



Българска академия на науките
Институт по оптически материали и технологии
“Акад. Йордан Малиновски”



Академична лекция на тема:

Изследване на кръвни клетки с помощта на Атомно силов микроскоп

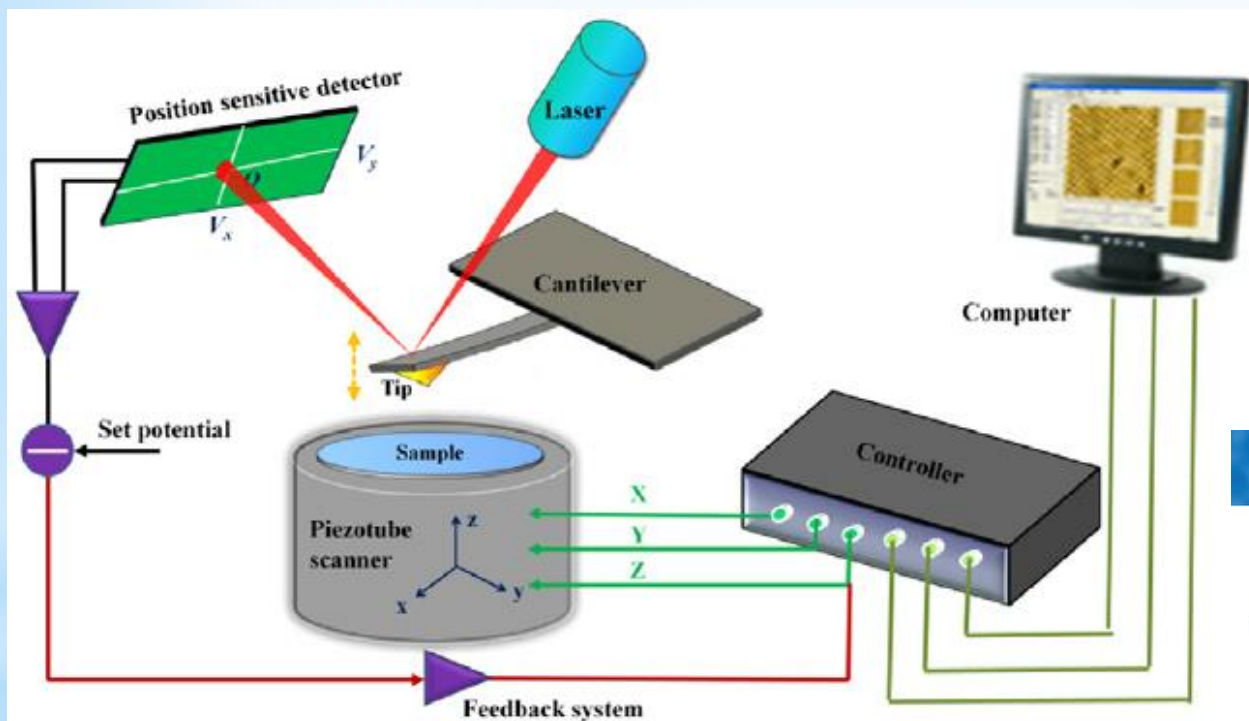
Доц. д-р Величка Йорданова Стрижкова



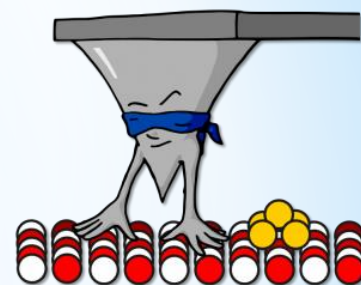
- ✓ Атомно силов микроскоп (AFM) - принцип на действие и възможности
- ✓ Кръв - състав и функции
- ✓ Формени елементи на кръвта - еритроцити, левкоцити и тромбоцити
- ✓ Изследвания на кръвни клетки на жени в рисковата бременност



Атомно Силов Микроскоп



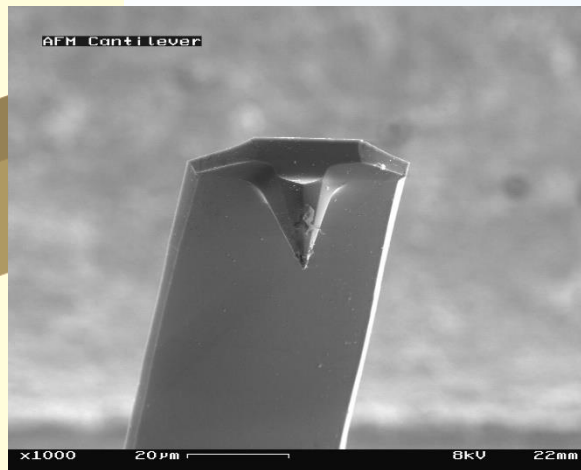
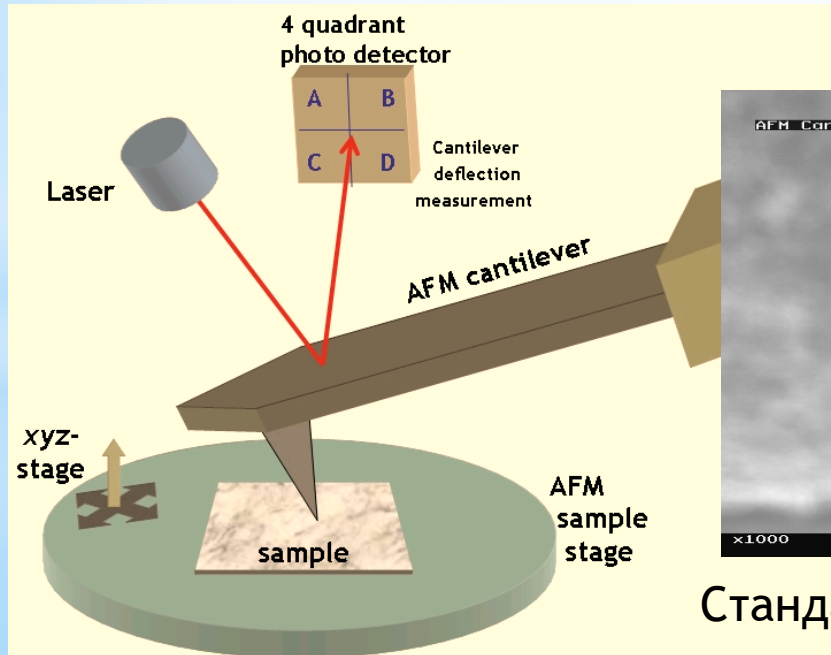
Принципна схема



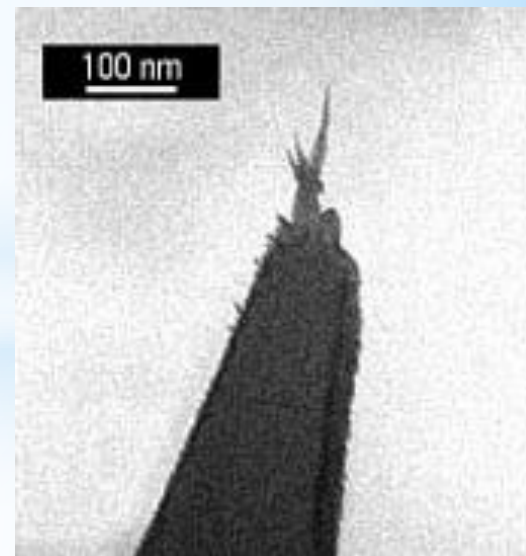


○ Режими на сканиране

- Контактен режим на сканиране - contact mode
- Безконтактен режим на сканиране - non-contact mode
- Режим на периодичен контакт - tapping mode



