



Получено: 29.04.2023 г. | Принято: 8.05.2023 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.3-4.180.184>

Научная статья

3D-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

А.А.Трухова¹, студент, ORCID: 0000-0002-1695-287X

А.И.Ахметова^{1, 2}, мл. науч. сотр., вед. спец., ORCID: 0000-0002-5115-8030

И.В.Яминский^{1, 2}, д.ф.-м.н., проф. МГУ имени М.В.Ломоносова, генеральный директор Центра перспективных технологий, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Аннотация. Эритроциты являются одним из любимых объектов исследования в зондовой микроскопии. Во-первых, они легкодоступны, не требуют долгой и сложной пробоподготовки и, что самое главное, изобилуют отличительными особенностями, которые можно применять в клинической диагностике. Когда эритроциты циркулируют в крови, им необходимо проходить через узкие просветы капилляров, намного меньшие, чем размер их собственного поперечного сечения. Упругие свойства мембраны эритроцитов позволяют им проходить по кровяному руслу и доставлять необходимые вещества. Отношение площади поверхности к объему, вязкость цитоплазмы и внутренняя деформируемость мембран влияют на способность эритроцитов трансформироваться и проходить через узкие промежутки. Поэтому морфологические, структурные и физические характеристики клеток крови приобретают все более важное значение при исследовании различных заболеваний или оценке риска их развития.

Ключевые слова: эритроциты, эхиноциты, сканирующая зондовая микроскопия, бионаноскопия

Для цитирования: А.А. Трухова, А.И. Ахметова, И.В. Яминский. 3D-визуализация эритроцитов методами атомно-силовой микроскопии. НАНОИНДУСТРИЯ. 2023. Т. 16, № 3–4. С. 180–184. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.3-4.180.184>

Received: 29.04.2023 | Accepted: 2.05.2023 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.3-4.180.184>

Original paper

3D VISUALIZATION OF ERYTHROCYTES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

A.A.Truhova¹, Student, ORCID: 0000-0002-1695-287X

A.I.Akhmetova^{1, 2}, Junior Researcher, Leading Specialist, ORCID: 0000-0002-5115-8030

I.V.Yaminsky^{1, 2}, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., Director of Advanced Technologies Center, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Abstract. Erythrocytes are one of the favorite objects of study in probe microscopy. First, they are easily accessible, do not require long and complex sample preparation, and, most importantly, they are replete with distinctive features that can be used in clinical diagnostics. When red blood cells circulate in the blood, they need to pass through narrow capillary openings much smaller than their own cross-sectional size. The elastic properties of the membrane allow it to pass through the bloodstream and deliver the necessary substances. The ratio of surface area to volume, the viscosity of the cytoplasm, and the internal deformability of membranes affect the ability of red blood cells to transform and pass through narrow spaces. Therefore, the morphological, structural and

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical department, Moscow, Russia
² ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia



physical characteristics of blood cells are becoming increasingly important in the study of various diseases or in assessing the risk of their development.

Keywords: erythrocytes, scanning probe microscopy, bionanoscopia

For citation: A.A. Truhova, A.I. Akhmetova, I.V. Yaminsky. 3D visualization of erythrocytes by atomic force microscopy. *NANOINDUSTRY*. 2023. V. 16, no. 3-4. PP. 180-184. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.3-4.180.184>.

ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия зарекомендовала себя как отличный инструмент для исследования структурных и морфологических особенностей эритроцитов. Применительно к эритроцитам атомно-силовая микроскопия позволяет получать ряд важных характеристик клеток, многие из которых автоматически рассчитываются в программном обеспечении. С помощью АСМ можно получить морфометрический портрет клеток крови [1].

АСМ позволяет исследовать морфологические, наноструктурные, цитоскелетные и механические свойства эритроцитов, подвергшихся воздействию различных физических и химических факторов, а именно гемина, ионов цинка и длительному хранению [2]. На основании полученных экспериментальных данных был выделен комплекс важных биомаркеров, определяющих состояние клеток крови. Методами атомно-силовой микроскопии исследовали повреждающее действие солей кадмия на мембрану эритроцитов [3].

В работе [4] рассматривались эритроциты больных мегалобластной анемией (МА) с гемолизом (разрушение эритроцитов с выбросом гемоглобина в плазму крови): средняя шероховатость клеточной поверхности и площадь поверхности у опытной группы были значительно ниже, чем в контроле, а значение MCV у пациентов с МА было выше, чем у здоровых людей, что означает значительное снижение отношения площади поверхности к объему и снижению деформируемости. Такие эритроциты не могут выдерживать напряжения сдвига в процессе артериального кровообращения. Исследователями было выдвинуто предположение, что пониженная деформируемость клеток препятствует сохранению целостности клеток при микроциркуляции и в конечном итоге приводит к гемолизу.

