

Использование атомно-силовой микроскопии в комплексной оценке органов и тканей при сахарном диабете

И.И. Поваляева¹, Т.В. Павлова², А.Н. Каплин³, Хазем Хсейно⁴, И.Ю. Гончаров⁵,
Л.А. Павлова⁴, М.А. Затолокина^{3,6}✉, А.В. Тверской⁴

¹ Детская областная клиническая больница, Белгород, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

⁴ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

⁵ Белгородский государственный технологический университет имени В.Г. Шухова, Белгород, Россия

⁶ Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

Аннотация. Исследование биологических объектов при помощи атомно-силовой микроскопии представляется перспективным направлением, поскольку позволяет сохранять их нативную структуру. Применение атомно-силовой микроскопии в целях изучения наноструктурных морфофункциональных изменений клеток различных тканей в норме и при патологии может помочь в накоплении новых сведений о патогенезе заболеваний, а также стать фундаментом в разработке новых подходов к их профилактике и лечению. Исследованию подвергались миоциты матки, зубы и эритроциты пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, а также условно здоровых пациентов без данной патологии. Проведенное исследование продемонстрировало возможность применения атомно-силовой микроскопии с целью изучения изменений тканей организма в условиях патологии.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, сахарный диабет, эритроциты, миоциты

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

The use of atomic force microscopy in the comprehensive assessment of organs and tissues in diabetes mellitus

I.I. Povalyayeva¹, T.V. Pavlova², A.N. Kaplin³, Hazem Hossino⁴, I.Yu. Goncharov⁵,
L.A. Pavlova⁴, M.A. Zatolokina^{3,6}✉, A.V. Tverskoi⁴

¹ Children's Regional Clinical Hospital, Belgorod, Russia

² First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, St. Petersburg, Russia

³ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

⁴ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

⁵ Belgorod State Technological University named after V.G. Shukhov, Belgorod, Russia

⁶ I.S. Turgenev Orel State University, Orel, Russia

Abstract. The study of biological objects using atomic force microscopy seems to be a promising direction, since it allows preserving their native structure. The use of atomic force microscopy to study nanostructural morphofunctional changes in cells of various tissues under normal conditions and pathologies can help accumulate new information about the pathogenesis of diseases, as well as become the foundation for the development of new approaches to their prevention and treatment. To study the possibilities of atomic force microscopy in studying pathomorphological changes in muscle, bone tissue and red blood cells in diabetes mellitus. The study demonstrated the possibility of using atomic force microscopy to study changes in body tissue under pathological conditions.

Keywords: atomic force microscopy, diabetes mellitus, red blood cells, myometrium

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) в современной биологии и медицине все больше претендует на роль одного из важнейших бионанотехнологических методов, что дает возможность работать с наноразмерными структурами [1]. Она относится к разряду прок-

симальной зондовой микроскопии. Во время работы в пределах около одного ангстрема между атомами образца и кантилевера образуются силы отталкивания, а на отдалении – притяжения. При использовании может быть как контактный режим, так и бесконтактный.

Применение АСМ делает уникальным исследование биологических объектов без применения фиксации, что сохраняет структуру и форму. Данный метод активно применялся нами для изучения различных тканей и органов в норме и патологии для визуализации с большим разрешением и объективной оценки механических свойств изучаемого объекта для выполнения как фундаментальных, так и диагностических задач в биологии и медицине [1, 2].

Эндокринопатии играют одну из преобладающих ролей в структуре заболеваемости в мире [3]. Сахарный диабет (СД) – это одна из патологий данной группы, которой в ближайшее десятилетие будет страдать до 10 % всех живущих на земле людей [3, 4]. АСМ раскрывает новые горизонты для ее исследования морфофункциональных особенностей данного заболевания, обеспечивая получение 3D-отображений поверхностных структур с возможным молекулярным разрешением, происходящих в режиме настоящего времени и в физиологических параметрах. Это является важным аспектом, дающим в дальнейшем возможность для разработки способов профилактики и лечения [5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение различных тканей (мышечной, на примере миометрия матки, костной – зубов, кровяной – эритроцитов) при СД для дополнения и уточнения имеющихся сведений по данной патологии.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологические исследования выполнялись на кафедре патологии медицинского института НИУ БелГУ, в Научно-образовательном и инновационном центре «Наноструктурные материалы и технологии» НИУ БелГУ, кафедре патологической анатомии КГМУ.