Стандартено острие от SiN

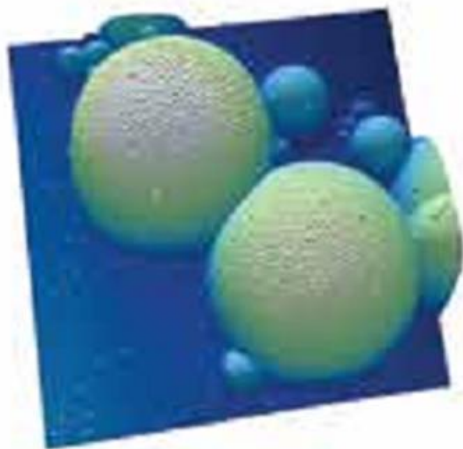


Диамантено острие

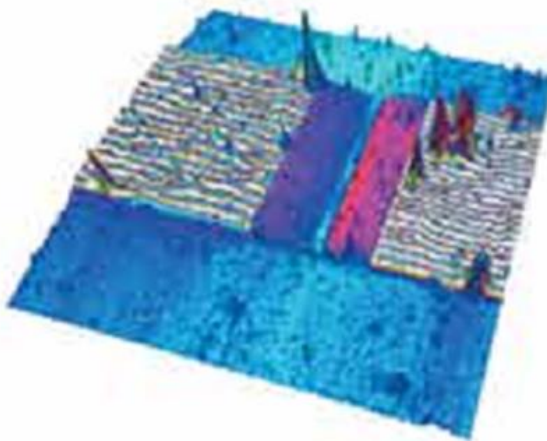


○ Възможности за приложение

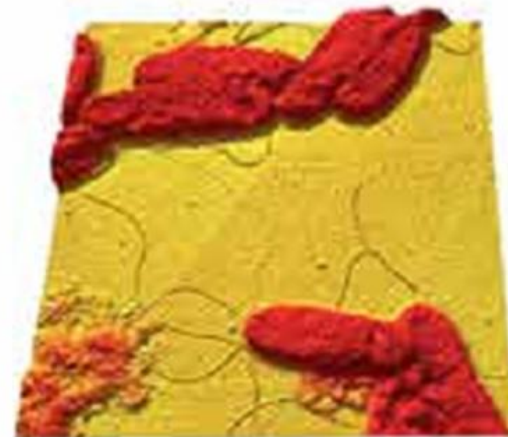
Materials Science



Devices



Life Science



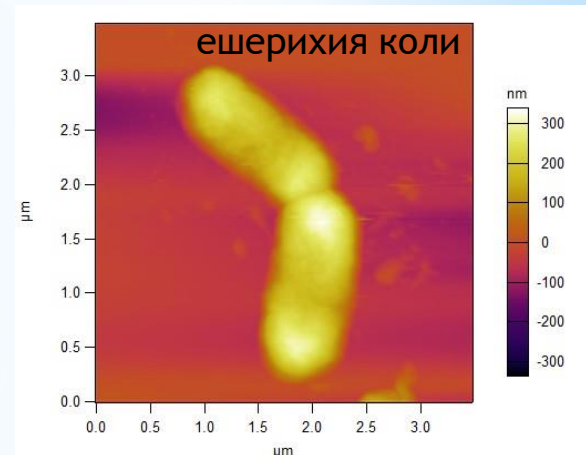
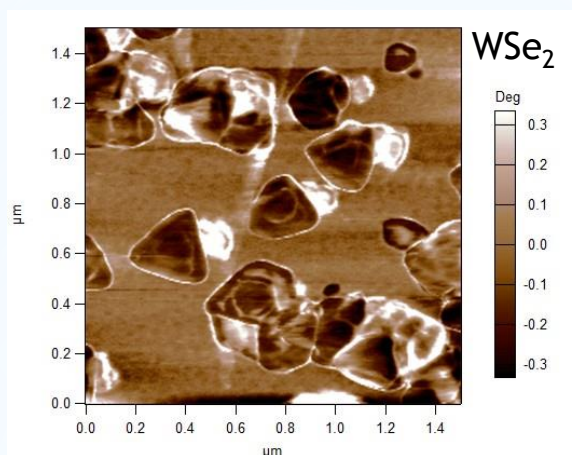
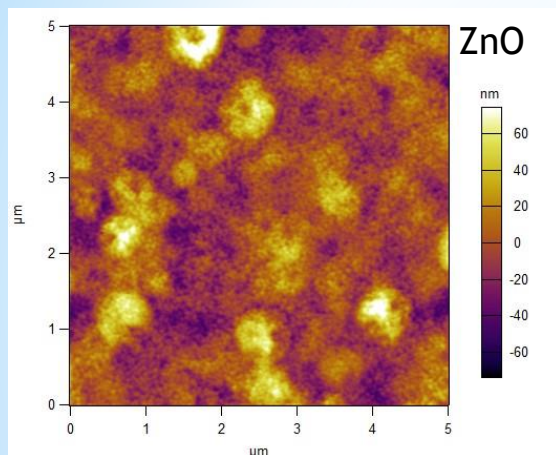
- Анализ на повърхностната грапавост; Анализ на дефекти в растежа; Анализ на размера на наночастици
- Във фазав режим - висока чувствителност към колебанията в свойствата на материалите, включително повърхностна твърдост, еластичност и адхезия.
- Чрез ин ситу AFM анализ с промени в температурата може да се изследват промените в структурата.



тънък слой

AFM изображение на
2D материал

биологични обекти



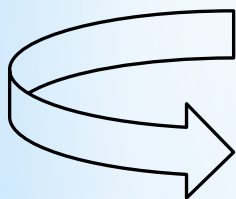
Предимства на AFM

- ✓ висока разделителна способност
- ✓ директно измерване на механичните свойства
- ✓ не се изисква допълнителна модификация на пробата
- ✓ възможност за използване на различни среди включително нативен разтвор за живи клетки



Кръвта е част от вътрешната течна среда на организма, осигуряваща му косвено връзка с външната среда. Тя е вискозна течност, която циркулира в затворена система от кръвоносни съдове

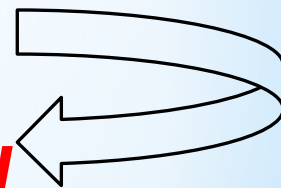
Състои се от:



Плазма

около 55%

- Вода ~ 92%
- Органични вещества - 6-8% (най-голяма концентрация на белтъци)
- Неорганични вещества ~ 1% (най-голяма е концентрацията на Na^+ Cl^-)
- Газове - O_2 , CO_2 и N_2



**Формени
елементи**

около 45%

- еритроцити (червени кръвни клетки)
- левкоцити (бели кръвни клетки)
- тромбоцити



Функции на кръвта:

Участва в
процесите на
кръвоспиране и
кръвосъсирване

Дихателна
осигурява пренос
на O_2 и CO_2

Трофична
пренася хранителни
вещества към
тъканите

Транспортна
транспорт на
хормони и др.

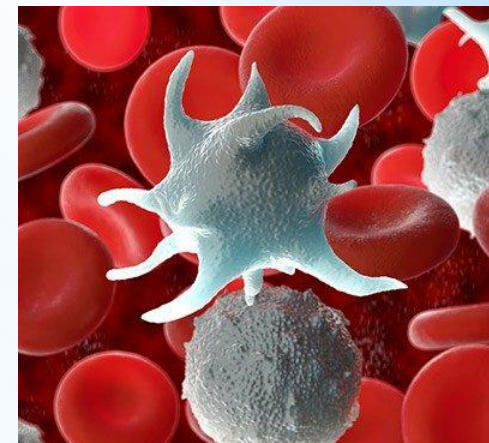
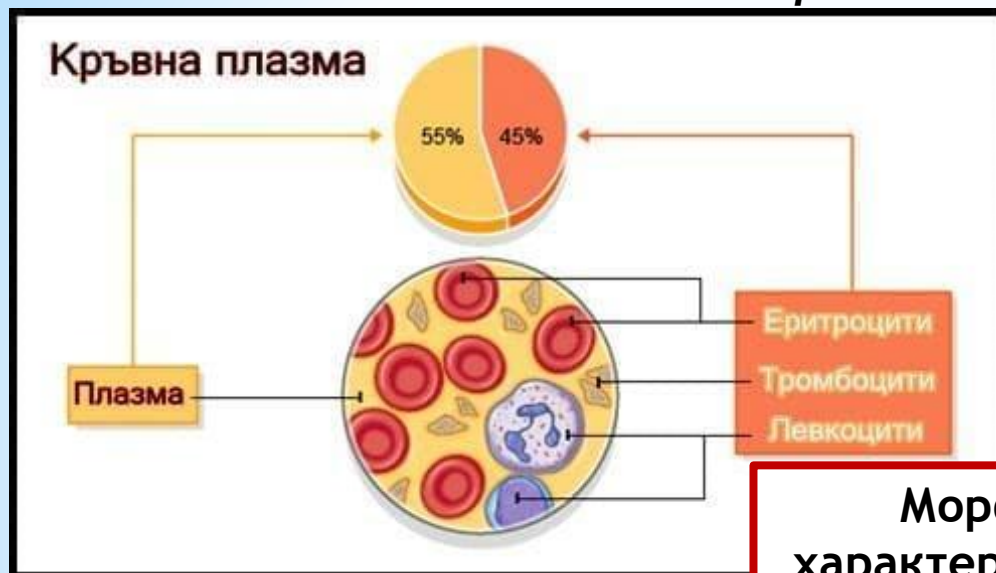
Екскреторна
пренася ненужните
метаболити до
бъбреците, белите
дробове, кожата и
тънките черва

Защитна предпазва
от микроорганизми и
чужди белтъци,
осигурява борба с
инфекциите

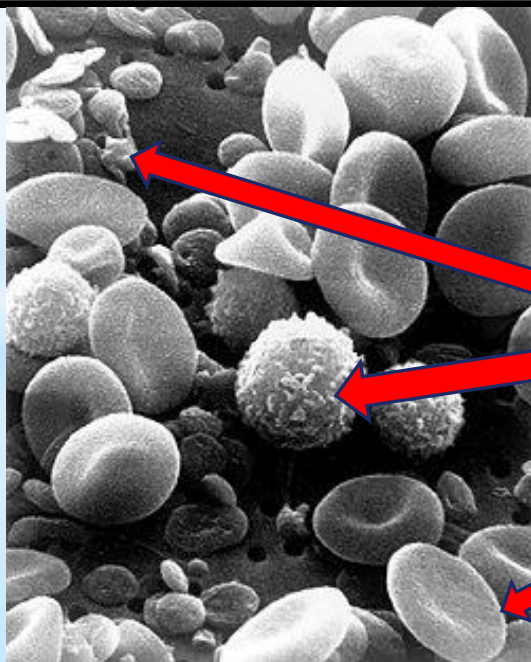
Терморегулаторна -
осигурява изотермия
чрез разпределение на
топлина в тялото