В работе [5] оценивали морфологию эритроцитов и биохимические показатели у четырех групп: здоровые люди, люди с преддиабетом (PDC), с метаболическим синдромом (MSC) и группа с сахарным диабетом (DMG). Оценивались следующие морфологические параметры: высота, соотношение осей, глубина вогнутости диска, толщина, которые также связали с возрастом, значениями

INTRODUCTION

Atomic force microscopy has established itself as an excellent tool for investigating the structural and morphological features of red blood cells. For erythrocytes, atomic force microscopy provides a number of important cell characteristics, and a number of their characteristics were automatically calculated in special software. Using AFM, morphometric portraits of blood cells can be obtained [1].

AFM makes it possible to study the morphological, nanostructural, cytoskeletal and mechanical properties of erythrocytes exposed to various physical and chemical factors, namely hemin, zinc ions and long-term storage [2]. Based on the experimental data obtained, a set of important biomarkers determining condition of blood cells was identified. The damaging effect of cadmium salts on erythrocyte membrane was studied by atomic force microscopy methods [3].

In [4], erythrocytes of patients with megaloblastic anaemia (MA) with hemolysis (destruction of erythrocytes with the release of hemoglobin into the blood plasma) were examined: the average cell surface roughness and surface area in the experimental group were significantly lower than in controls, and the MCV value in patients with MA was higher than in healthy subjects, which means a significant decrease in the surface area to volume ratio and reduced deformability. Such erythrocytes cannot withstand the shear stresses of the arterial circulation. Researchers have hypothesised that reduced cellular deformability prevents preservation of cell integrity during microcirculation and ultimately leads to hemolysis.

In [5], erythrocyte morphology and biochemical parameters were assessed in four groups: healthy individuals, people with prediabetes (PDC), those with metabolic syndrome (MSC) and the diabetic group (DMG). The following morphological parameters were assessed: height, axis ratio, disc concavity depth, thickness, which were also related to age, glycated hemoglobin (HbA1c) values, triglycerides, body mass index, waist-to-hip ratio and physical inactivity.

AFM has shown that sickle-shaped red blood cells have a rougher surface and greater stiffness than normal red blood cells [6].

Considering the above-mentioned studies, the following parameters can be distinguished:



уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), триглицеридов, индексом массы тела, соотношением талии и бедер и отсутствием физической активности.

С помощью АСМ показали, что эритроциты серповидной формы имеют более шероховатую поверхность и большую жесткость, чем нормальные эритроциты [6].

Учитывая вышеупомянутые исследования, можно выделить следующие параметры:

- MCV – mean cell volume, средний объем одного эритроцита;
- шероховатость поверхности мембраны – выделяют среднюю Ra и среднеквадратичную Rq;
- деформируемость – отношение площади поверхности к объему.

Коэффициент уплощенности клеток (Q) – отношение площади проекции к высоте. Этот коэффициент характеризует степень пластичности клеток [7].

Все вышеуказанные параметры хорошо исследуются с помощью АСМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках данной работы исследовались эритроциты человека с помощью АСМ на воздухе в контактном режиме на поверхности покровного стекла, кантилевер марки CSG10. Атомно-силовая микроскопия выполнялась на зондовом микроскопе "ФемтоСкан". Время съемки кадра около 8 мин.

Обработка результатов проводилась в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн", которое позволяет создавать трехмерные изображения, строить контурную длину, проводить фильтрацию, обработку изображений и выполнять необходимые количественные вычисления: площадь, объем, периметр, наибольшую высоту, шероховатость объекта [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получены 3D-изображения эритроцитов в течение нескольких недель после перенесенного заболевания коронавирусной инфекцией (рис.1, 2), далее их сравнили с образцом от здорового человека (рис.3).

Все клетки имеют овальную форму, отсутствуют клетки с формой двояковогнутого диска, все клетки округлые, морфология поверхности имеет характерный рельеф с выпячиваниями средней высотой около 100–150 нм.

Общий размер клеток по сравнению с обычным портретом эритроцитов в АСМ отличается – уменьшается общая площадь клеток и периметр, но увеличивается объем (средние значения по шести клеткам для каждого случая приведены в табл.1).

На рис.3 представлено изображение эритроцитов здорового донора.