Производился забор тканей пациентов с СД 2-го типа: зубы пациентов с СД 2-го типа ($n = 15$) и контрольной группы ($n = 5$), удаленные по поводу косметических дефектов, а также миометрий матки, полученный при операции кесарево сечение (12 образцов от женщин с СД 2-го типа, 5 – от пациентов контрольной группы). Миометрий, после стандартной обработки, заливали в парафиновые блоки. Зубы обработке не подвергались. Работу выполняли в контактных режимах прерывистого, а также постоянного профиля с применением Si или SiN кантилеров, с использова-

нием низкого вакуума атмосферы. Дальнейший анализ и получение атомно-силового изображения произведены при помощи стандартного программного обеспечения NOVA и ImageAnalysis компании «НТ-МДТ».

Также с помощью атомно-силовой микроскопии произведено исследование эритроцитов (12 – с СД 2-го типа и 5 – контрольной группы). После забора крови у пациентов с СД 2-го типа ($n = 12$) и пациентов контрольной группы ($n = 5$) приготавливались образцы, состоящие из суспензии эритроцитов, предварительно отмытых от плазмы. После чего образцы поочередно размещали на обезжиренном предметном стекле и располагали во влажной камере Ntegra-Aura для проведения сканирования. Использование способа позволяет, помимо сокращения времени самого исследования, получать сканы клеток с высоким разрешением без нарушения их жизнедеятельности, формы и нативных размеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении эритроцитов с применением АСМ было отмечено, что у пациентов контрольной группы они имели дисковидную биконическую форму с умеренной глубиной полости (рис. 1). При этом площадь сечения частицы на уровне половины высоты эритроцита составляла $(44,1 \pm 3,3) \mu\text{m}^2$, объем – $(4,69 \pm 0,41) \mu\text{m}^3$, значение локального максимума – $(0,52 \pm 0,08) \mu\text{m}$, периметр сечения – $(33,22 \pm 1,40) \mu\text{m}$, эффективный диаметр, определяемый как диаметр окружности, площадь которой равна площади сечения – $(7,41 \pm 1,39) \mu\text{m}$ (табл.). Это были в основном дискоциты, в виде овала, преимущественно свободно располагающиеся.

При СД 2-го типа регистрировались изменения площади сечения эритроцитов на уровне половины высоты и составляли соответственно: $(32,5 \pm 1,12) \mu\text{m}^2$, $(4,10 \pm 0,21) \mu\text{m}^3$, $(0,69 \pm 0,11) \mu\text{m}$, $(44,09 \pm 2,03) \mu\text{m}$, $(6,35 \pm 0,20) \mu\text{m}$ (табл., рис. 1). Форма эритроцитов у пациентов с СД 2-го типа была нарушена при неизменном строении пор на их поверхности. Начало гемолиза, не определяемое другими методами, по данным АСМ было выражено в $(21,3 \pm 2,5) \%$ эритроцитов. $(3,5 \pm 0,7) \%$ клеток были с явными признаками данных изменений. Наблюдался стаз и сладж эритроцитов. В этих участках в эритроцитах выявлялось значительное нарушение формы, а также увеличение содержания выростов плазмолеммы.

Состояние эритроцитов в венозном русле у больных с сахарным диабетом 2-го типа

Исследуемые группы	n	Area, μm^2	Volume, μm^3	MaxZ, μm	Perimeter, μm	Diameter, μm
Контроль 36–59 лет	5	$44,10 \pm 3,3$	$4,69 \pm 0,41$	$0,52 \pm 0,08$	$33,22 \pm 1,40$	$7,41 \pm 1,39$
СД 2-го типа 36–59 лет	12	$32,50 \pm 1,12^*$	$4,10 \pm 0,21^*$	$0,69 \pm 0,11^*$	$44,09 \pm 2,03^*$	$6,35 \pm 0,20^*$

Примечание: Area – площадь сечения частицы на уровне половины высоты эритроцита; Volume – объем частицы; Max Z – значение локального максимума, высота эритроцита, отсчитанная от общего нулевого уровня; Perimeter – периметр сечения; Diameter – эффективный диаметр, определяемый как диаметр окружности, площадь которой равна площади сечения. * $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