Регулира
алкално-
киселинното
равновесие

Регулира водния
баланс - чрез обмяна
на вода между
тъканите и плазмта

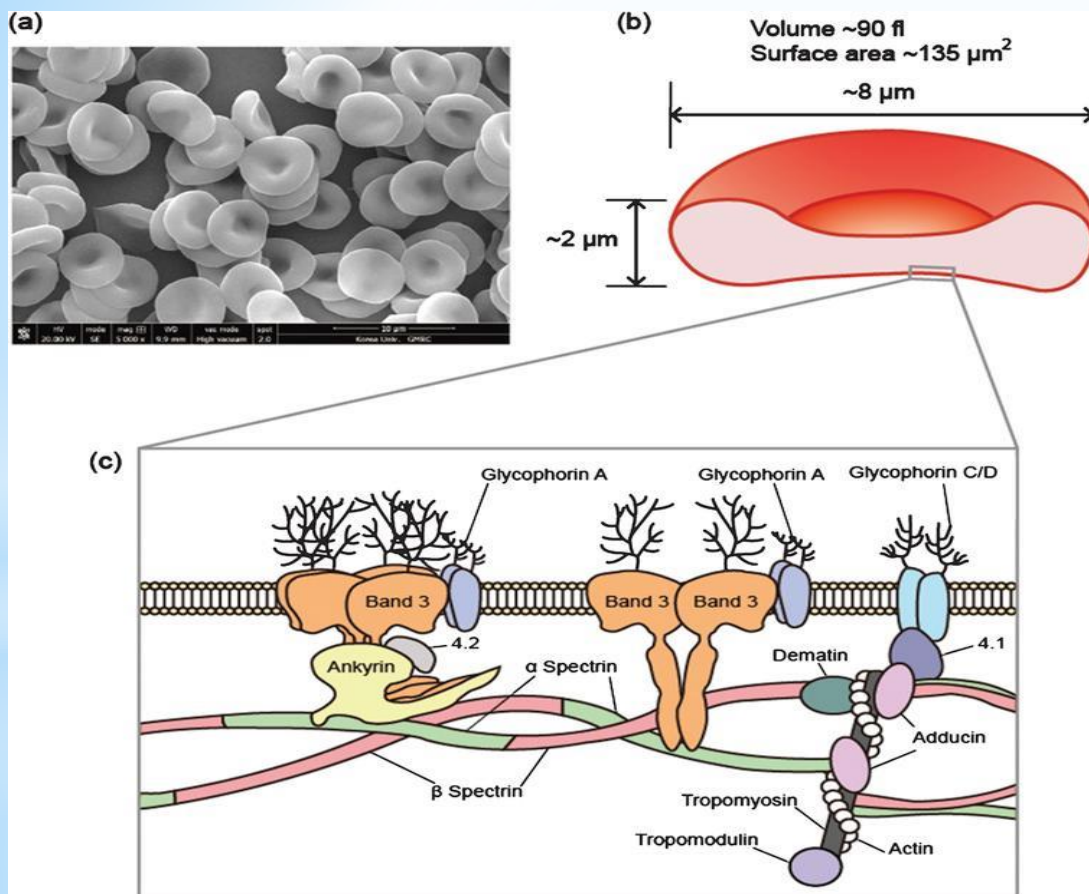


Морфологичните и механичните характеристики на кръвните клетки са от съществено значение за реологичните свойства на кръвта



Плазма (55%) —
Левкоцити и
тромбоцити (<1%)
Еритроцити (45%)





• Еритроцити

- ✓ Имат вискозоеластична клетъчна мембрана, която включва тънък протеинов скелет - цитоскелет
- ✓ Те са гъвкави и лесно деформируеми. Това се дължи на интегралната структура на клетъчната мембрана и на функционалните възможности на съставките, които я изграждат.
- ✓ Мембраните им не могат да издържат повече от 5-10% увеличение на площта без да настъпи хемолиза

❖ Основни функции:

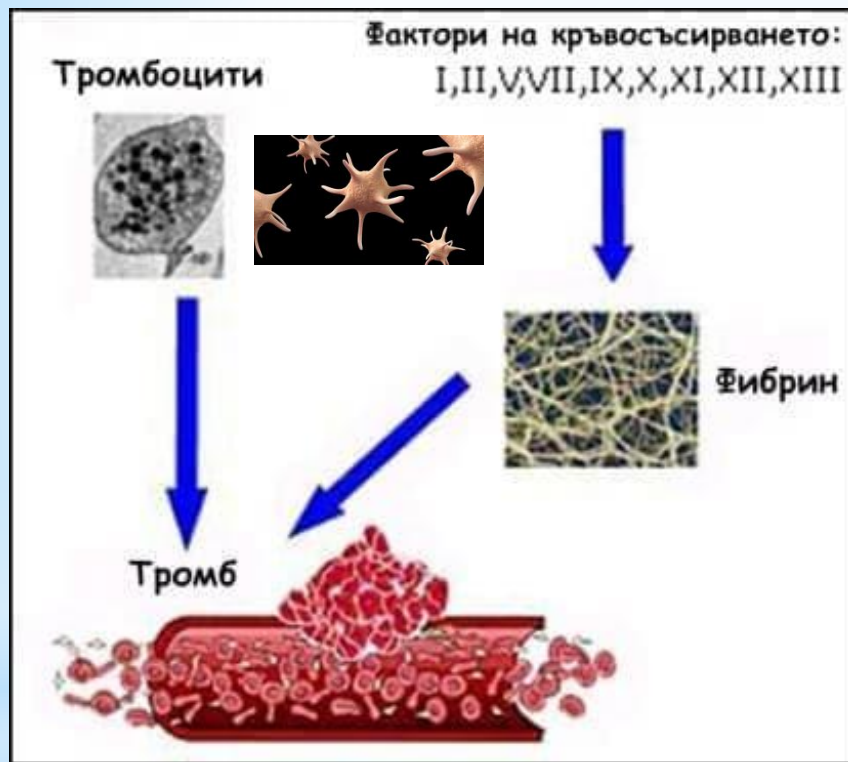
Участват в: Пренос на газове (O_2 и CO_2);

Като буфер в поддържането на киселинно-алкалното състояние в кръвта;

В регулацията на йонния състав на кръвта



• Тромбоцити



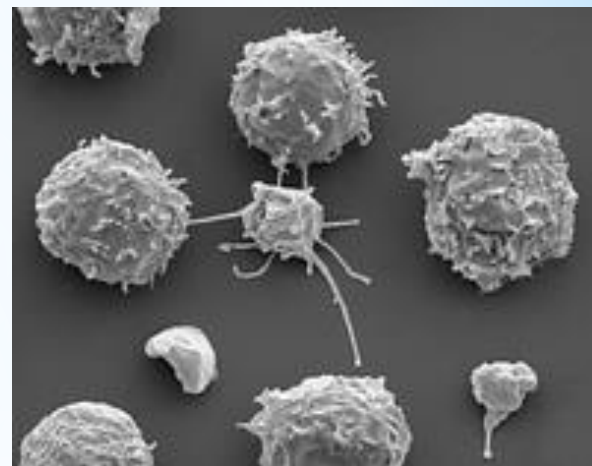
❖ Основни функции:

Участват в: Хемостазата;
Тромбозата; При възпаления;
Защитна функция; При образуване на
тумори; в ембрионалното развитие

- Преходът от неактивирани в активирани тромбоцити е свързан с промяна в биохимичните процеси и морфологията на тромбоцитите - от дисковидна форма с диаметър около 3 μm до плоска („разстлана“) форма с диаметър 7-10 μm
- Активирането на тромбоцитите настъпва при увреждане на кръвоносните съдове, респ. под действие на вазоактивни вещества, като напр. тромбин.
- Микрочастиците са важен регулаторен механизъм на физиологичните реакции, а също и патогенен компонент при много тромботични и хемостатични състояния, те индуцират тромбоцитната агрегация



• Левкоцити



❖ Основни функции:

Участват в: Унищожаване на различни инфекциозни и токсични агенти в тялото чрез разрушаването им посредством фагоцитоза; В образуване на антитела



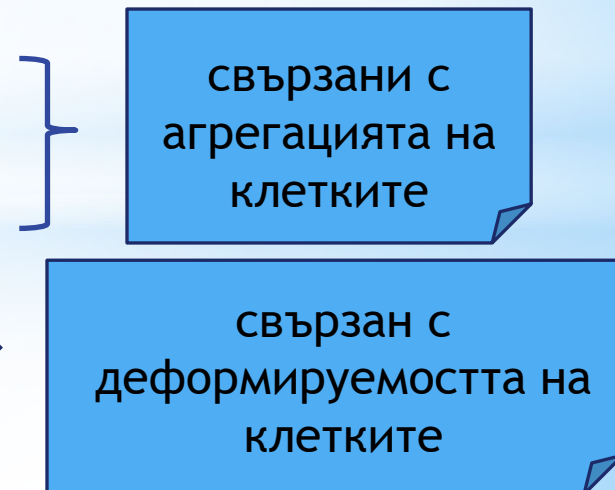
- Еритроцитите участват в хемостазата и тромбозата чрез техните биохимични, биомеханични и реологични свойства. Стареенето на еритроцитите е сложен физиологичен феномен, който също е от значение за някои патологични състояния.
- **Определянето на физикомеханични и биофизични характеристики на еритроцити в хода на тяхното стареене е от особен интерес.**
- Тромбоцитите играят първостепенна роля в хемостазата и всички етапи на сложния, динамичен процес на образуване на тромби. Клиничните проучвания показват, че хиперкоагулацията е основният патофизиологичен механизъм, който води до редица заболявания, в това число - прееклампсия; утероплацентарна недостатъчност и впоследствие до загуба на бременност; невродегенеративни заболявания, исхемична болест и др.
- **Активирането на тромбоцитите е пряко свързано с изменение на биофизичните им характеристики (наномеханични свойства, адхезивност, мембранен потенциал и др.).**



С помощта на AFM могат да се изследват не само морфологични (форма, размери на клетките и на отделни техни части, структура на мембраната, грапавост и др.), но и механични (модул на Юнг, сили на адхезия, деформация и др.) характеристики на клетките, които може да се използват като индикатори, отразяващи състоянието.

Отклонението на морфологичните и механичните показатели на клетките от стойностите им при здрави индивиди показва появата на патологични процеси.