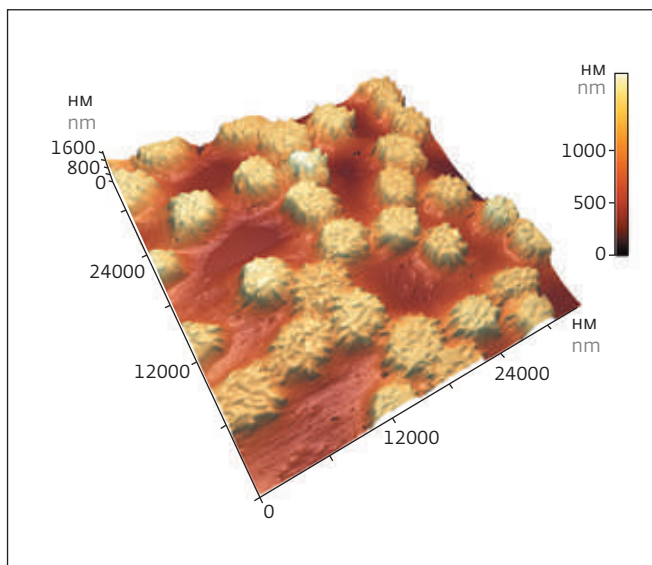


Рис.1. Изображение клеток крови на поверхности покровного стекла. Все клетки имеют характерную для эхиноцитов морфологию

Fig.1. Image of blood cells on the glass surface. All cells have morphology characteristic of echinocytes

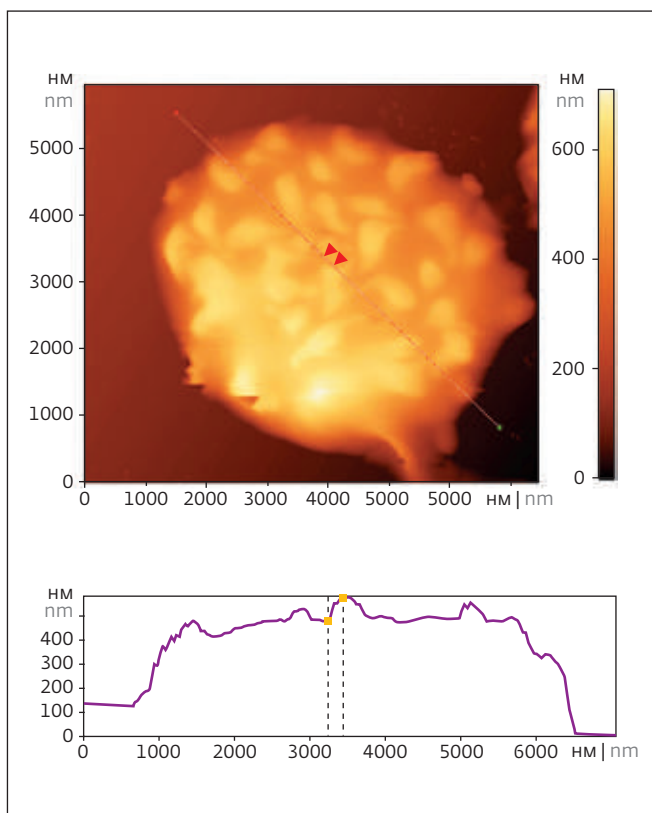


Рис.2. Эхиноцит и его сечение. Красными стрелками отмечен выступ, высота составляет 100 нм

Fig.2. Echinocyte and its cross section. Red arrows indicate the protrusion of 100 nm height



ВЫВОДЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Почти все клетки в исследуемом образце находятся в форме эритроцитов, хотя в образцах клеток от здорового донора количество эритроцитов в аналогичном поле зрения минимально или не наблюдается вовсе. Скорее всего, трансформация в эритроциты происходит в процессе пробоподготовки, можно предположить, что эритроциты чувствительны к изменениям среды и поэтому изменения происходят быстро в процессе взятия мазка и высыхания образца на покровном стекле. У здоровых доноров этот процесс протекает гораздо медленнее, клетки сохраняют форму двояковогнутого диска.

В работе [10] исследовали кровь больных COVID19, было показано, что в крови 80,6% больных как при поступлении, так и при выписке наблюдалась выраженная трансформация части эритроцитов в эхиноциты, доля эхиноцитов у больных составляла при поступлении в клинику $17,9 \pm 3,6\%$ от общего числа наблюдавшихся эритроцитов, при выписке уменьшалась до $12,1 \pm 2,1\%$.