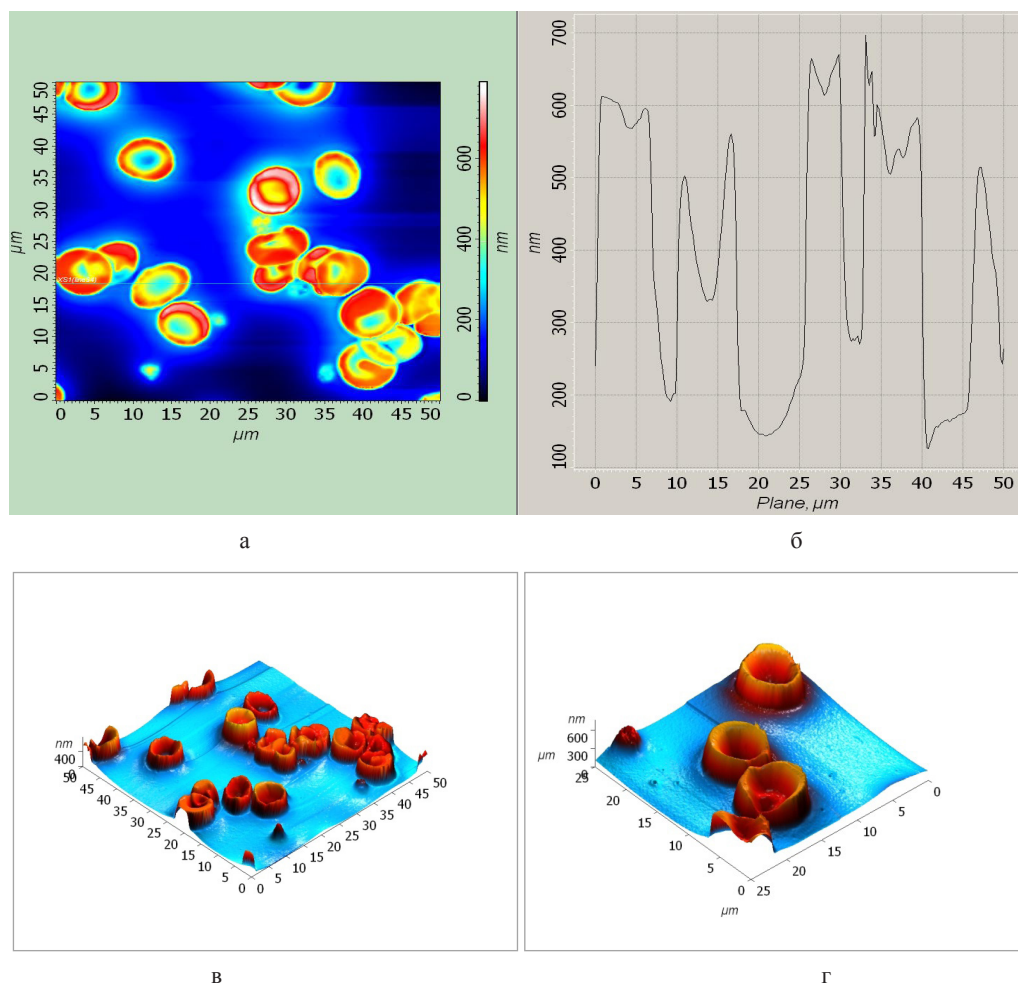


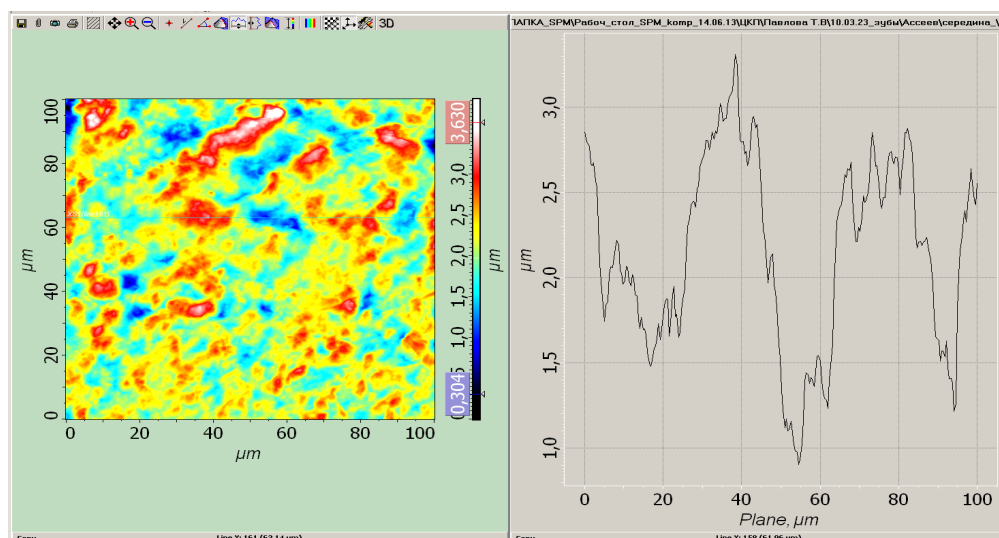
Рис. 1. Эритроциты больного с СД 2-го типа при атомно-силовой микроскопии:

