

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

*Мамаева*

**Мамаева Саргылана Николаевна**

**Наноразмерные структуры на мембране эритроцита  
при патологии и воздействии радиации**

1.5.1. Радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре общей и экспериментальной физики Физико-технического института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова»

- Научный консультант** – **Максимов Георгий Владимирович**, доктор биологических наук, профессор
- Официальные оппоненты** – **Рогаткин Дмитрий Алексеевич**, доктор технических наук, доцент, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области "Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского", лаборатория медико-физических исследований, заведующий
- Виноградова Екатерина Михайловна**, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», факультет прикладной математики — процессов управления, профессор
- Левин Геннадий Генрихович**, доктор технических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений», научно-исследовательское отделение голографии, оптической томографии, нанотехнологий и наноматериалов, главный специалист.

Защита диссертации состоится «29» января 2024 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.10, ауд. 308.

E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин, ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.6; sargylana\_mamaeva@mail.ru (С.Н. Мамаева, соискатель).

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3171>

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



А.В. Северин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Настоящее время характеризуется существенным ростом онкологических заболеваний, что требует создания новых методов диагностики, лечения и профилактики патологии, в том числе рака шейки матки (РШМ) и рака молочной железы (РМЖ). Предполагается, что до 2025 года, ежегодно будет зарегистрировано около 420 миллионов новых заболеваний рака, а по данным Globocan только в 2020 году в мире было выявлено около 19,3 миллиона новых случаев рака, причем РМЖ выходит на первое, а РШМ занимает четвертое место. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрав РФ) на сегодняшний день в России около 4 млн граждан болеют онкологическими заболеваниями и ежегодно число новых случаев составляет порядка 600 тысяч.

Согласно стратегии научно-технологического развития Российской Федерации от 28 февраля 2024 года, приоритетами научно-технологического развития следует считать направления, позволяющие получить значимые научные и научно-технические результаты, создать отечественные наукоемкие технологии и обеспечивающие переход к персонализированной медицине, предиктивной и профилактической медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения.

С 2019 года в России исполняется федеральный проект "Борьба с онкологическими заболеваниями", имеющий связь с государственной программой Российской Федерации «Развитие здравоохранения». В 2022 году с целью разработки и реализации комплекса мер государственной политики в области борьбы с онкологическими заболеваниями профильной комиссией по специальности «онкология» Минздрав РФ была утверждена и принята программа Национальной стратегии по борьбе с онкологическими заболеваниями на долгосрочный период до 2030 года. В соответствии с ней в стране должна быть внедрена технология ранней диагностики новообразований и создана национальная система мониторинга онкологической помощи.

Важно, что до сих пор, с помощью цитологических и гистологических методов исследования РШМ не удается разработать критерии возникновения и распространения данной опухоли. В связи с этим, для повышения разрешающей способности научных исследований и чувствительности диагностики в клинике особый интерес представляет использование методов электронной микроскопии клеток и плазмы крови больных РШМ. С помощью биохимических методов доказано, что в ядерных клетках периферической крови, в сыворотке крови, а также в плазме крови пациентов накапливаются молекулы ДНК

вируса папилломы человека (ВПЧ) [1-4]. Однако, как показано в исследовании [5], предположение о том, что ДНК ВПЧ в крови может быть маркером заболевания, метастазирования или рецидивом заболевания не подтверждается.

В связи с этим, задачей нашего исследования было проведение серии экспериментов для разработки новых физических подходов исследования и диагностики на «наноразмерном уровне», позволяющих сопоставить наличие и физические параметры наноразмерных структур в крови с помощью электронной микроскопии и определить их молекулярный состав (содержание белков, липидов и ДНК).

В настоящее время широко исследуются вопросы появления вирусов, включая, как ВПЧ при РШМ, в плазме крови — является ли вирусемия естественной стадией инфицирования организма человека папилломавирусами, и, каким образом кровь участвует в механизмах их элиминации. Очевидно, что данный способ распространения в организме наиболее вероятен в связи с тем, что при заболевании число кровеносных сосудов в патологической ткани существенно возрастает, а также меняется морфология сосудов, в них образуются поры, по которым вирусы и проникают в ткани, например, связываясь на поверхности эритроцитов. Доказать механизм распространения вирусных частиц с помощью адсорбции на поверхности эритроцитов является одной из задач нашей диссертации.