С помощью атомно-силовой микроскопии можно увидеть морфологические и структурные особенности клеток крови. Особенно полезно, когда эти параметры можно связать с конкретными факторами или диагнозом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Фонду содействия инновациям (проект № 71108), работа А.И.Ахметовой поддержана РНФ (проект № 23-74-30003).

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

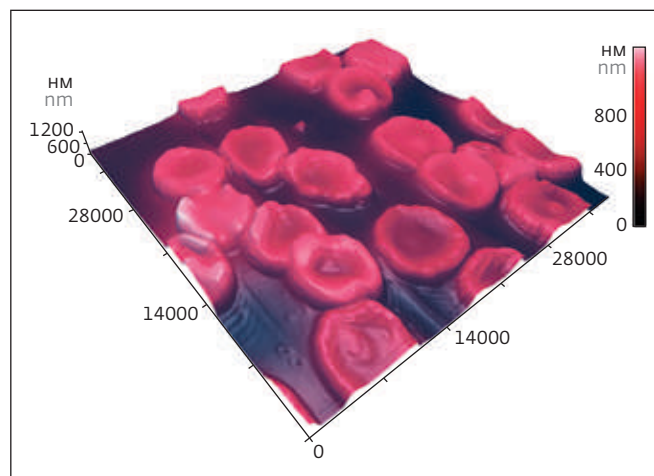


Рис.3. 3D-изображение эритроцитов здорового человека. Все клетки имеют характерную форму для эритроцита – двояковогнутого диска

Fig.3. 3D image of healthy human erythrocytes. All cells have the characteristic shape of erythrocyte (biconcave disc)

- MCV – mean cell volume, the average volume of one erythrocyte;
- membrane surface roughness – distinguish between average Ra and Rq (RMS);
- deformability – ratio of surface area to volume.

The coefficient of cell flattening (Q) is the ratio of projection area to height. This coefficient characterizes the cells plasticity degree [7].

All the above mentioned parameters are well investigated by AFM.

MATERIALS AND METHODS

As part of this work, human erythrocytes were examined by AFM in contact mode in air on a glass surface using CSG10 cantilever. Atomic force microscopy was performed on a FemtoScan probe microscope. Frame acquisition time of about 8 min.

The results were processed in FemtoScan Online software, which allows to obtain three-dimensional images, construction of contour lengths, filtering, image processing and making the necessary quantitative calculations:

Таблица 1. Измеренные значения периметра, площади, объема и шероховатости. Погрешность $\pm 10\%$

Table 1. Measured perimeter, area, volume and roughness values. Accuracy is in a range of $\pm 10\%$

	P, мкм μm	S, мкм ² μm^2	V, фл fl	RMS_Z, нм nm
Эритроциты после COVID19 Erythrocytes after COVID19	20	17	6,9	133,27
Здоровые эритроциты Healthy erythrocytes	28	39	6,4	105,27



ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sinitsyna O.V., Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy of erythrocytes: new diagnostic possibilities. *Medicine and High Technology* 1 (2022), PP. 9-12. <https://doi.org/10.34219/2306-3645-2022-12-1-9-12>
2. Sergunova V., Leesment S., Kozlov A., Inozemtsev V., Platitsina P., Lyapunova S., Onufrievich A., Polyakov V., Sherstyukova E. Investigation of Red Blood Cells by Atomic Force Microscopy. *Sensors (Basel)*. 2022 Mar 7;22(5):2055. <https://doi.org/10.3390/s22052055>
3. Demchenkov E.L., Nagdalian A.A., Budkevich R.O., Oboturova N.P., Okolelova A.I. Usage of atomic force microscopy for detection of the damaging effect of CdCl₂ on red blood cells membrane. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021. 208: 111683. <https://doi.org/10.1016/j.ecoen.2020.111683>
4. Wu Q., Liu J., Xu X., Huang B., Zheng D., Li J. Mechanism of megaloblastic anemia combined with hemolysis. *Bioengineered*. 2021. 12(1):6703-6712. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1952366>
5. Loyola-Leyva A., Loyola-Rodríguez J.P., Terán-Figueroa Y., Camacho-Lopez S., González F.J., Barquera S. Application of atomic force microscopy to assess erythrocytes morphology in early stages of diabetes. A pilot study. *Micron*. 2021. 141:102982. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102982>
6. Wang K., Li Z., Egin O., Wadgaonkar R., Jiang X.C., Chen Y. Atomic force microscopy reveals involvement of the cell envelope in biomechanical properties of sickle erythrocytes. *BMC Biol*. 2023. 21(1): 31. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01523-3>
7. Utkin D.V., Bulgakova E.G., Erokhin P.S., Kuznetsov O.S., Kuklev V.E., Osina N.A. *Izvestiya SSU New series. Series Chemistry. Biology. Ecology*, 2019. Vol. 19, 1. PP. 87-93.
8. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. FemtoScan Online software in virus research. *Nanoindustry* 2021. 14, 1 (103), PP. 62-67. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2021.14.1.62.67>
9. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I. FemtoScan Online software platform for biomedical applications and materials science. *Medicine and High Technologies*. 2018. 2. PP. 10-13.
10. Buryachkovskaya L.I., Melkumyants A.M., Lomakin N.V., Antonova O.A., Ermishkin V.V. Damage to the vascular endothelium and erythrocytes in patients with COVID-19. *Consilium Medicum*. 2021. 23 (6): PP. 469-476. <https://doi.org/10.26442/20751753.2021.6.200939>