а – гемолиз в отдельных клетках, форма части клеток изменена, глубина их полости увеличена; б – графическое изображение рис. 1а (двухмерное изображение); в – трехмерное изображения структуры эритроцитов; г – фрагмент рис. 1в

При топографическом анализе наружной части эмали зуба больных с СД 2-го типа с применением АСМ нами было выявлено нарушение поверхности, не выявляемое макроскопически, с нарушением микрорельефа, даже без наличия кариеса, когда зубы удалялись в связи с патологической подвижностью (рис. 2). Цемент был в виде хорошо выраженных волокон, которые представляют собой коллагеновые фибриллы. При трехмерной визуализации ткани зуба при СД видна разница его структуры в сравнении с интактными образцами. При эндокринопатии наблюдались изменения в виде дефектов поверхности корня, выраженного бугристого рельефа. Причем такие поражения при данной патологии могут быть и при отсутствии поверхностного кариеса. Поверхностная часть корня зуба покрыта от шейки до верхушки слоем бесклеточного цемента. Данный слой находится в пределах от 21 до 38 мкм. Клеточный цемент занимает меньшую площадь: от 0,92 до 1,31 мм в контрольной группе. У людей с СД этот участок был меньше – от 14 до 29 мкм. Наиболее характерной особенностью при СД является утончение и даже потеря цементного слоя в верхней трети корня, что ведет к оголению дентина (рис. 2).

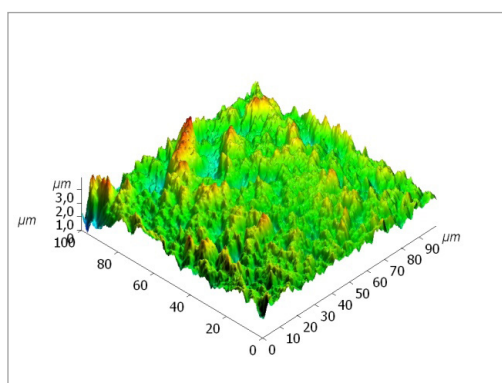
При СД 2-го типа в миометрии четко прослеживалась фрагментарная деструкция волокон с наличием между ними в отдельных участках диапедезных кровоизлияний в виде скопления эритроцитов с разрушением их формы, сладжем, тромбозом и гемолизом. Но наиболее характерными были изменения в сосудах.

Нарушения носили мозаичный характер с ишемией в одних участках с полнокровием и проявлением коагулопатии в других. Четко прослеживается изменения эндотелиоцитов с их утончением и уплощением поверхности за счет уменьшения содержания отростков плазмолеммы. Наблюдались альтеративные изменения, вплоть до фрагментарных некрозов. Именно в этих участках был виден выход эритроцитов за пределы сосудистой стенки. В полости наблюдалось прилипание эритроцитов, преимущественно с нарушением цитоархитектоники, к наружной поверхности эндотелиоцитов, также преимущественно в участках повреждения. Преимущественно в венозном отделе формировались тромбы и отдельные нити и пласты фибрина (рис. 3).

