

УДК 576.3.314 579.23.234

**О.В. Карбань, Ю.Г. Васильев, В.В. Жаров, П.А. Перевозчиков, С.И. Леесмент,  
С.В. Тимофеев**

**СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК МЕТОД  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОЙСТВ МЕХАНОАКТИВИРОВАННЫХ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ И РЕАКЦИИ НА НИХ ТКАНЕВЫХ  
СТРУКТУР ГЛАЗА**

*Методом сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) изучены изменения тканей передней поверхности стенки глаза при введении наноразмерного механоактивированного биологического материала. В ходе применения данного метода показана возможность объективной оценки основных составляющих биополимерных клеточных и неклеточных соединений с помощью спектрального анализа срезов биологических объектов. Показано, что использование наноструктурированной плаценты ускоряет проникновение трансплантата в склеру реципиента и инициирует образование новых соединительно-тканых структур. Выявлены различия в структуре зрелых и новообразованных коллагеновых волокон. Полученные данные указывают на возможную перспективу применения биоcontainers с наноструктурированной плацентой человека в лечении прогрессирующей близорукости, дистрофий сетчатки, частичной атрофии зрительного нерва, некоторых других заболеваний глаз.*

*СЗМ; наноразмерный биологический материал; ткани глаза.*

**O.V. Karban', Y.G. Vasil'ev, V.V. Zharov, P.A. Perevozhikov, S.I. Leesment,  
S.V. Timofeev**

**USAGE OF SCANNING PROBE MICROSCOPY FOR INVESTIGATION  
OF MECHANOACTIVATED BIOLOGICAL MATERIALS PROPERTIES  
AND THEIR IMPACT ON TISSUE EYE STRUCTURE**

*Changing the fibrous capsula of the eyeball treated by injection of nanosizemechanoactivated biological substance was investigated with usage of Scanning Probe Microscopy (SPM). It was shown that usage of this method together with spectral analysis of cuts provides the way for impartial assessment of main components of cellular and non-cellular biopolymer. The using nanostructured human placenta was showed to accelerate penetration of the graft in recipient sclera and give rise to the forming novel conjunctive tissue. The novel collagen fibrils showed fibrillar properties that were different from those of the mature fibrils. The results obtained show the potentialities of the use of biocontainers with nanostructured human placenta for the treatment of progressive myopia, retina dystrophy, partial optic-nerve atrophy and some other diseases of the eye. The study performed calls for further investigation in this field.*

*CPM; nanostructured biomaterial; eye tissue.*

Одним из направлений биологических исследований является поиск новых методов, позволяющих получить достоверную информацию о состоянии тканевых структур в контроле и в ходе реактивных проявлений на эндогенные и экзогенные факторы. Одним из способов такой оценки может служить сканирующая зондовая микроскопия, выявляющая пространственные и плотностные свойства биологических объектов в условиях относительно простой их предварительной подготовки и фиксации. В пределах этого метода немаловажной представляется возможность применения атомно-силовой микроскопии (АСМ), лазерной конфокальной микроскопии, с использованием спектральных характеристик объектов, зависимых от их молекулярной и макромолекулярной организации.

Отличительной особенностью метода АСМ, сопоставимого по своей разрешающей способности с электронной микроскопией, является то, что при приме-

нении последней методики пучок электронов взаимодействует собственно не с самим биологическим объектом, а с осажденными на его структурах тяжелыми металлами, что исключает само выяснение упругих свойств биологических объектов и по своей сути является непрямым методом оценки биологических объектов. АСМ является прямой методикой с минимальным изменением биологических свойств биоматериала, связанных с использованием фиксации для предотвращения аутолитических процессов. Преимущества атомно-силовой микроскопии обусловлены также возможностью стереологического исследования биологических структур, что представляется весьма полезным при анализе волокнистых составляющих межклеточного вещества, плотных глобулярных образований и применяется для оценки структурно-функциональной организации сложных субклеточных образований, степени упорядоченности взаимосвязанных тропоколлагеновых и микрофибриллярных комплексов [1, 2]. Биохимические изменения в биомолекулярных комплексах исследовали некоторые авторы на примере митохондрий и лизосом клеток сердца кролика [3]. Ими была показана высокая чувствительность и информативность метода для оценки мембранных клеточных образований цитоплазмы.