area, volume, perimeter, greatest height, roughness of the object [8, 9].

RESULTS

3D images of erythrocytes were obtained for several weeks after having had a coronavirus infection (Fig.1, 2), and were then compared with a sample from a healthy person (Fig.3).

All cells are oval in shape, there are no biconcave disc-shaped cells, all cells are rounded, and surface morphology has a characteristic relief with prominences averaging about 100-150 nm in height.

The overall cell size differs from the normal red cell portrait in AFM - the total cell area and perimeter are reduced, but the volume is increased (the average values for the 6 cells for each case are shown in Table 1).

See also the image of red blood cells from a healthy donor on Fig.3.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Almost all cells in the sample tested are in the form of echinocytes, although in cell samples from a healthy donor the number of echinocytes in a similar field of view is minimal or not observed at all. Most likely, transformation into echinocytes occurs during sample preparation, suggesting that erythrocytes are sensitive to environmental changes and therefore changes occur rapidly during swabbing and specimen drying on the glass. In healthy donors this process is much slower and the cells retain their biconcave disk shape.

In [10] was examined COVID19 patients blood, it was shown that in the blood of 80.6% of patients both at admission and at discharge there was a marked transformation of part of erythrocytes into echinocytes; proportion of echinocytes in patients at admission was 17.9±3.6% of the total number of observed red cells, at discharge it decreased to 12.1±2.1%.

Atomic force microscopy can be used to see the morphological and structural features of blood cells. It is particularly useful when these parameters can be linked to specific factors or a diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Foundation for the Promotion of Innovation (project no. 71108). The study of A.I.Akhmetova was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-74-30003).

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



Четвертая российская конференция

ГРАФЕН

МОЛЕКУЛА И 2D КРИСТАЛЛ

14-18 августа 2023 года, г.Новосибирск

Новосибирский государственный университет
Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН
Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН
Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН
Сибирское отделение Российской академии наук

НАУЧНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ

- Развитие методов синтеза графена и родственных материалов
- Химическая модификация графена, низкоразмерных и гибридных 2D материалов
- Диагностика графена и низкоразмерных материалов
- Теория, строение и моделирование свойств графена и низкоразмерных материалов
- Электронные, механические, каталитические, электрохимические и другие свойства и приложения графена и других 2D материалов

ФОРМАТ КОНФЕРЕНЦИИ

Конференция будет проходить в очном формате, онлайн участие не предусмотрено. Конференция включает приглашённые (20-30 мин), устные (15-20 мин) и стендовые доклады. Во время конференции будут проводиться конкурсы на лучший устный и стендовый доклад среди молодых учёных. По итогам конференции будет выпущен сборник тезисов докладов в электронном виде с присвоением ISBN и DOI.

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ

Конференция будет проходить в Академгородке г. Новосибирска в Новосибирском государственном университете по адресу ул. Пирогова, 1 в 3307 аудитории нового корпуса.

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ ВЗНОС

8000 руб. для участников из ВУЗов, академических организаций и предприятий
4000 руб. для студентов и аспирантов

Включает: издание сборника тезисов и информационных материалов, аренду помещений, кофе-брейки, приветственный фуршет, культурную программу.

КЛЮЧЕВЫЕ ДАТЫ

Приём заявок (анкета) до **1 мая 2023 года**

Приём тезисов докладов до **1 мая 2023 года**

Окончание приёма оплаты оргвзноса **1 июня 2023 года**

РАЗМЕЩЕНИЕ

Иногородним участникам конференции предлагается размещение в гостинице "Золотая Долина" или в гостинице НГУ.

<http://grapheneconf.nsu.ru/> | e-mail: graphene@niic.nsc.ru | тел.: +7 383 330 53 52