Известно, что роль эритроцитов в развитии данной патологии определяется в связи с тем, что для деления клеток в ткани опухоли необходима энергия и, в первую очередь кислород. В связи с этим, одним из элементов диагностики РШМ могут служить изменения морфологии эритроцитов, например, обусловленные изменениями их физических характеристик, (в том числе электрических параметров, например, поверхностный заряд) при связывании на поверхности плазматической мембраны вирусов. Очевидно, что эритроциты с изменёнными формами и размерами дополнительно приводят к различным расстройствам физиологических функций и нарушениям деятельности отдельных систем и органов человека.

Итак, изучение физических механизмов изменения морфологии и рельефа поверхности мембраны эритроцитов в нанометровом диапазоне с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и их описание с помощью физических методов и математических моделей было одной из важных задач нашей работы. В связи с этим, особый интерес представляют работы, связанные с эритроцитами и ДНК ВПЧ при РШМ. С точки зрения разработки физических параметров механизма распространения опухоли с помощью эритроцитов был важен факт, что ВПЧ могут не только адсорбироваться на поверхности эритроцита, но и менять кислородтранспортную функцию

гемоглобина. В экспериментах с кровью мышей, проведенных группами [6] и [7], доказано наличие связывания с эритроцитами вирусоподобных частиц, а рецептор ВПЧ – гепарансульфат локализован на мембране эритроцитах человека. В исследовании [8] ДНК ВПЧ обнаружена в плазме крови женщин не только с РШМ, но и с дисплазией шейки матки.

О возможности существования данного механизма для РШМ свидетельствуют факты, обнаруженные [9], о том, что эритроциты способны адсорбировать на своей поверхности экстрацеллюлярные везикулы, часть которых представлена экзосомами, в том числе, возможно, экзосомами из опухоли. Доказано, что в экзосомах присутствует ДНК их опухолевых клеток. В связи с этим, одной из задач нашего исследования была доказать, что на поверхности эритроцитов могут адсорбироваться вирусные частицы и экзосомы, содержавшие ДНК, кодирующих белок ДНК ВПЧ. Очевидно, что исследование такого механизма возможно только с помощью электронной микроскопии в совокупности с выявлением наличия ДНК как возможного маркера РШМ во фракциях эритроцитов крови пациентов.

Известно, что экзосомы вовлечены в ключевые процессы клеточной коммуникации. Они были найдены во всех биологических жидкостях человеческого тела, таких как кровь, слезы [10, 11] и т.д. Эти частицы характеризуются малыми размерами и стабильны для проникновения из различных тканей в биологические жидкости и клетки мишени. Мы считаем, что данный процесс должен исследоваться с применением методов, позволяющих регистрировать наноструктуры и изменения их распределения на поверхности эритроцитов. Везикулы также могут быть вовлечены в процесс метастазирования, или перенося молекулы, которые участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе, или участвуя в формировании ткани-мишени для будущего метастазирования. Известно, что различные стрессовые воздействия (включая патологию при онкологии) меняют выраженность, локализацию и структуру секретлируемых клетками везикул [12]. Известно, что внеклеточные везикулы включают в себя группу наноразмерных частиц, связанных с мембранными липидами, которые высвобождаются большинством типов клеток как в нормальных, так и при патологии, как доказано в работах [13].

Таким образом, в настоящее время исследование возникновения и распределения наноразмерных структур (НРС), являющихся вирусными частицами и везикулами, а также свойств эритроцитов, у которых на поверхности локализованы везикулы и/или ВЧП при патологии, в том числе при онкологических заболеваниях, и во время проведения лучевой терапии на нанометровом уровне, является одной из задач нашего исследования.

В связи с вышеуказанными, в настоящее время актуально внедрение СЭМ технологий для исследования, диагностики и терапии онкологических заболеваний и патологий как на

клеточном, так и молекулярном и наноразмерном уровнях: исследование распространения вирусных частиц, везикул в организме во взаимосвязи с изучением морфологии эритроцитов в крови. Именно для контроля наличия и распределения НРС важна разработка новых методик СЭМ исследования и развитие дополнительных технологий, связанных с модификацией ряда параметров электронной микроскопии непосредственно для изучения эритроцитов.