- Промяна на формата и големината
- Промяна на повърхностната грапавост
- Определяне на модула на еластичност





Изследвани Патологии

- Рискава бременност
- ✓ Спонтанни аборти и
- ✓ Преeklampсия

- Невродегенеративни заболявания
- ✓ Болест на Паркинсон,
- ✓ болест на Алцхаймер и
- ✓ амиотрофична латерална склероза

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, Медицински университет- Плевен, Университетска клиника по акушерство и гинекология "Майчин дом"- София; МБАЛНП „Свети Наум“ -София

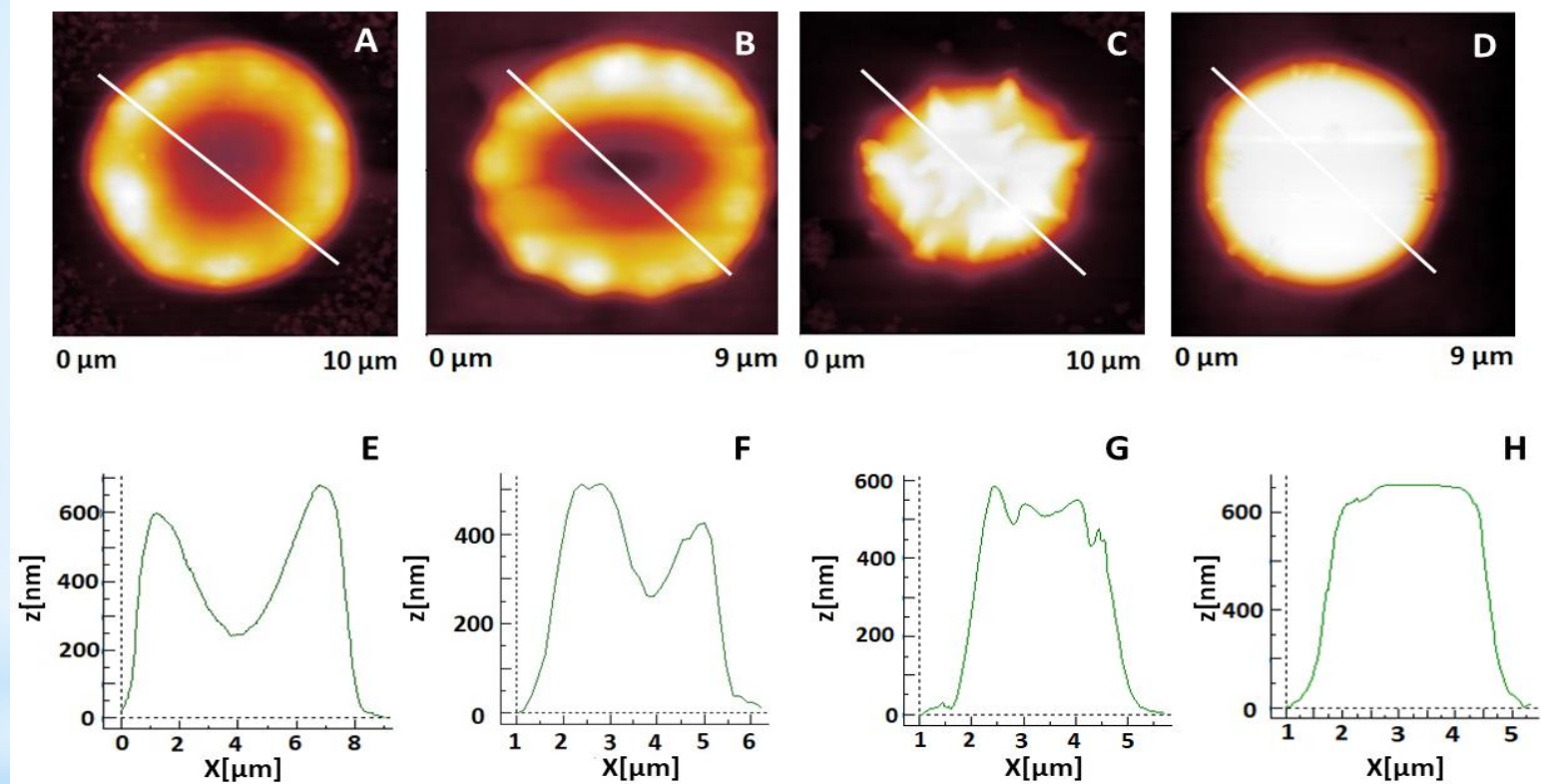


Изследвани групи пациентки и контроли

- ❖ Жени с ранна загуба на плода (EPL):**
- ❖ PE – жени с прееклапсия**
- ❖ Контролни групи:**
 - Жени без установена бременност (CNP)**
 - Жени с нормално протичаща бременност (CP)**



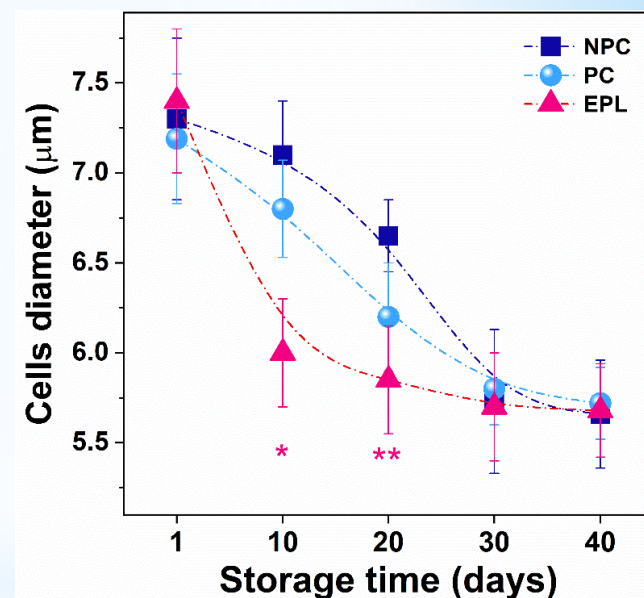
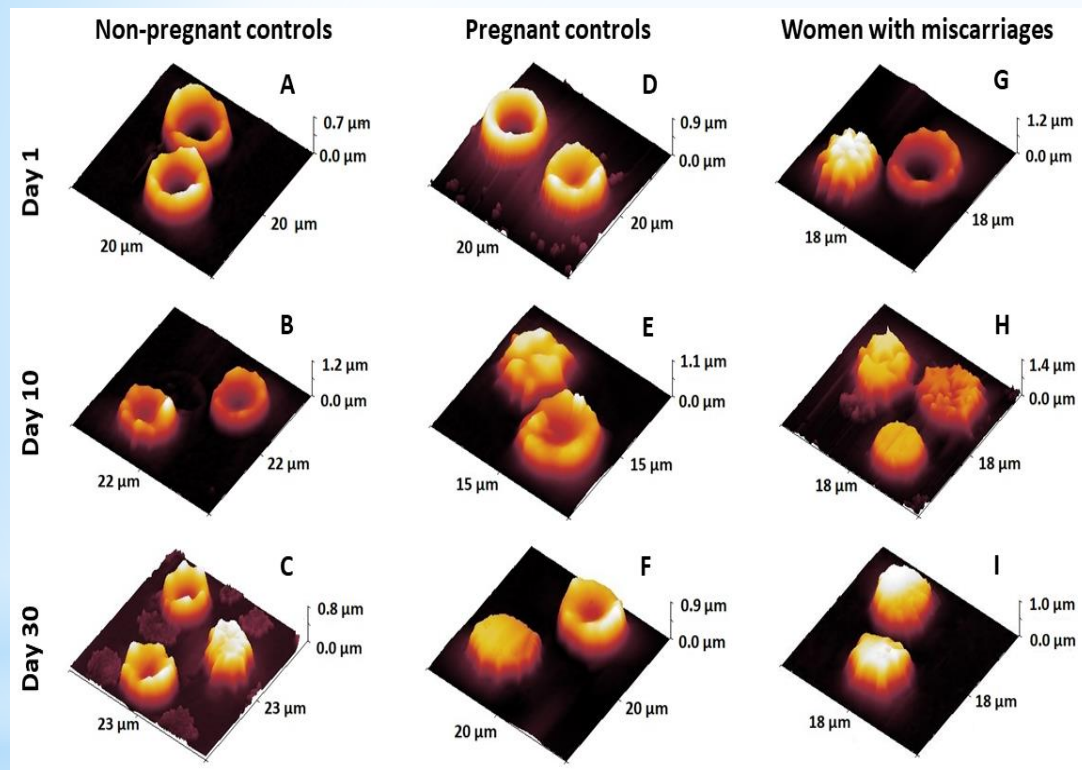
Повърхност и повърхностни свойства на еритроцити



AFM (2D) изображения на четирите морфологични класа еритроцити по време
(A) Двойновдълбнат диск; (B) Кренатит; (C) спикүлоцити и (D) сфероцити. Профил на напречно сечение на клетките, определени от бялата линия на AFM изображенията са представени съответно на изображения (E – H).