Лазерная конфокальная микроскопия в сочетании с методами комбинационного рассеяния и флуоресцентной микроскопией в биологических исследованиях применялись для оценки отдельных биохимических составляющих тканевых образований различных органов. В частности, проводился анализ возможности интеграции гетерогенных липидных и пептидных фракций в тканевые образования кожи с лонгитудинальным мониторингом этих процессов методом комбинационного рассеяния [4].

В данной работе показана возможность определения закономерностей организации наноразмерного механоактивированного биологического материала и тканей передней стенки глаза в ходе реакций на его введение методами сканирующей зондовой микроскопии.

Объектом исследования были структуры конъюнктивы, склеры и передних участков сетчатки половозрелых кроликов породы Шиншилла в возрасте от одного года до двух лет с массой тела от 3 до 3,5 кг. Исследования на животных проведено согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Под местной анестезией в верхненаружный квадрант в субконъюнктивальную основу глазного яблока кролика внедряли биоконтейнер, изготовленный из отрезка пупочной артерии человека длиной до 10 мм и шириной до 2 мм. В биоконтейнер вводился механоактивированный порошок той же плаценты, полученный методом механического измельчения крупнодисперсного высушенного материала в шаровой планетарной мельнице Pulverisette-7. Морфологические исследования тканей глаза животных проводили у контрольных животных без оперативного вмешательства, через 3, 7 суток, 1, 2 и 3 месяца после пересадки. Энуклеированные глаза фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина, заливали в парафин. Полученные срезы зоны оперативного вмешательства помещались на поверхность предметного стекла с последующей химической очисткой от парафина.

Исследование структуры и свойств наноразмерного механоактивированного (МА) биологического материала плаценты перед введением, а также гистологических срезов тканей глаза были проведены с помощью сканирующей зондовой лаборатории Ntegra (NT-MDT) в прерывисто-контактной методике на воздухе. Порошок измельченной плаценты предварительно крепился на пленку полистирола, полученную испарением этилацетата из раствора полистирола в этилацетате. Пленка наносилась на ситал, с последующим закреплением порошка под ультрафиолетовым излучением.

Спектроскопический флуоресцентный анализ гистологических срезов по точкам был выполнен на сканирующей зондовой лаборатории Ntegra Spectra (NT-MDT). В данном случае прибор использовался для конфокального оптического исследования образца, с возможностью двумерного сканирования отдельных участков в выбранном спектральном диапазоне и анализа спектральной картины в контрольных точках. Все спектры получены на воздухе при комнатной температуре из области фокуса лазера с участков около 400 нм. Использовались твердотельный лазер с непрерывным источником электромагнитного излучения с длиной волны 473 нм и гелий-неоновый лазер на длине волны 632,8 нм. Распределение химического состава по образцу проводилось выбором отдельных участков спектральной картины, полученной на ПЗС-детекторе (прибор с зарядовой связью) ПЗС-детекторе, и анализировалось путем дальнейшего двумерного сканирования в выбранной области образца. Характерное время накопления сигнала спектральной картины для каждой контрольной точки – 10 с. Размеры структурных фрагментов были оценены из анализа СЗМ-изображений, предварительно обработанных само-согласованным ранговым фильтром высоких частот и фильтром для устранения межстрочных скачков с помощью программы Image Analysis 3 (NT-MDT).

Как видно из рис. 1, МА-материал формирует агломераты до 2–10 мкм. Они, в свою очередь, состоят из частиц диаметром до 200–500 нм, содержащих из зерен от 40 до 100 нм. Данные агломераты и частицы весьма неустойчивы и их связи, по-видимому, обусловлены явлениями физической абсорбции и при даже малых механических воздействиях при сканировании методом АСМ распадаются до уровня зерен. Агломераты имеют сложные поверхностные характеристики, формируя объекты с развитой поверхностью.