В настоящее время интенсивно развивается применение электронных микроскопов в медицине, в том числе СЭМ, разработанных для исследований в различных областях науки с широким диапазоном ускоряющих электроны напряжений, энергии электронных пучков. Развитие технологий исследования изменений рельефа поверхности клеток и молекулярных комплексов в нанометровом диапазоне возможно с применением аппаратов с электронным зондом. Выявление наличия НРС, таких как везикулы и вирусные частицы, размеры которых варьируются от 30 до 1000 нм, на поверхности эритроцитов или в плазме крови возможно только с применением СЭМ с определёнными параметрами электронного пучка и доступной для данного метода пробоподготовкой крови – подготовкой сухих мазков крови. При использовании СЭМ результат может быть получен в течение 10-15 минут на исследование одного образца при 3-5 различных увеличениях, что в несколько раз меньше по времени, чем при исследовании морфологии эритроцитов одного образца, например, на атомно-силовом микроскопе при одном фиксированном условии проведения эксперимента.

Для модификации СЭМ именно для исследования распределения НРС существует необходимость усовершенствования некоторых режимов работы и пробоподготовки, связанные с режимом работы электронного микроскопа. Для сокращения времени и ресурсов при подборе режима работы для улучшения качества изображения при исследовании биологических образцов для имеющейся модификации СЭМ необходимо было также сформулировать и разработать физико-математические модели параметров первичного электронного пучка с подходящими характеристиками. Кроме того, необходимо рассмотреть вопрос о повышении качества изображения биологических образцов, получаемых с помощью СЭМ, или их пробоподготовкой, т.к. в настоящее время есть некоторые проблемы при получении изображений, связанные с подготовкой образцов в связи со специфическими свойствами биологических образцов, обусловленные их элементарным составом, физическими свойствами, например, с тем, что они являются диэлектриками. Для того, чтобы компенсировать возникновение электрического заряда в приповерхностной области исследуемого биообразца были предложены различные модификации физических подходов. Обычно при использовании СЭМ, биологические

образцы напыляют тонким проводящим слоем, что требует применения дополнительной нанометодики и расходных материалов для напыления, например, золотого порошка, которое также снижает пространственное разрешение структур поверхности образцов на нанометровом диапазоне.

В ходе выполнения данной работы были разработаны математические модели, позволяющие не только анализировать полученные результаты, но и формировать новые подходы как для модификации физических параметров СЭМ, так и проведения экспериментов по выявлению НРС на поверхности клетки. Моделирование изменений морфологии и физических характеристик эритроцитов в присутствии НРС является одной из актуальных задач, позволяющих выявить особенные характеристики патологии, физические свойства клеток для диагностики и наблюдения эффективности терапии. Математическое моделирование является оптимальным способом анализа причин возникновения, характера и степени оценки развития патологии, если формирование модели будет основано на результатах экспериментальных данных, связанных с исследованием патологии на клеточном и молекулярном уровнях. Кроме того, формирование теоретического описания процесса адсорбции НРС на поверхности эритроцита, позволит, вероятно, использовать нейросети и искусственный интеллект в научных исследованиях и диагностике рака. Итак, комплексный подход исследования патологии, включающий в себя и экспериментальные, и численные методики исследования, позволят выявить детали формирования патологии. Кроме того, математическое моделирование позволит повысить эффективность использования, предлагаемого нами метода СЭМ для исследования функции эритроцитов и диагностики патологии за счет формирования программ управления отдельными узлами СЭМ, анализа полученных данных и подключения их нейросетям для баз телемедицины в онкологии.

**Целью** данной работы является разработка новых подходов в выявлении и изучении наноразмерных структур на поверхности эритроцитов при патологии и воздействии радиации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Обосновать необходимость и разработать новый подход исследования локализации и распространения НРС на поверхности мембраны эритроцитов в норме и при патологии: определить оптимальный режим работы на СЭМ и использовать подложки, разработанные методами нанотехнологий для повышения разрешающей способности, улучшение качества визуализации с учетом особенностей взаимодействия электронного пучка с биообразцами.

