа с шагом 50 МПа, а также находятся средние значения удельной плотности адгезионной энергии в этих интервалах. Следует отметить, что при исследованиях механических свойств клеток как в жидкой фазе, так и на воздухе характерные значения модулей упругости составляют от нескольких десятков до нескольких сотен килопаскалей [9–12]. Однако в некоторых исследованиях обнаруживаются и величины модулей Юнга в несколько мегапаскалей [3] или даже несколько десятков мегапаскалей [13–15].

Результаты и их обсуждение. Поверхность любой биологической клетки не является однородной. Имеющиеся на ней выступы и впадины различных размеров и конфигураций отражают морфологические особенности конкретного типа клетки. Формируют эти неоднородности различные мембранные и трансмембранные белки. Размер единичной рецепторной части на поверхности клетки может колебаться от 4 до 20 нм, а диаметр скопления достигает 100–300 нм [16–18].

На рис. 1 представлена гистограмма высот поверхности тромбоцитов в области наноиндентирования размером 1,5×1,5 мкм, которая выбиралась на поверхности клетки из условия наименьшей неоднородности перепада высот. Можно констатировать наличие двух выраженных пиков на гистограммах высот поверхности тромбоцитов. Пики пришлись на высоты 86 и 67 нм с частотами встречаемости 2,3 и 4,0 % соответственно.

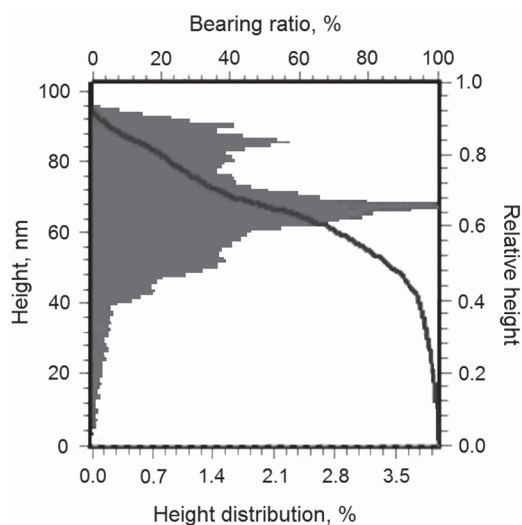


Рис. 1. Гистограмма распределения высот поверхности тромбоцитов

Отражением структурной неоднородности поверхности клеток может быть неоднородность их упругих свойств в разных точках внедрения зонда при проведении силовой спектроскопии. Многократные измерения модулей упругости на одном и том же образце, а также на разных образцах клеток одной группы показывают разброс значений вычисляемых модулей упругости от двух десятков до нескольких сотен мегапаскалей. Пример обработки 4 адгезионных кривых, для которых характерны высокие (а) и низкие (б) модули, показывает рис. 2.

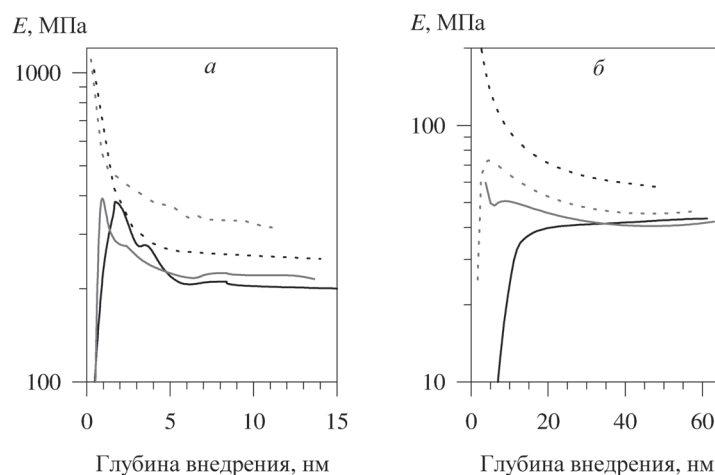


Рис. 2. Характерные дисперсии высоких (а) и относительно низких (б) модулей упругости мембран тромбоцитов здоровых молодых людей (штриховые линии – расчет по модели Герца)

Обычно при использовании модели ДКР наблюдаются заниженные значения модулей Юнга вблизи точки контакта. Завышение модулей при малых величинах внедрения и больших адгезионных силах характерно для модели Герца (рис. 2, штриховые линии), поскольку расчетная величина внедрения при неучете этих сил оказывается меньше реальной. В рассматриваемом случае (рис. 2) и в некоторых других случаях, характерных для более жестких участков клеток, вблизи точки контакта наблюдались высокие значения модулей упругости, вычисленных по модели ДКР. Причинами могут быть сильная чувствительность дисперсии механических свойств на этом участке к ошибкам измерения поверхностной плотности адгезионной энергии, а также вибрационные помехи. Отметим, что при постоянных величинах максимальной нагрузки и радиуса закругления наконечника зонда значение максимального внедрения зависит от жесткости участка наноиндентирования и чем модуль упругости выше, тем величина внедрения наконечника зонда в поверхность клетки меньше.