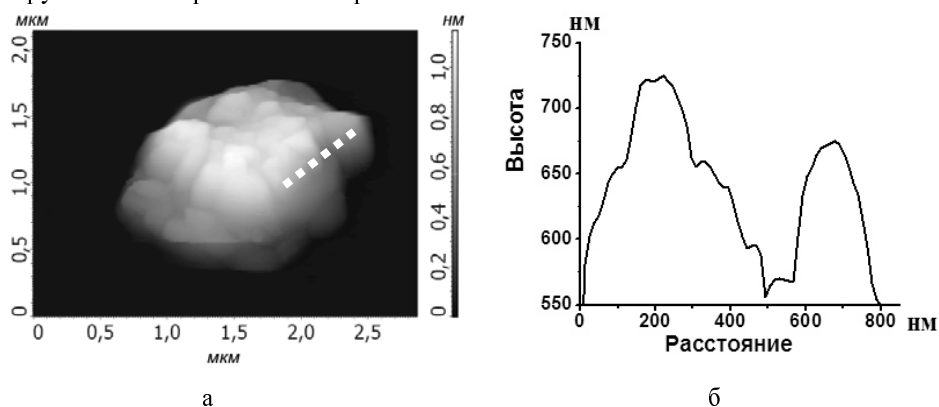


Рис. 1. АСМ-изображения: а – агрегата частиц механоактивированной плаценты человека; б – профиля сечения вдоль линии

При изучении динамики реакций передней стенки глаза важной составляющей оценки ответов явилось выяснение динамики организации волокнистого компонента межклеточного вещества соединительных тканей склеры и конъюнктивы. В интактной склере распределение коллагеновых волокон носит упорядоченный характер, наблюдается их плотное распределение в объеме межклеточного вещества, равномерный характер толщины волокон, строго упорядоченное и ясно прослеживаемое положение изотропных и анизотропных дисков, выявляемое по характеру жесткости по ходу коллагеновых волокон и характеру изменения рельефа. При этом выявляется, что зрелые коллагеновые волокна обладают ясно прослеживаемой поперечной исчерченностью. Периоды поперечной исчерченности для зрелых колла-

геновых волокон, определенные из АСМ-изображений с помощью Фурье-анализа (Image Analysis 3, NT-MDT) спектральных частот соответствуют 69–70 нм, что соответствует аналогичному распределению анизотропных и изотропных дисков, выявляемых при помощи электронной микроскопии [5, 6]. В рыхлой соединительной ткани конъюнктивы волокна имеют сетевидное распределение в объеме межклеточного вещества, при их упорядоченной макромолекулярной организации, аналогичной склере. В зоне, непосредственно прилежащей к имплантируемому биоконтейнеру, на третьи и седьмые сутки волокнистый компонент межклеточного вещества нередко формирует войлокообразную структуру диаметром 0,3–0,5 мкм (рис. 2,а). Сохраненные коллагеновые волокна разрыхлены, теряют равномерный характер толщины, менее четко различаются упругие характеристики изотропных и анизотропных дисков. В отдаленные сроки после имплантации прогрессирующе снижаются проявления дезорганизации волокнистого компонента межклеточного вещества исследуемых тканевых структур. Склера характеризуется формированием новообразованной соединительной ткани, которая к концу 1-го месяца отличается меньшей толщиной волокон, меньшей жесткостью и не столь выраженной гетероморфностью по ходу волокон (рис. 2,б,в). Как и для зрелых коллагеновых волокон, период исчерченности составляет 69,7 нм. Однако высота шага между щелью и зоной перекрытия для зрелых фибрилл составляет 28–29 нм, а для новообразованных коллагеновых фибрилл эта величина не постоянна и изменяется в широком диапазоне значений, от 14 до 24 нм.