2. Выявить изменения морфологии эритроцитов и распределения НРС на поверхности эритроцита с помощью предложенной модификации метода СЭМ, сопоставляя с результатами, полученными с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ).
3. Выявить изменения морфологии эритроцитов и распределения НРС на поверхности эритроцитов с помощью методов СЭМ и АСМ при воздействии ионизирующего излучения на организм человека при лучевой терапии (ЛТ): контролировать характерные особенности в морфологии эритроцитов, наличия и параметров НРС на поверхности эритроцитов и в плазме крови;
4. Провести исследование молекулярных изменений в образцах крови при патологии и действии радиации с помощью методов инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния;
5. С помощью методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммунофлуоресцентного анализа исследовать состав НРС на поверхности эритроцитов при патологии и во время лучевой терапии (при воздействии ионизирующего излучения на организм);
6. С помощью методов спектроскопии комбинационного рассеяния исследовать изменения белков крови и гемоглобина эритроцитов при действии радиации (фракционное воздействие ионизирующего излучения) на организм млекопитающего.
7. Разработать и сформулировать физико-математические модели, позволяющие повысить разрешающую способность и эффективность использования СЭМ: определения основных характеристик термополевого и полевого электронных катодов СЭМ с учетом влияний пространственного заряда электронного пучка, управляющего и фокусирующего внешнего магнитного поля, ограниченности эмиссионной поверхности электронов пучка для подбора режима работы СЭМ в целях контроля за изменениями морфологии и распределения НРС нативной клетки. Особое внимание уделить учету особенностей формирования вторичных электронов в условиях взаимодействия первичного электронного пучка, сформированного под воздействием электрического поля при низкокиловольтном ускоряющем напряжении, при использовании в качестве объекта исследования мазок крови;
8. Разработать математические модели изменения морфологии эритроцитов в присутствии НРС, электрических свойств эритроцитов с учетом их морфологических параметров и наличия НРС на поверхности эритроцитов при патологии и воздействии.

#### **Методология исследования**

В качестве объекта исследования были образцы венозной крови пациентов при различных патологиях и пациентов, проходивших лучевую терапию.



Проведен ряд натуральных *in vitro* и численных экспериментов для исследования эритроцитов при патологии, включающий исследование морфологии эритроцитов, визуализации НРС на их поверхности в патологии и под влиянием ионизирующих излучений, а также определение химического состава образцов крови.

Для исследования влияния лучевой терапии (ЛТ) на кровь были использованы образцы венозной крови пациентов с диагнозом РШМ, проходивших фракционную ЛТ в два этапа и получивших суммарную дозу 50 Гр: сначала дистанционная ЛТ с использованием внешнего луча ускорителя Elekta Synergy, 6-18 МэВ (Швеция), а затем брахитерапия с использованием прибора MultiSource HDR с источником  $^{60}\text{Co}$  (Германия).

Для исследования влияния ИИ на организм млекопитающих была использована венозная кровь обезьян, которые были облучены тотально (суммарная доза 50 сЗв) на установке УПГД 2М (Доза, Россия) с источником излучения  $^{137}\text{Cs}$ .

Исследование морфологии эритроцитов и визуализация НРС проводилось с помощью сканирующего электронного (JSM 7800F, JEOL Япония), атомно-силового (Solver Next, NT-MDT, Россия) и оптического микроскопов при различных режимах их работы. Объектами изучения с применением электронного микроскопа были сухие мазки не фиксированной цельной крови на подложках из стекла, кристаллов кремния, восстановленного оксида графена, и восстановленного оксида графена с наночастицами серебра. Анализ размеров НРС проводился с помощью программы JMicroVision 1.2.7. (Nicolas Roduit, Швейцария). АСМ изображения были получены при помощи программных обеспечений Nova и ImageAnalysis фирмы NT-MDT (Россия).

Для исследования состава образцов крови и НРС были использованы методы рентгеновского энерго-дисперсионного микроанализа (СЭМ с системой INCA Energy 350 (Oxford Instruments, Великобритания), инфракрасной спектроскопии (спектрометр Varian 7000 FT-IR, США и спектрометр Spectrum Two, Perkin Elmer США), спектроскопии комбинационного рассеяния (НаноЛаборатория NTEGRA Spectra, NT-MDT Россия), полимеразной цепной реакции с использованием амплификаторов T100 Thermal Cycler, CFX96 и электрофорезной камеры Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad, США), иммунофлуоресцентного анализа с применением инвертированного микроскопа ZEISS Axio Vert.A1 F, камеры ZEISS AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss, Германия), программного обеспечения ZEN lite 2012 и системы цифровой визуализации Celena S (Logos Biosystems, Корея). В пробоподготовке для ПЦР в реальном времени были использованы готовые реакционные смеси qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Evrogen). Для детекции фрагментов ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагментов ДНК, кодирующих  $\beta$ -глобин генома человека, использовались праймеры MY09/11 и PC03/04 соответственно. Для проведения

иммунофлуоресцентного анализа использовали в качестве первичных антител Ms Anti-Papilloma virus antibodies против белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 MAB837 (Sigma-Aldrich), ARG56108 ARIGO против белка HPV16 L1 с идентификатором CamVir-1 и в качестве вторичных антител Goat Anti-Mouse IgG Antibody— козы поликлональные антитела против H и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированными с флуоресцеином FITC (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI).