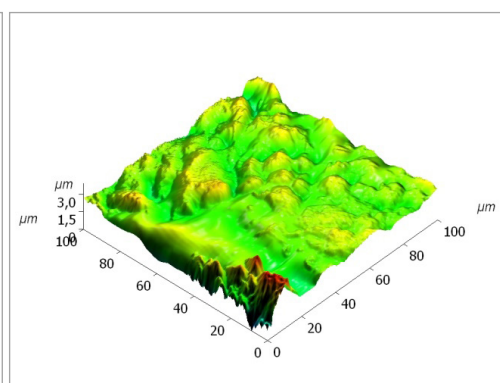


а

б



в

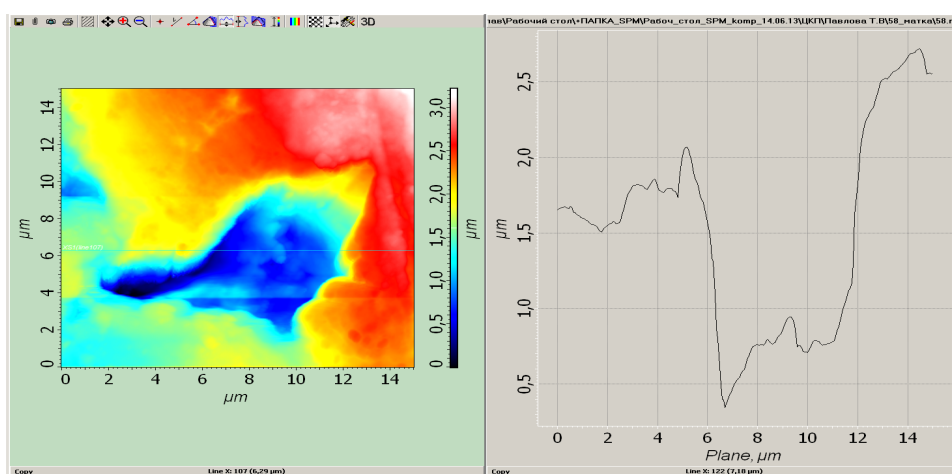


г

Рис. 2. Фрагменты коронки жевательного зуба 3.6 при СД 2-го типа. Эмаль. Отсутствие кариеса.

Нарушение строение микрорельефа, особенно в районе корня зуба:

а, б, в – атомно-силовая микроскопия коронки зуба; б – графическое изображение рис. 2а (двухмерное изображение);
в – трехмерное изображение; г – корень (трехмерное изображение)



а

б

Рис. 3. Фрагменты миометрия матки женщины с СД 2-го типа. Начало образования тромба в спиральной артерии матки (а, б, в) и его наличие (г). Атомно-силовая микроскопия. Б – графическое изображение рис. 3а (двухмерное изображение)

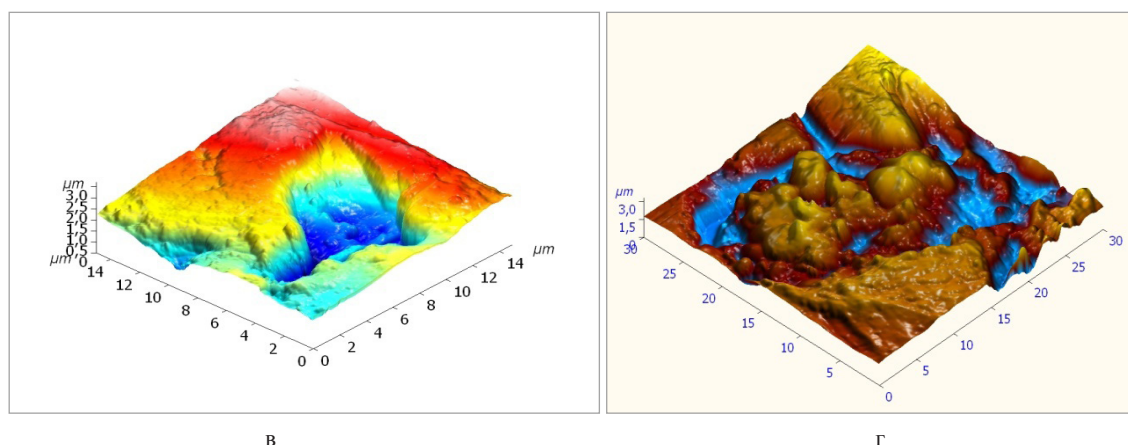


Рис. 3 (окончание). Фрагменты миометрия матки женщин с СД 2-го типа. Начало образования тромба в спиральной артерии матки (а, б, в) и его наличие (г). Атомно-силовая микроскопия. В – трехмерное изображение; г – трехмерное изображение

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование АСМ позволяет изучить любые ткани как в норме, так и при патологии, в частности при СД, как в нативном состоянии, так и на фиксированном материале, что дает возможность создавать целостную картину в трехмерном изображении для описания структуры материала с целью дальнейшей разработки профилактики, диагностики и лечения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Стародубцева М.Н. Атомно-силовая микроскопия клеток как метод изучения патогенеза и основа для разработки методов диагностики заболеваний. *Проблемы здоровья и экологии*. 2017;4(54):99–106.
2. Шерстюкова Е.А., Иноземцев В.А., Козлов А.П., Гудкова О.Е., Сергунова В.А. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. *Альманах клинической медицины*. 2021;49(6):427–434.
3. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 11-й вып. (доп.). М., 2023.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021. *Сахарный диабет*. 2021;24(3):204–221.
5. Pavlova T.V., Kulikovskij V.F., Pavlova L.A., Kaplin A.N., Povalyaeva I.I., Zemlianskaia L.O. New aspects in the study of

clinical and morphological new aspects in the study of blood in type II diabetes mellitus. *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*. 2020;7(2):128–133.