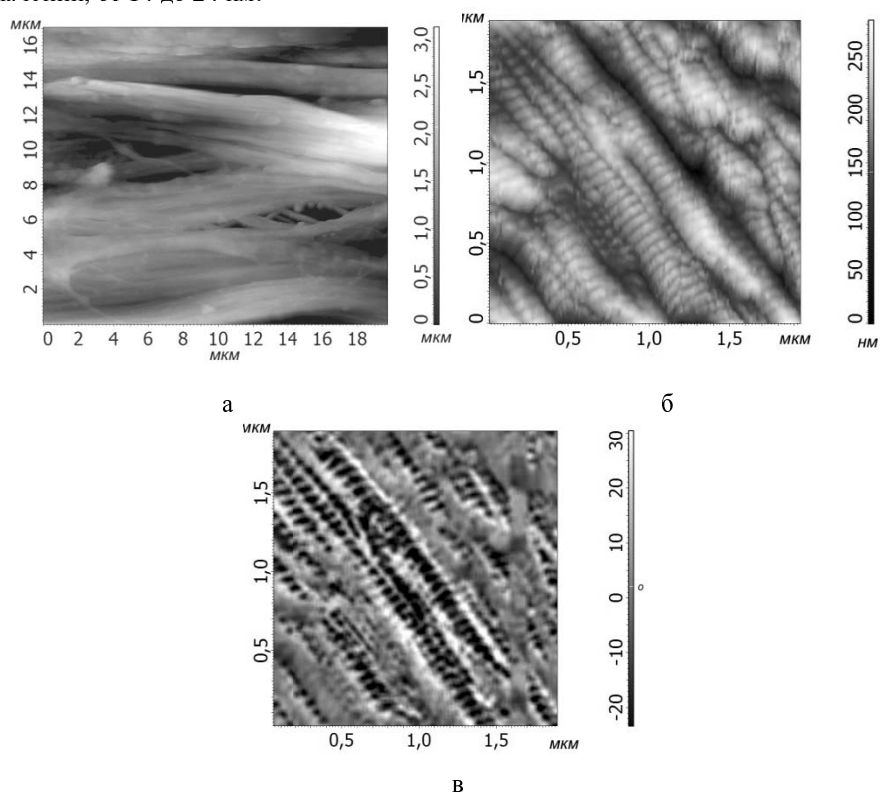


Рис. 2. АСМ-изображения в методе изображения рельефа: а – 3-й день имплантации; б – 2-й месяц имплантации; в – в методе фазового контраста участка склеры с новообразованными коллагеновыми волокнами в зоне имплантации: 1 – новообразованная ткань, 2 – зрелое коллагеновое волокно

Лазерное конфокальное исследование и спектроскопический флуоресцентный анализ реакции тканевых образований существенно дополняют данные, полученные АСМ-методом. Данное исследование осуществлялось в аналогичные сроки после введения биоконтейнера в нескольких контрольных зонах: стекловидного тела и сетчатки глаза и конъюнктивы склеры, располагающихся на равноудаленных расстояниях от биоконтейнера. Все эти участки имеют различные структурные и спектральные характеристики организации при их исследовании в лазерном конфокальном и флуоресцентном режиме. В частности, при рассмотрении содержимого биоконтейнера на конфокальном изображении, выявляются поверхностные характеристики агломератов и обнаруживается глобулярный (размером до 2 мкм) характер их организации. Эта характеристика более наглядно выявляется при анализе профиля этого объекта на конфокальном изображении. В то же время на флуоресцентном изображении этот же объект имеет более гомогенный характер организации в силу близких химических характеристик объекта.

При изучении склеры на третьи и седьмые сутки после имплантации наблюдается сохранение ее волокнистого характера организации. Хорошо заметны скопления коллагеновых волокон, более ясно прослеживаемых на флуоресцентном изображении. При изучении этого же участка в оптическом режиме, наряду с волокнами, обнаруживаются глобулярные структуры, более явно видны поверхностные характеристики объекта. Не менее интересны результаты исследования сетчатки глаза (рис. 3,а,б). При исследовании ее организации в спектральном диапазоне достаточно заметна гетероморфность образующих ее элементов в различных слоях. Хорошо различима зона палочек и колбочек, участки наружного и внутреннего ядерных слоев. При изучении слоя палочек и колбочек, наружного и внутреннего сетчатого, волокнистого слоя выявляются особенности архитектоники нейропиля, представленного отростками нейронов и нейроглией. Исследование этой же зоны в лазерном конфокальном режиме не позволяет значимо повысить информацию о рассматриваемом нативном объекте, позволяя в основном предполагать локализацию наружного и внутреннего ядерных слоев.

Результаты конфокальных исследований дополняются данными спектрального анализа, в соответствии с которыми обнаруживается диффузия частиц МА плаценты в близлежащие зоны передних участков стенки глаза. Представленные на рис. 3,в спектры дают представление о распределении интенсивностей для различных участков склеры. Спектры сняты в равноудаленных точках поперек толщины склеры от стенки биоконтейнера к интактной склере. Для спектров, соответствующих точкам 4 и 5 (приближенных к интактной склере), максимум интенсивности флуоресценции отвечает длинам волн, лежащих в интервале 540–550 нм, и соответствует максимуму, наблюдаемому в спектре интактной склеры с небольшим смещением в сторону длинных волн (не более 5 нм). На спектрах точек 1–3 и механоактивированной плаценты наблюдается два максимума: 545–555 и 554 до 570 нм. Ясно выявляется сходство спектров со спектром интактной склеры, с одной стороны, и спектра с присутствием наноразмерного МА биологического материала, с другой. Эти данные приводят к выводу, что на участках 1–3 содержится вещество, максимум флуоресценции которого совпадает с максимумом для МА плаценты, и соответственно на этих участках произошло взаимодействие ткани склеры с указанным материалом. Таким образом, на седьмые сутки имплантации наблюдается проникновение наночастиц плаценты в толщу склеры на  $2/3$  ее толщины.