Неоднородность значений модулей Юнга в диапазонах от 0 до 250 МПа с шагом 50 МПа иллюстрирует рис. 3. При вычислениях с использованием модели ДКР максимум частоты встречаемости (34%) пришелся на диапазон модулей упругости 100–150 МПа со средним значением (121 ± 5) МПа. Итоговый по всем данным результат показал, что (при 95%-ной вероятности) доверительный интервал модулей упругости тромбоцитов, вычисленных согласно моделям Герца и ДКР, 124–153 и 90–116 МПа со значениями модулей Юнга (137 ± 8) и (103 ± 6) МПа. В рамках модели Герца предполагается, что нулевой силе взаимодействия зонда и образца соответствуют нулевые радиус контакта и величина внедрения наконечника зонда в этот образец. В случае значительной адгезии материала образца к поверхности зонда при нулевой измеряемой силе поверхность образца уже деформирована, радиус контакта не равен нулю, а зонд внедрен в исследуемый объект. Тридцати трех процентное различие между модулями Юнга, полученными по рассматриваемым моделям, вызвано тем, что по модели Герца в случаях относительно более жестких участков индентирования вычисляются величины внедрения, существенно меньшие фактических. Для получения постоянных значений модулей упругости по модели Герца следовало бы увеличить величину нагрузки либо использовать зонд с наконечником меньшего радиуса.

Помимо дисперсии модулей упругости мембран клеток обнаруживается также и разброс величин поверхностной плотности адгезионной энергии γ , вычисляемой из соотношения (3) по измеренной силе адгезии. Модуль Юнга и γ между собой в общем случае не связаны. Однако такая связь может обнаружиться статистически в случаях, когда механические свойства клетки определяются в точках поверхности с разными физико-химическими свойствами. Поэтому представляет интерес анализ поверхностной плотности адгезионной энергии в разных диапазонах модулей упругости. Средние значения γ в рассмотренных выше диапазонах модулей Юнга приведены на рис. 4. Стандартные ошибки здесь не показаны. Достоверных различий между γ в разных диапа-

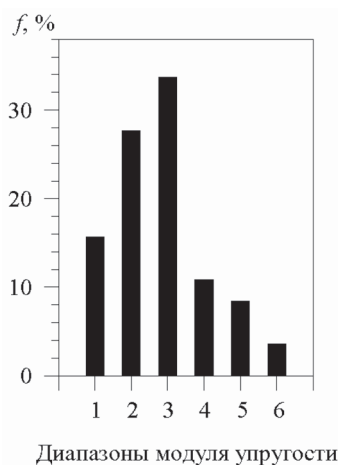


Рис. 3. Частотное распределение модуля упругости мембран тромбоцитов в диапазонах <50 МПа (1), 50–100 (2), 100–150 (3), 150–200 (4), 200–250 (5), >250 (6)

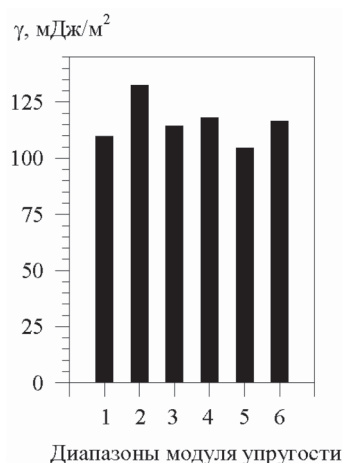


Рис. 4. Средняя поверхностная плотность адгезионной энергии мембран тромбоцитов в диапазонах модулей упругости <50 МПа (1), 50–100 (2), 100–150 (3), 150–200 (4), 200–250 (5), >250 (6)

зонах значений E при уровне значимости $p = 0,05$ не обнаружено. Средняя поверхностная плотность адгезионной энергии по всем адгезионным кривым составила (115 ± 3) мДж/м².