Для численной реализации математических моделей использовалась система автоматизированного проектирования Mathcad.

Исследования проводились в соответствии с этическими принципами медицинских исследований с участием людей, принятыми 18-й Генеральной ассамблеей ВМА, Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г., с поправками, внесенными 52-й Генеральной ассамблеей ВМА, Эдинбург, Шотландия, октябрь 2000 г., также после получения одобрения локального комитета по биомедицинской этике Северо-Восточного федерального университета имени Аммосова (протокол № 13 от 4 апреля 2018 г., решение № 2). Все пациенты дали письменное информированное согласие.

При выполнении исследования руководствовались «Правилами гуманного обращения с лабораторными животными» от 6.04.1973, № 1045-73.

Эксперименты, представленные в данной работе, проводились в лабораториях Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Регионального центра инжиниринга Технопарк «Якутия».

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанная методика повышения разрешающей способности СЭМ с помощью определённого режима работы на СЭМ (при низкокиловольтном ускоряющем напряжении, без проведения напыления проводящего слоя на поверхность образца) и модификации пробоподготовки с применением методов нанотехнологий (использование подложек на основе кристаллов кремния, восстановленного оксида графена, и восстановленного оксида графена с наночастицами серебра) позволяет исследовать морфологию эритроцитов на нанометровом уровне и обнаружить НРС, размеры которых варьировались от 30 до 300 нм, в образцах крови при увеличении в 100.000 раз.
2. Новый подход в исследовании морфологии эритроцитов, формирования и механизма распространения НРС (размеры НРС от 30 до 300 нм) в организме при патологии и при ЛТ с помощью СЭМ и АСМ позволяет визуализировать поверхность эритроцитов в нанометровом диапазоне и позволяет экспериментально установить, что распространение

вирусных наноразмерных частиц и внеклеточных везикул в крови возможно путем адсорбции НРС на поверхности эритроцитов. Результаты, полученные с применением нового подхода, позволяют рассматривать НРС как биомаркеры развития некоторых форм патологий, в том числе онкологии, а также в оценке эффективности ЛТ.

3. Обнаруженные нами изменения в составе белков и нуклеиновых кислот, конформации гема гемоглобина человека в патологии и при действии радиации методом КР спектроскопии в исследованиях крови пациентов с онкологией и приматов свидетельствуют о возможности применения данной методики в комплексном исследовании патологии и оценки эффективности ЛТ.

4. Разработанные методики исследования состава НРС в крови в патологии (при РШМ) и под воздействием радиации в ходе ЛТ с использованием СЭМ, методов иммунофлуоресцентного анализа и ПЦР-РВ свидетельствуют, что: 1) элементный состав НРС, изученный методом рентгеновского микроанализа в СЭМ, показывает, что оболочка или часть состава НРС могут иметь сходные с составами мембран экзосом или капсидов вирусных частиц; 2) эритроцитарная масса, изученная методом ПЦР с использованием праймера MY09/11, содержит фрагменты циркулирующей ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ; 3) с помощью первичных моноклональных антител против капсидных белков ВПЧ и вторичных антител меченых флуоресцеином показано наличие НРС (вирусных частиц) на поверхности эритроцитов до и после ЛТ.

5. Разработанные математические модели контроля формирования электронных пучков в СЭМ позволяют определить основные эмиссионные характеристики (скорость электронов, ток пучка, размер электронного зонда и др.) термополевого и полевого электронного катодов различных конфигураций (эллипсоидальный, параболоидальный и цилиндрический) с учетом влияния пространственного заряда, управляющего и фокусирующего внешнего магнитного поля, особенностей взаимодействия электронного излучения с веществом с малым атомным номером. Данные модели могут быть использованы в качестве математической основы программного обеспечения управления характеристиками электронного зонда, автоматизации подбора режима работы СЭМ и выработки рекомендаций для модификации электронно-оптических систем СЭМ в области исследования эритроцитов.