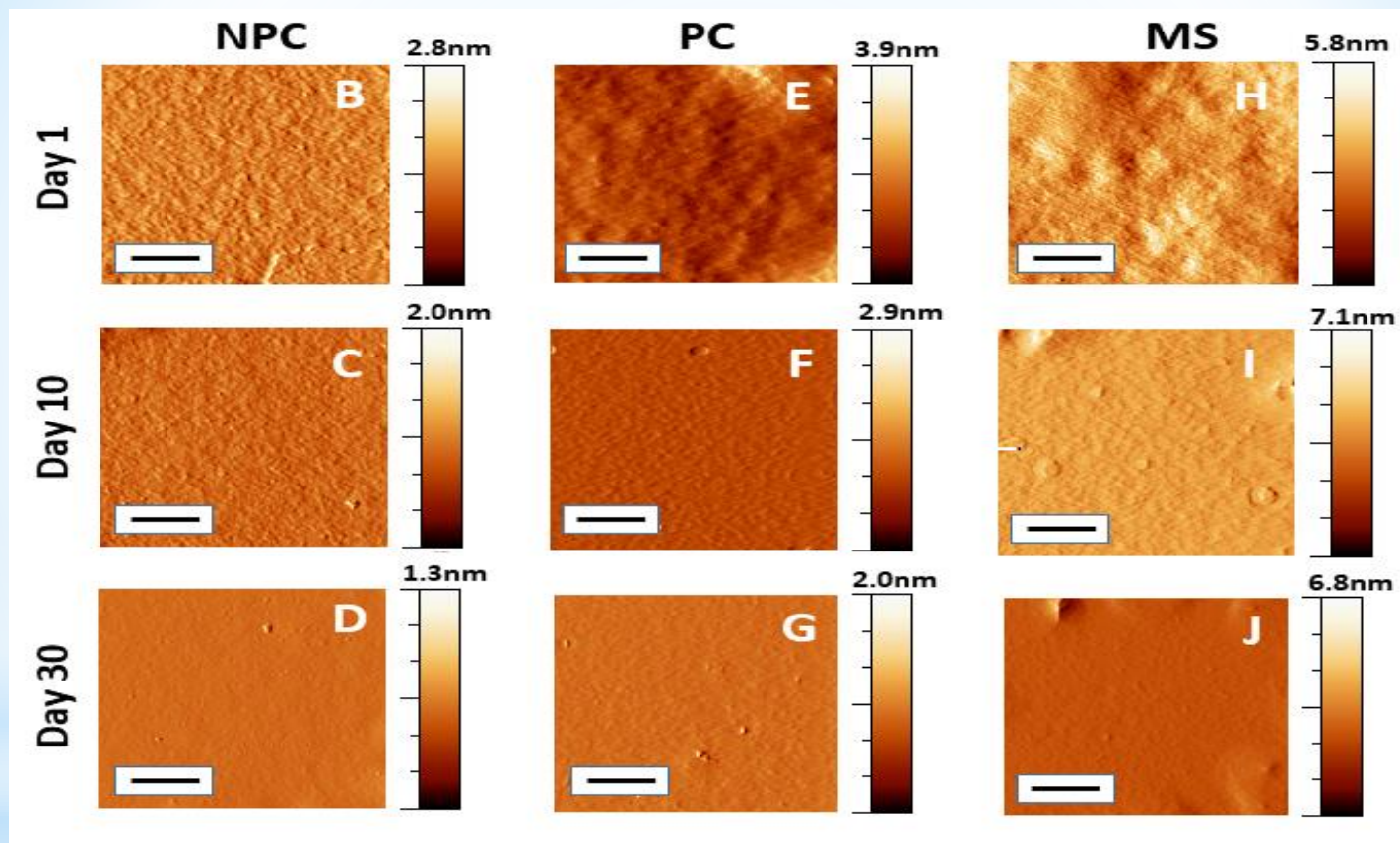


Морфологични промени на червени кръвни клетки в процеса на стареенето им



Избрани 3D изображения на червени кръвни клетки, демонстриращи морфологични промени в процеса на стареене на клетките изолирани от изследваните групи жени (CNP, CP и EPL) и зависимост на промяната на диаметъра на клетките от времето на стареене за същите групи.

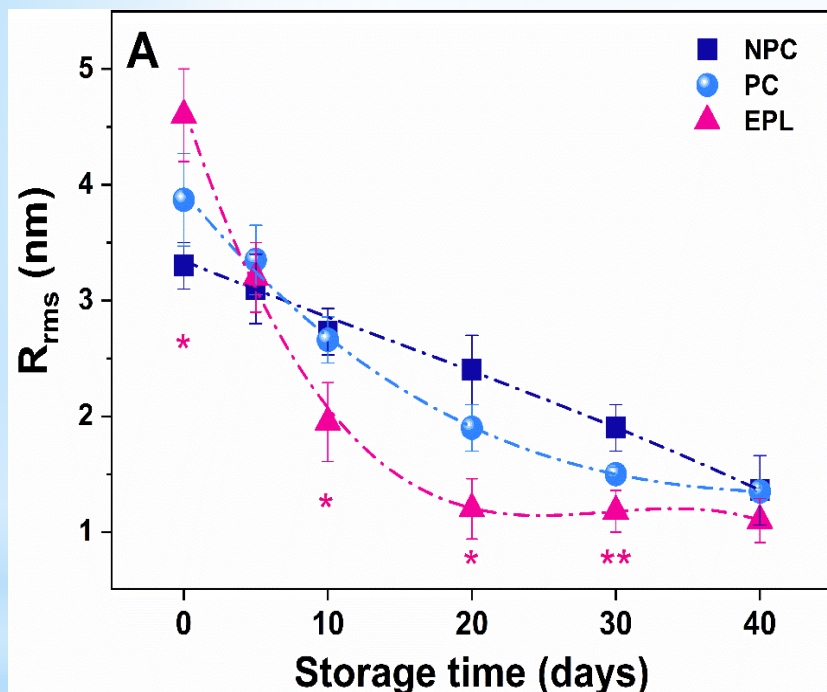
Langari, A., Strijkova, V., et al, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 9, 2022



2D изображения на ултраструктурните промени във времето на мембраните на еритроцитите на клетки, изолирани от небременни контроли (NPC) (B-D); бременни контроли (PC) (E-G); и жени с ранна загуба на бременност (EPL) (H-J). Маркерът е 500 nm.



Промяна на повърхностната грапавост на еритроцитите в процеса на тяхното стареене



- Грапавостта на мембраната на прясно изолирани еритроцити на жени с EPL е значително по-висока в сравнение с двете контролни групи
- линейна между ден 1 и 40-ти за CNP;
- Експоненциално намаляваща за клетките, получени от CP група;
- намалява драстично за EPL групата, достигайки крайната си стойност още на 20-ия ден.

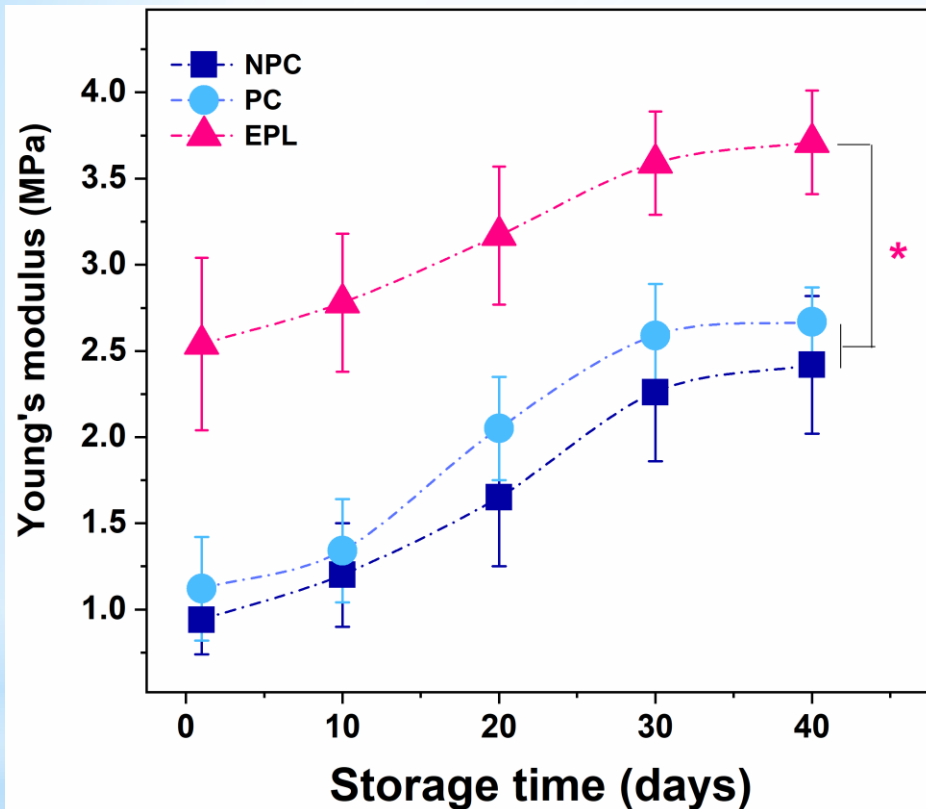
Langari, A., Strijkova, V., et al, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 9, 2022

$$R_{rms} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(z_i - z_m)^2}{(N-1)}}$$

z_i - височината на i -та точка
 z_m - средната височина на точките
 N - общия брой точки



Модул на Юнг на еритроцитите в процеса на тяхното стареене



Модел на Херц

$$E_{cell} = \frac{3.F}{4.\sqrt{R}.\delta^{\frac{3}{2}}} (1 - \nu^2)$$

δ е дълбочината на проникване на върха на сондата в пробата,
 F е силата на взаимодействие между върха на сондата и пробата,
 ν е коефициентът на Поасон
 R е радиусът на върха на кантилевера
Коефициент на Поасон за кръвните клетки е $\nu=0,5$

Стойности на модула на Юнг за стареене на еритроцити, определени на 1-ви, 10-ти, 20-ти, 30-ти и 40-ти ден след изолирането им от небременни контроли (NPC), бременни контроли (PC) и жени с ранна загуба на бременност (EPL).



Основни резултати

- ❖ Ултраструктурните промени на червените кръвни клетки от жени с ранна загуба на бременност настъпват много по-рано по време на стареенето на клетките в сравнение с тези на контролните.
- ❖ Грапавостта на мембраната на прясно изолирани червени кръвни клетки от жени с EPL е значително по-висока в сравнение с двете контролни групи.
- ❖ Различна тенденция на намаляване на грапавостта на мембраната за изследваните групи - много по-бързо за EPL в сравнение с контролните групи.