REFERENCES

1. Starodubtseva M.N. Atomic force microscopy of cells as a method for studying pathogenesis and the basis for the development of methods for diagnosing diseases. *Problemy zdorov'ya i ekologii = Problems of health and ecology*. 2017;4(54):99–106. (In Russ.).
2. Sherstyukova E.A., Inozemtsev V.A., Kozlov A.P., Gudkova O.E., Sergunova V.A. Atomic force microscopy in assessing the mechanical properties of erythrocyte membranes under the influence of various physico-chemical agents. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):427–434. (In Russ.).
3. Algorithms of specialized medical care for patients with diabetes mellitus. Edited by I.I. Dedov, M.V. Shestakova, A.Y. Mayorov. 11th issue (expanded). Moscow, 2023. (In Russ.).
4. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K., Zheleznyakova A.V., Isakov M.A. Epidemiological characteristics of diabetes mellitus in the Russian Federation: clinical and statistical analysis according to the data of the register of diabetes mellitus on 01.01.2021. *Sakharnyi diabet = Diabetes mellitus*. 2021;24(3):204–221. (In Russ.).
5. Pavlova T.V., Kulikovskij V.F., Pavlova L.A., Kaplin A.N., Povalyaeva I.I., Zemlianskaia L.O. New aspects in the study of clinical and morphological new aspects in the study of blood in type II diabetes mellitus. *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*. 2020;7(2):128–133.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Ирина Ивановна Поваляева – заместитель главного врача, Детская областная клиническая больница, Белгород, Россия; irina87iva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7231-6010>

Татьяна Васильевна Павлова – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; Pavlova@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2360-2875>

Антон Николаевич Каплин – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия; drkaplin46@gmail.com

Хазем Хсейно – аспирант кафедры стоматологии общей практики, Медицинский институт, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; Hossino@bsu.edu.ru

Игорь Юрьевич Гончаров – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры физики, Белгородский государственный технологический университет имени В.Г. Шухова, научный сотрудник Центра коллективного пользования, Белгород, Россия; goncharov@bsu.edu.ru

Любовь Арнольдовна Павлова – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологии, Медицинский институт, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; Lpavlova1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5537-2157>

Мария Алексеевна Затолокина – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Курский государственный медицинский университет, Курск; заведующая кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия; marika1212@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

Алексей Владимирович Тверской – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой анатомии и гистологии человека, Медицинский институт, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия; tverskoy@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1537-6564>

Статья поступила в редакцию 31.01.2025; одобрена после рецензирования 03.03.2025; принята к публикации 19.05.2025.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Irina I. Povalyaeva – Deputy Chief Physician, Children's Regional Clinical Hospital, Belgorod, Russia; irina87iva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7231-6010>

Tatyana V. Pavlova – MD, Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology, First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia; Pavlova@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2360-2875>

Anton N. Kaplin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy, Kursk State Medical University, Kursk, Russia; drkaplin46@gmail.com

Hazem Hossino – Postgraduate Student of the Department of General Dentistry, Medical Institute, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; Hossino@bsu.edu.ru

Igor Yu. Goncharov – Candidate of Physico-Mathematical Sciences, Associate Professor of the Department of Physics, Belgorod State Technological University named after V.G. Shukhov, Researcher at the Center for Collective Use, Belgorod, Russia; goncharov@bsu.edu.ru

Lyubov A. Pavlova – MD, Professor, Department of Pathology, Medical Institute, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; Lpavlova1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5537-2157>

Maria A. Zatolokina – MD, Professor of the Department of Histology, Embryology, and Cytology, Kursk State Medical University, Kursk; Head of the Department of Histology, Cytology, and Embryology, I.S. Turgenev Orel State University, Orel, Russia; marika1212@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

Alexey V. Tverskoi – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Human Anatomy and Histology, Medical Institute, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; tverskoy@bsu.edu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1537-6564>

The article was submitted 31.01.2025; approved after reviewing 03.03.2025; accepted for publication 19.05.2025.