Заключение. Выбор модели Герца или ДКР для обработки данных наноиндентирования методом силовой спектроскопии имеет большое значение при оценке величины модуля упругости исследуемого материала. Средние значения модулей Юнга мембран фиксированных глутаровым альдегидом и высушенных на воздухе тромбоцитов молодых здоровых людей составили для моделей Герца и ДКР (137 ± 8) и (103 ± 6) МПа. Поверхностная плотность адгезионной энергии равна (115 ± 3) мДж/м². При неучете сил адгезии в рамках модели Герца средние значения модулей упругости на 33% больше результата, получаемого, согласно модели ДКР, с выбором точки контакта на адгезионной кривой с силой притяжения, равной 8/9 от величины силы отрыва зонда от поверхности клетки. Не установлено достоверных различий в величине поверхностной плотности адгезионной энергии участков поверхности тромбоцитов с разными модулями упругости.

Список использованной литературы

1. Тимошенко, С. П. Теория упругости: пер. с англ. Н. А. Шошина / С. П. Тимошенко. Изд. 2-е. – Л., 1937.
2. Кузнецова, Т. Г. Определение механических свойств клеточных поверхностей / Т. Г. Кузнецова, М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии: VII Междунар. семинар. Минск 1–3 ноября 2006 г. – Минск, 2006. – С. 153–157.
3. Лобов, И. А. Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии / И. А. Лобов, Н. А. Давлеткидеев // Вестн. Омского ун-та. – 2013. – № 2. – С. 129–132.
4. Johnson, K. L. Surface energy and the contact of elastic solids / K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts // Proc. Roy. Soc. London A. – 1971. – Vol. 324. – P. 301–313.
5. Manduca, A. Magnetic resonance elastography non-invasive mapping of tissue elasticity / A. Manduca [et al.] // Med. Image Anal. – 2001. – Vol. 5. – P. 237–254.
6. Методические аспекты определения модуля упругости высокоэластичных материалов и биологических клеток методом силовой спектроскопии / Салем А. А. Мохаммед [et al.] // Механика машин, механизмов и материалов. – 2015. – №2(31). – С. 80–84.
7. Методика коррекции гистерезиса пьезосканера атомно-силового микроскопа / Салем А. А. Мохаммед [et al.] // Механика машин, механизмов и материалов. – 2015. – № 4 (5). – С. 73–78.
8. Barthel, E. Adhesive elastic contacts – JKR and more / E. Barthel // J. Phys. D: Appl. Phys. – 2008. – Vol. 41. – P. 1–40.
9. Dokukin, M. E. Quantitative study of the elastic modulus of loosely attached cells in AFM indentation experiments / M. E. Dokukin, N. V. Guz, I. Sokolov // Biophys. J. – 2013. – Vol. 104. – P. 2123–2131.
10. Indentation versus Tensile Measurements of Young's modulus for soft biological tissues / C. T. McKee [et al.] // Tissue Engineering: Part B. – 2011. – Vol. 17. – P. 155–164.
11. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy / I. Dulińska [et al.] // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2006. – Vol. 66. – P. 1–11.

12. *Jin, H.* Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope / H. Jin // *Biochem. and Biophys. Res. Communicat.* – 2010. – Vol. 391. – P. 1698–1702.
13. *Chizhik, S. A.* Digital optical and scanning probe microscopy for biocells inspection and manipulation / S. A. Chizhik, E. S. Drozd, N. A. Fomin // 3rd Micro and Nano Flows Conference. Saliniki, Greece, 22-24 August 2011. – 2011. – P. 1–8.
14. *Starodubtseva, M.* Study of the mechanical properties of single cells as biocomposites by atomic force microscopy / M. Starodubtseva [et al.] // *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education.* A.Méndez-Vilas and J.Diaz (Eds.). – Formatex, 2010. – P. 470–477.
15. *Стародубцева, М. Н.* АСМ-исследование эритроцитов кренированных активными формами азота / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Н. И. Егоренков // *Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии: VII Междунар. семинар.* Минск 1–3 ноября 2006 г. – Минск, 2006. – С. 148–152.
16. *Fuchs, H.* Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy / H. Fuchs // *Structure.* – 1996. – Vol. 6, N 10. – P. 1235–1243.
17. *Abulrob, A.* Nanoscale imaging of epidermal growth factor receptor clustering / A. Abulrob // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 3145–3156.
18. *Van Zanten, Th. S.* A nanometer scale optical view on the compartmentalization of cell membranes / Th. S. Van Zanten, A. Carnbi, M. F. Garcia-Parajo // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2010. – Vol. 1798. – P. 777–787.

Поступила в редакцию 15.09.2015