К концу 3-го месяца усиливается упорядоченность организации волокнистого компонента межклеточного вещества склеры и конъюнктивы в зонах, примыкающих к биоконтейнеру, что сочетается с более плотным их распределением по сравнению

с контрольными животными и указывает на усиление прочностных свойств волокнистой соединительной ткани в зоне имплантации биоконтейнера. При этом структура коллагеновых волокон приближается к таковым у контрольных животных, что указывает на высокую степень их структурно-функциональной зрелости.

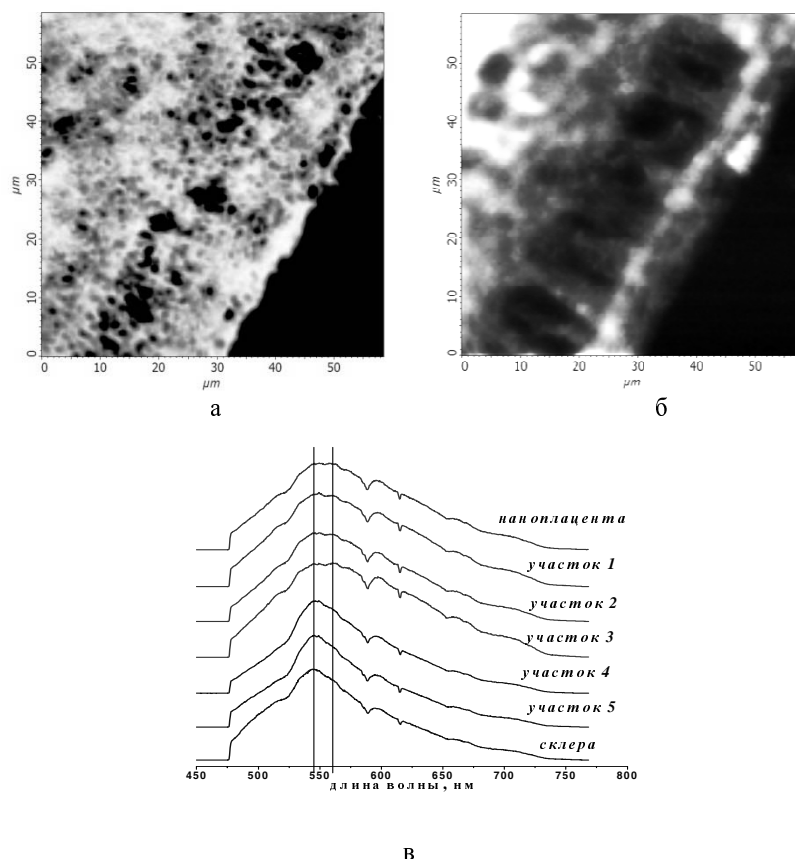


Рис. 3. Седьмые сутки после имплантации. Сетчатка глаза: а – конфокальное лазерное изображение; б – флуоресцентное изображение; в – склера. Флуоресцентные спектры по точкам от стенки биоконтейнера к интактной склере

Динамика изменений в структуре тканевых образований стенки глаза в поздние сроки эксперимента наиболее явно заметна при анализе спектральных характеристик объекта, что позволяет предполагать наибольшую целесообразность применения данного метода для выявления возможного проникновения чужеродных ультрадисперсных объектов в биологические структуры. В частности, при анализе спектральных характеристик склеры через 2 месяца от начала эксперимента уровень концентрации МА биологического материала в полости биоконтейнера резко снижается, уменьшается его количество как в стенке биоконтейнера, так и прилежащих к нему зонах, в то время как на третьи – седьмые сутки его содержание в этих участках было максимальным. В то же время выявлена относительно высокая очаговая концентрация биологического материала на значительном удалении от зоны биоконтейнера в направлении задней стенки глазного яблока, что указывает на возможное направление диффузионных потоков в области глаза [7].