6. Разработанные математические модели физических свойств эритроцитов в патологии и во время ЛТ позволяют оценить изменения поверхностного заряда эритроцитов и вклад заряда НРС, а также динамику эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля с учетом форм и размеров эритроцитов, адсорбции НРС на поверхности эритроцитов, количества НРС. Данные модели могут быть использованы в интерпретации результатов,

получаемых в экспериментах, связанных с определением электрофоретической подвижности эритроцитов в патологии и во время проведения ЛТ в условиях прикрепления к ним НРС, а также могут способствовать появлению новых фундаментальных представлений развития патологий, эффектов в организме под воздействием ионизирующего излучения.

**Научная новизна** работы заключается в том, что впервые:

1. Предложены и апробированы оптимальные режимы работы СЭМ (JEOL JSM-7800F) и условия работы, повышающие качество изображений при проведении исследований сухих мазков крови на основе стеклянных и наноструктурированных графеновых подложек.
2. Получены результаты, свидетельствующие об адсорбции НРС на поверхности эритроцитов и наличия их в крови до и после лучевой терапии онкологического заболевания методами СЭМ, АСМ. Методами СЭМ и АСМ показано, что при патологии в сухих мазках крови обнаруживаются существенные изменения в морфологии эритроцитов: появляются в значительном количестве определённые виды патологических эритроцитов с изменёнными линейными размерами в сторону их увеличения с наличием на их поверхности НРС с размерами от 30 до 300 нм, которые соответствуют размерам вирусов и внеклеточных везикул — экзосом.
3. Сформирована база данных изображений эритроцитов в норме и патологии, полученных с помощью СЭМ в разработанном режиме.
4. Методом КР спектроскопии установлено, что наблюдается заметное отличие оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина, метгемоглобина при исследовании образцов крови пациентов с диагнозом РШМ до и после ЛТ, а также при сравнении спектров образцов крови с контрольной группой.
5. Разработаны методики исследования состава НРС в крови в патологии и под воздействием радиации в ходе ЛТ с использованием СЭМ, методов ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресцентного анализа: 1) методом рентгеновского микроанализа в СЭМ может быть определён элементный состав НРС; 2) методом ПЦР с использованием праймера MY09/11 может быть доказано наличие фрагментов циркулирующей ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, в эритроцитарной фракции крови; 3) иммунофлуоресцентный анализ с использованием первичных моноклональных антител против капсидных белков ВПЧ и вторичных антител меченых флуоресцеином может подтвердить гипотезу наличия вирусных частиц на поверхности эритроцитов до и после лучевой терапии.
6. Разработаны математические модели для создания программного обеспечения СЭМ – программы определения параметров электронно-оптической системы формирования

электронного зонда микроскопа: математические модели эмиссионных характеристик острейного полевого катода и термополевого катода Шоттки различной конфигурации с учетом структуры электронно-оптической системы формирования электронного зонда СЭМ, воздействия внешнего электрического и магнитного полей при низкокиловольтных ускоряющих напряжениях, пространственного заряда пучка, особенностей взаимодействия электронного пучка с веществом исследуемого биообразца.

7. Разработаны математические модели, основанные на результатах изменений физических параметров эритроцитов: выявленные изменения эритроцитов, обнаружение НРС (вирусных частиц) на поверхности эритроцитов в патологии и во время лучевой терапии могут быть объяснены электрическими свойствами эритроцитов и вирусных частиц.

**Практическая значимость** работы заключается в том, что

1. Предложенные и апробированные оптимальные режимы работы СЭМ (JEOL JSM-7800F) и условия использования наноструктурированных графеновых подложек для исследования сухих мазков крови расширяют возможности применения СЭМ в области биомедицины, медицины.

2. Комплекс разработанных и внедренных экспериментальных и теоретических методик физико-математического исследования эритроцитов в присутствии НРС с новыми подходами для комплексного исследования молекулярно-клеточных процессов (микроскопия, спектроскопия, ПЦР анализ, метод иммунофлуоресцентного анализа, математическое моделирование процессов в организме человека на клеточном, молекулярном уровнях) может быть использован для ранней наноразмерной диагностики патологии, в разработке новых методов определения эффективности лучевой терапии.

3. Предложенные физико-математические модели электронно-оптических систем СЭМ с учетом физических основ взаимодействия электронного пучка с биологическими образцами могут быть использованы для автоматизации выбора режима работы с целью улучшения качества визуализации, создания программного обеспечения для СЭМ в биомедицинских исследованиях, а также для выработки рекомендаций для создания новых модификаций СЭМ в области медицины.