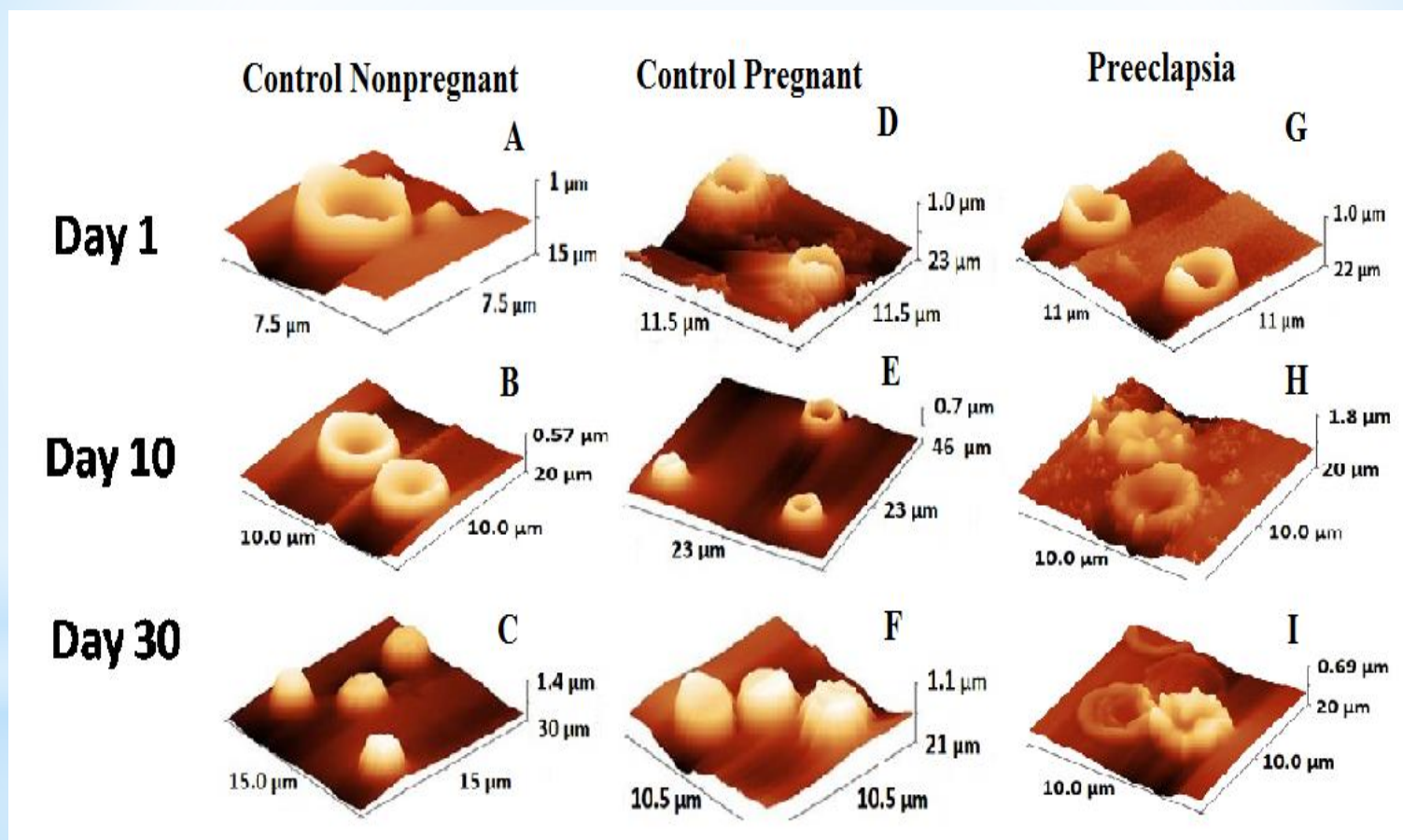


Изводи

- ❖ За първи път са идентифицирани специфични морфометрични характеристики на еритроцитите от жени с ранна загуба на бременност, които ги отличават от тези на здрави бременни и жени без установена бременност.
- ❖ Проучването разкрива съществени разлики в ултраструктурата на мембраната и еластичността на прясно изолирани EPL еритроцити в сравнение с тези на NPC и PC. Следователно грапавостта и стойностите на модула на Юнг на прясно изолирани еритроцити могат да се считат за индикатори за патологично състояние по време на бременност.
- ❖ Анализът на данните предоставя също доказателство за ускорено стареене на EPL червени кръвни клетки, характеризиращо се с ускоряване на морфологичната трансформация на формата и по-бърза поява на клетки със спикuloцитна и сферична форма.



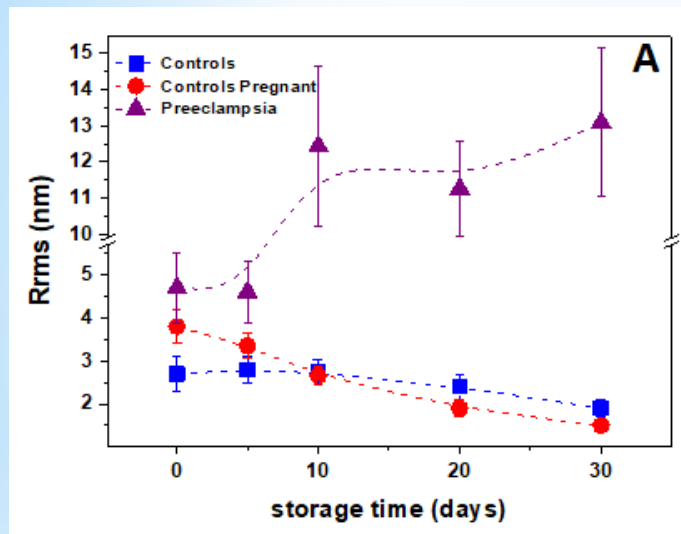
Морфологични промени на еритроцитите по време на процеса на стареене на клетките при жени с преекламписия



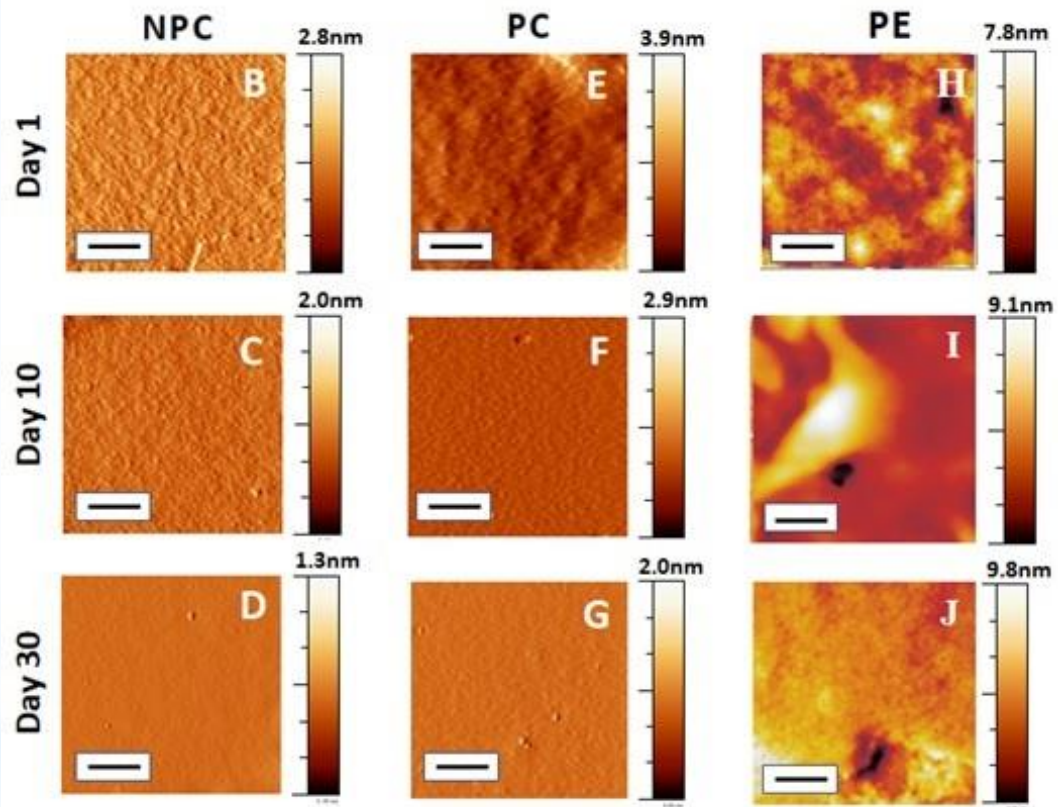
Избрани 3D изображения на еритроцити, изолирани от небременни жени (изображения А - С), здрави бременни жени в 3-ти триместър от бременността (изображения D - F) и пациентки с преекламписия (изображения G - I), демонстриращи морфологичните промени в процеса на стареене на клетките.



Ултраструктурни промени в клетъчната мембрана на червените кръвни клетки при жени с преекламписия



Group	Rrms (nm)	
	Fresh RBCs	Senescent RBCs
NPC	2.7±0.4	1.9±0.2
PC	3.8±0.4	1.5±0.1
PE	4.7±0.8	13±2.0



Изчислената стойност на Rrms на плазмената мембрана като функция от времето на съхранение на клетките (A) и ултраструктурните промени, настъпващи с течение на времето в мембраните на клетки от небременни контроли (NPC) (B–D); бременни контроли (PC) (E–G); и пациентки с преекламписия (PE) (H–J). Маркерът е 500 nm.



Акценти

Въз основа на нашите резултати можем да дефинираме следните биофизични маркери за преекламписия:

- наличие на пори и издатини върху повърхността на мембраната на прясно изолирани клетки
- експоненциално увеличаване на грапавостта на мембраната по време на стареенето на червените кръвни клетки
- наличие на червени кръвни клетки с необичайна наноморфология
- образуване на гостове в края на периода на проследяване



ИЗВОДИ

- Проучването разкрива съществени разлики в грапавостта на мембраната и ултраструктурата на прясно изолирани червени кръвни клетки, получени от пациентки с прееклампсия, в сравнение с тези на NPC и PC. Следователно стойностите на грапавостта на прясно изолирани еритроцити могат да се разглеждат като биофизични маркери за рисково състояние по време на бременност.
- Ускорено стареене на червените кръвни клетки на пациенти с PE, характеризира с:
 - ✓ ускорена трансформация на морфологичната форма и по-бърза поява на спикуюцитни и сферични клетки;
 - ✓ различен модел на промяна на грапавостта на мембраната с еволюцията на стареенето на клетките;
 - ✓ крехкост на плазмената мембрана, водеща до трансформация в гостове.