Таким образом, в ходе структурного анализа нативных биологических материалов стенки глаза методом АСМ и лазерной конфокальной микроскопии, сочетаемых со спектральным анализом объектов, наиболее демонстративными представляются данные о возможном характере перераспределения инородных включений биологических и иных материалов. Это представляется полезным при изучении диффузионных процессов в биологических объектах. Метод АСМ позволяет существенно повысить информативность анализа за счет резкого увеличения разрешающей способности, приближающейся к методам электронной микроскопии, возможности выяснения упругих характеристик и объемно-пространственного распределения исследуемых объектов, на фоне сравнительной простоты изготовления исследуемых материалов.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Bozec L., Horton M.A.* // J. Mater Sci: Mater Med. – 2006. – Vol. 17. – P. 1043-1048.
2. *Ludwig T., Kirmse R., Poole K., Schwarrz U.S.* // Pflugers Arch- Eur. J. Physiol. – 2008. – Vol. 456. – P. 29-49.
3. *Kaup G.* // International Journal of Photoenergy. – 2006. – Vol. 2006. – P. 1-22.
4. *Xiao C., Moore D.J., Rerek M.E., Flach C.R., Mendelsohn R.* // J. Invest. Dermatol. – 2005. – Vol. 124. – P. 622-632
5. *Yamabayashi S., Ohno S., Aquilar R.N. et al.* // Ophthalmic Res. – 1991. – Vol. 23. – P. 320-329.
6. *Meller D., Petrs K., Meller K.* // Cell Tissue Res. – 1997. – Vol. 288. – P. 111-118.
7. *Nickerswon J.M., Shuler R.K., Davies J.B., Dioguardi P.K. et al.* Noninvasive delivery of DNA into the eye in Ophthalmology: Ocular Angiogenesis: Diseases, Mechanisms and Therapeutics/edited by J. Tombran and C.J. Barnstable, Totowa: Numana Press Inc. – P. 373-388.

Статью рекомендовал к опубликованию д.т.н., профессор О.А. Агеев

**Карбань Оксана Владиславовна**

Физико-технический институт УрО РАН.

E-mail: ocsa123@yahoo.com.

426001, г. Ижевск, ул. Кирова, 132.

Тел.: +73412725239.

Старший научный сотрудник; к.ф.-м.н.

**Васильев Юрий Геннадьевич**

Ижевская государственная сельскохозяйственная академия.

E-mail: devugen@mail.ru.

426069, г. Ижевск, ул. Студенческая, 11.

Тел.: +73412 591520.

Заведующий кафедрой; д.м.н.; профессор.

**Жаров Виктор Владимирович**

ГУЗ «Республиканская офтальмологическая клиническая больница МЗ УР».

E-mail: rokb@udm.net.

426009, г. Ижевск, ул. Ленина, 98 а.

Тел.: +73412 683376.

Главный врач; д.м.н.; профессор.

**Перевозчиков Петр Арсентьевич**

Заведующий отделением; к.м.н.

**Леесмент Станислав Игоревич**

ЗАО «Нанотехнология-МДТ».

E-mail: leesment@mdt.ru.

124482, г. Москва, Зеленоград, кор. 100.

Тел.: +74997350305.

Инженер.

**Тимофеев Сергей Владимирович**

E-mail: sergey\_t@ntmdt.ru.

Инженер.

**Karban Oksana Vladislavovna**

Physical-Technical Institute UrB RAS.

E-mail: ocsa123@yahoo.com.

132, Kirova Street, Izhevsk, 426001, Russia.

Phone: +73412725239.

Senior Staff Scientist; Dr. of Phis.-Math. Sc.

**Vasil'ev Yurii Gennad'evih**

Izhevsk State Agricultural Academy.

E-mail: devugen@mail.ru.

11, Studencheskay Street., Izhevsk, 426069, Russia.

Phone: +73412 591520.

Head of Department; Dr. Med. Sc.

**Zharov Viktor Vladimirovich**

Republican Ophthalmological Clinic Hospital.

E-mail: rokb@udm.net.

98 a, Lenina Street, Izhevsk, 426009, Russia.

Phone: +73412683376.

**Perevozhikov Petr Arsent'evich**

Head of Department; Dr. Med. Sc.

**Leesment Stanislav Igorevich**

"Nanotechnology - MDT".

E-mail: leesment@mdt.ru.

Kor. 100, Zelenograd, Moscow, 124482, Russia.

Phone: +74997350305.

Engineer.

**Timofeev Sergei Vladimirovich**

E-mail: sergey\_t@ntmdt.ru.

Engineer.