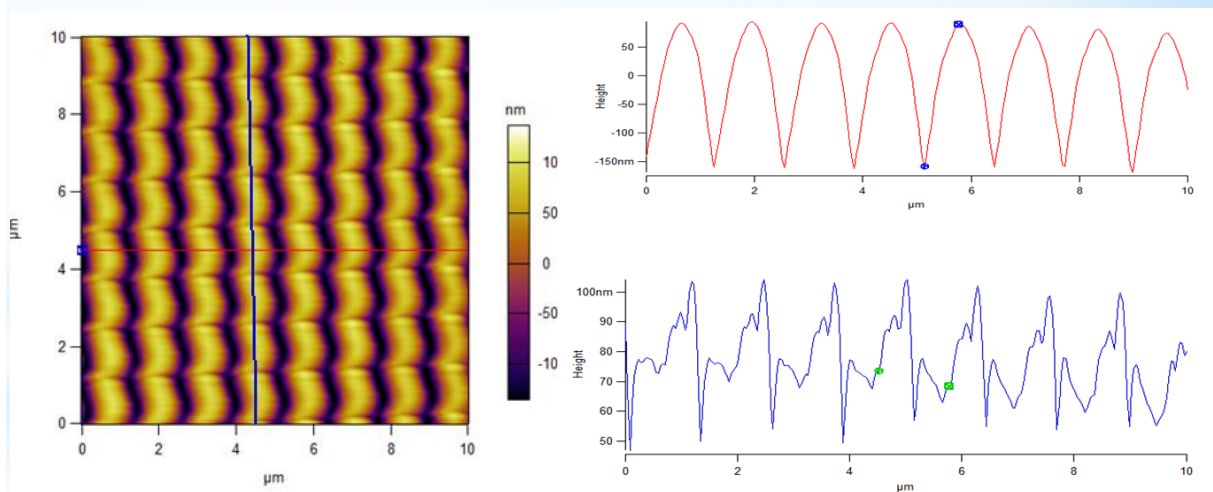
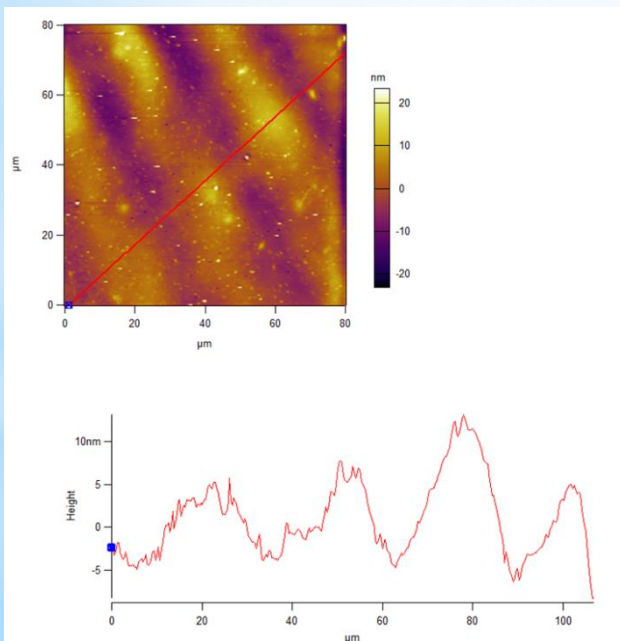


**Анализът на данните получени с
помощта на атомно силовия микроскоп
може да даде основа за разработването
на морфометричен алгоритъм за
разграничаване на различни
патологични състояния.**



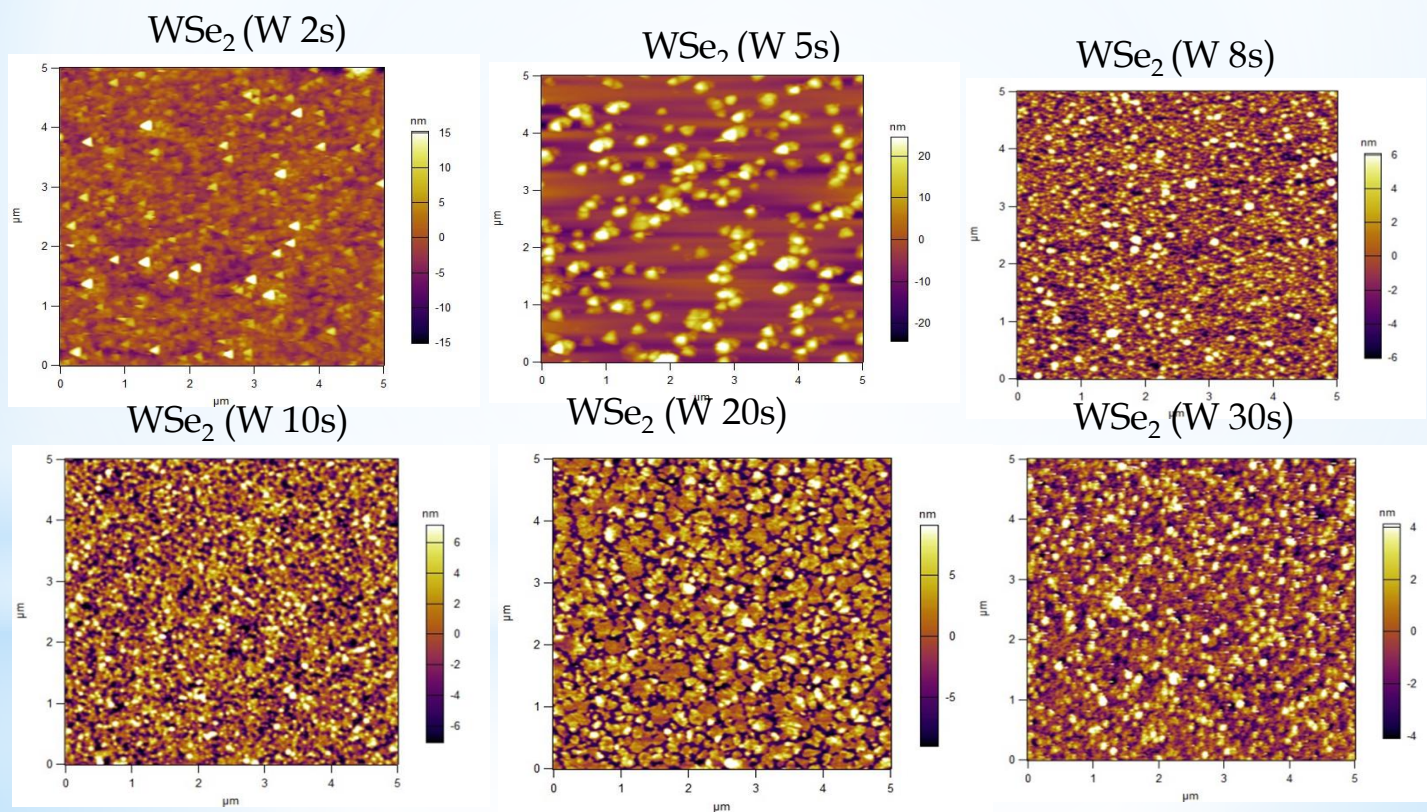
Бъдещите ми изследвания ще продължат в следните основни направления:

- Изследване на лазерно структурирани полимери с групата на проф. д-р Д. Назърова и проф. д-р Л. Неделчев от ИОМТ





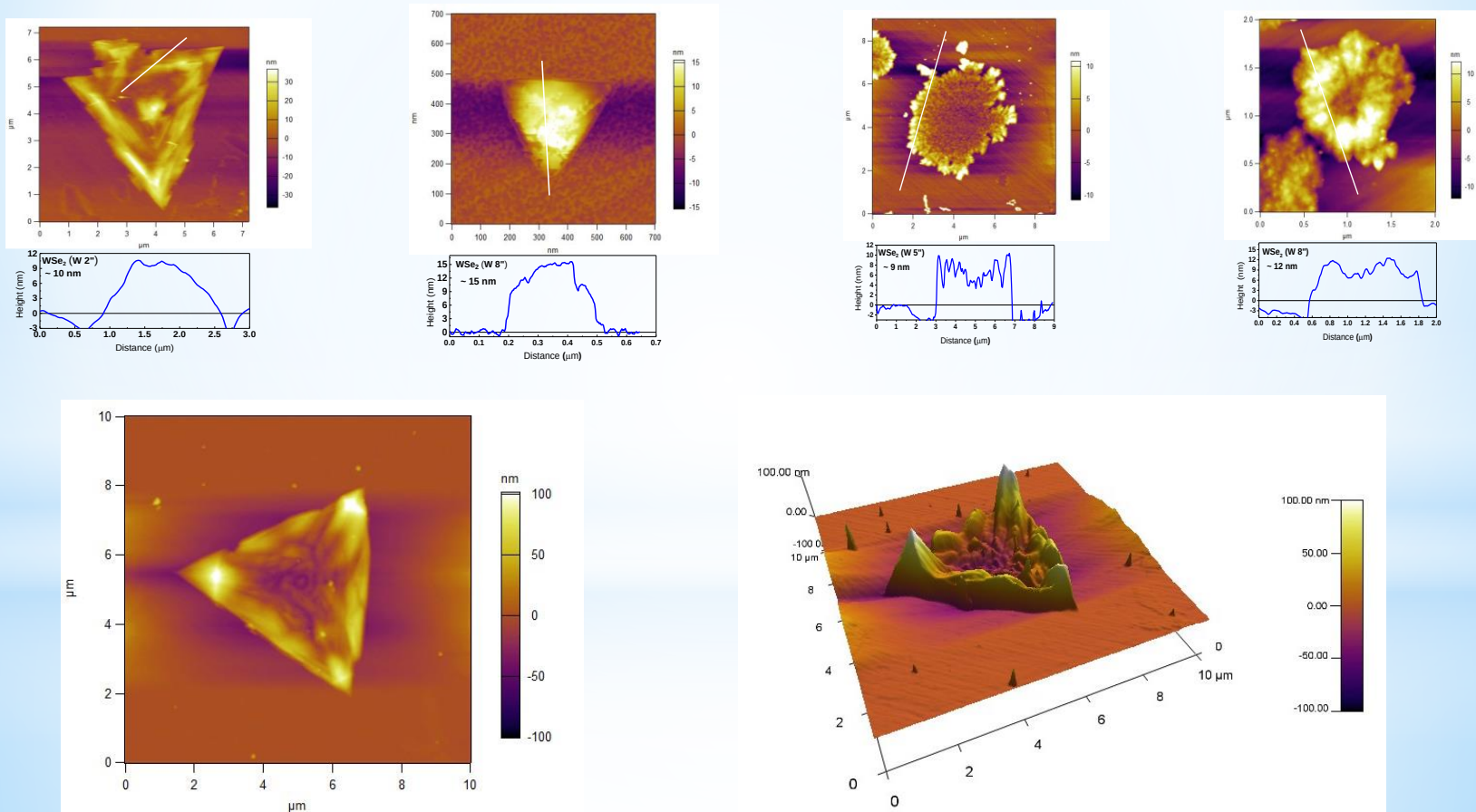
- Изследване на 2D материали и тънки слоеве получени чрез различна техника
с групата на проф. дн В. Маринова от ИОМТ





➤ Изследване на 2D материали

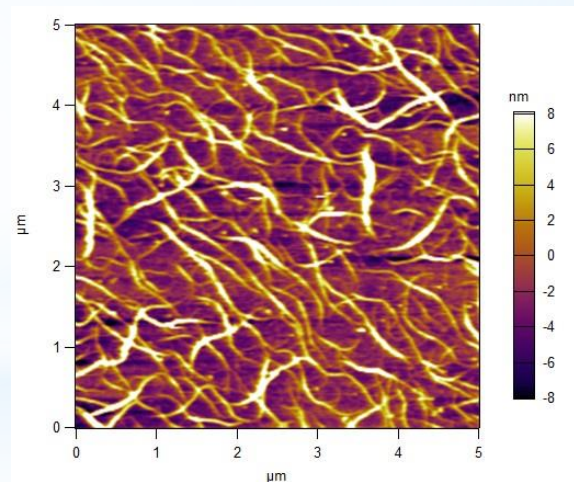
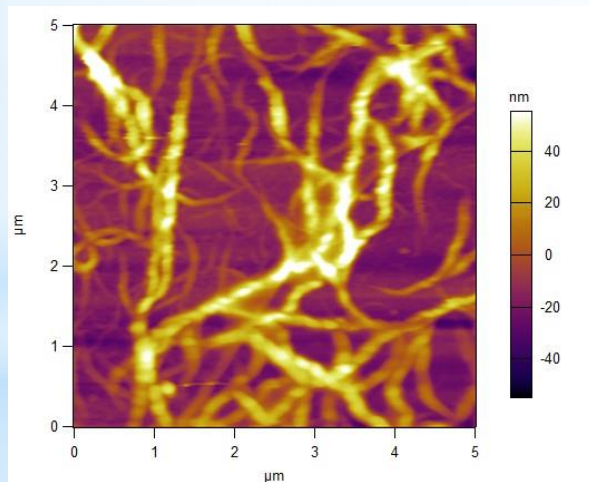
с групата на проф. дн В. Маринова от ИОМТ



2D и 3D изображение на WSe_2



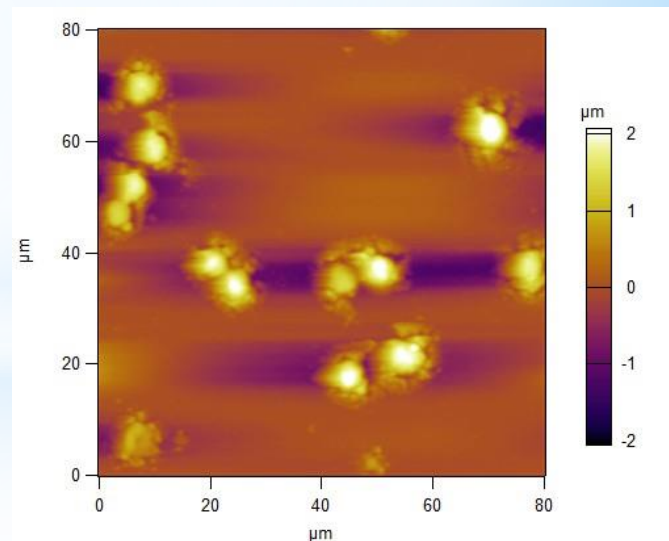
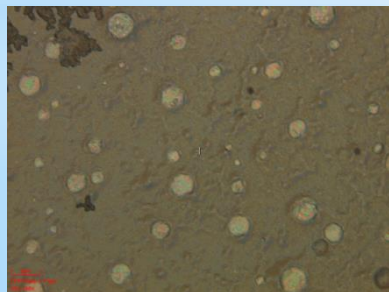
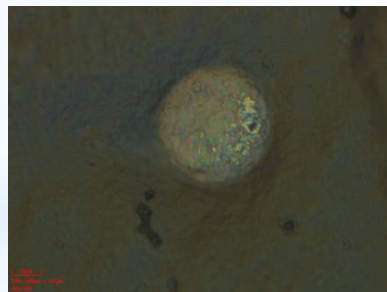
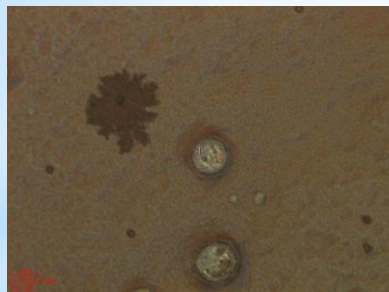
- Изследване процеса на модифициране/ремоделиране на разтворим колаген - с Института по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, Медицински университет - Плевен
- ✓ като *in vitro* модел за оксидативен стрес;
- ✓ като „колагеново скеле“ за *in vitro* тестване на биосистеми, които могат да се използват за медицински и фармацевтични приложения в твърда или течна форма, за производство на 2D или 3D структури.



Прилагането на AFM метода ще даде възможност да се определят оптималните условия и параметри за модифицирането на колагеновия хидролизат.



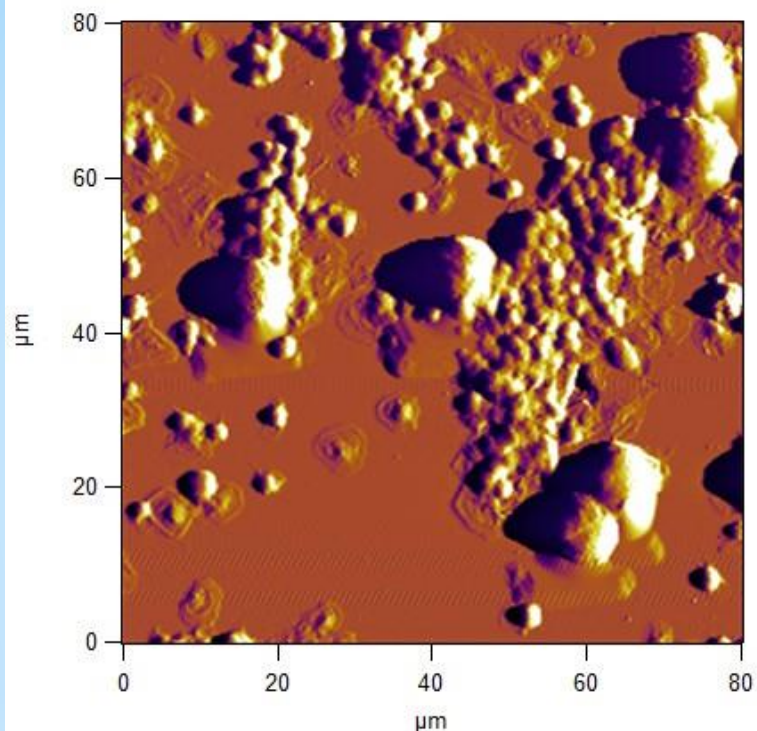
- **Биофизични подходи за диагностика на заболявания с Института по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, Медицински университет- София, УМБАЛ Царица Йоанна- ИСУЛ -София**
- ✓ Ще се разширят изследванията за приложение на атомно силовата микроскопия върху формени елементи и за други социално значими заболявания;
- ✓ Ще продължат изследванията върху наномеханичните свойства на формени елементи, изолирани от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания.



Оптично и AFM изображение на левкоцити

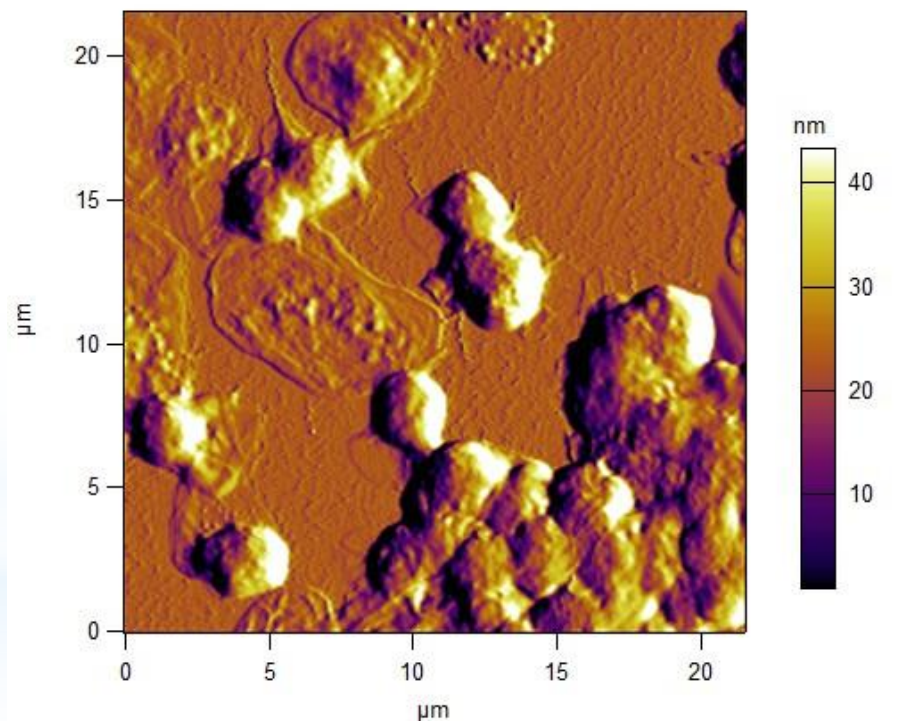
Благодаря на всички колеги за
съвместната работа и постигнатите
резултати

Благодаря



Тромбоцити и левкоцити

за вниманието



Тромбоцити