4. Результаты работы применяются в научно-исследовательских работах научной молодежной лаборатории «Радиационные технологии» Физико-технического института СВФУ имени М.К. Аммосова, созданной в рамках реализации проекта № FSRG-2021-0014 «Разработка и внедрение новых комплексных подходов исследования актуальных задач медицины, сельского хозяйства, промышленности, в том числе, обработки драгоценных камней, а также палеонтологии, биологии, вирусологии с применением методов спектроскопии, микроскопии и радиационных технологий» (2021 г. -2023 г.), в реализации

нового проекта № FSRG-2024-0002 «Междисциплинарные исследования и разработки в области медицины, палеонтологии и экологии с применением радиационных технологий» (2023 г.-2026 г.), лаборатории «Электронные пучки и радиотерапия» совместно с кафедрой биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и кафедрой физики ускорителей и радиационной медицины Физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, биотехнологической лаборатории «Технопарк «Якутия»», Якутского научного центра комплексных медицинских проблем и Якутского республиканского онкологического диспансера;

5. Результаты работы применяются в реализации образовательных программ бакалавриата (03.03.02) и магистратуры (03.04.02) по профилю «Медицинская физика» направления «Физика», в проведении научно-исследовательских работ студентов, аспирантов и сотрудников Физико-технического института СВФУ имени М.К. Аммосова.

#### **Личный вклад автора**

Большая часть экспериментальных и теоретических исследований выполнена автором лично или под ее непосредственным руководством. Автору принадлежит основная роль при выборе методов решения поставленных задач, анализе результатов и их обобщении. Автор является руководителем и ответственным исполнителем проектов, финансируемых Эндаумент фондом СВФУ имени М.К. Аммосова и Министерством науки и высшего образования РФ.

#### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность приведенных в работе результатов обеспечена большим объемом экспериментального материала, полученного с использованием современных физических, химических и численных методов исследования, приборов и высокотехнологичного оборудования, общепринятых измерительных методик и их модификаций с использованием современных программных средств, и методов статистической обработки данных.

#### **Апробация результатов**

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на Международных и Всероссийских конференциях, в том числе: V Конгресс международным участием «Экология и здоровье человека на Севере» (г. Якутск, 24-29 ноября 2014 г.), XXII Международная конференция «Анализ экспериментальных данных и моделирование процессов. Математика. Компьютер. Образование» (г. Пущино, 26-31 января 2015 г.), Всероссийская научная конференция с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке» (г. Саранск, 23-25 сентября 2015 г.), 5th Annual Conference of AnalytiX-2017 (Fukuoka, Japan, March 22-24, 2017), VIII

Международной конференции по математическому моделированию (г. Якутск, 4-8 июля 2017 г.), 2nd International Symposium on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine” (Москва, 10-14 октября, 2017 г.), XXV Международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» Симпозиума с международным участием «Биофизика сложных систем: вычислительная и системная биология; молекулярное моделирование; медицинская биофизика» (г. Дубна, 29 января - 3 февраля 2018 г.), 6th Annual Conference of AnalytiX-2018 (Miami, USA, March 26-28, 2018), Всероссийская научная конференция с международным участием «Сильно коррелированные двумерные системы: от теории к практике» (г. Якутск, 18-23 июня 2018 г.), XXVI Международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (г. Пущино, 28 января – 02 февраля 2019 г.), II Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (Москва, 15-16 февраля 2019 г.), Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 25-27 февраля 2019 г.), 7th Annual Conference of AnalytiX-2019 (Singapore, April 12-14, 2019), XI Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни» в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (г. Москва, 1-3 апреля 2019 г.), VIII съезд Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (23–26 мая 2019, Воронеж), International conference «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (Beijing, China. 2019. July 31), III международный конгресс ассоциации ревмоортопедов (Москва, 20-21 сентября 2019 г.), XXVII Международная конференция "Математика. Компьютер. Образование" (г. Дубна, 27 января - 1 февраля 2020 г.), III Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (г. Москва, 14-15 февраля 2020 г.), IX Международная конференция по математическому моделированию, посвященная 75-летию Владимира Николаевича Врагова (г. Якутск, 27 июля – 01 августа 2020 г.), VII Троицкая конференция с международным участием (Москва, 19-21 октября 2020 г.), VI съезд травматологов-ортопедов Дальневосточного федерального округа совместно со Всероссийской научно-практической конференцией с международным участием «Травматология, ортопедия и восстановительная медицина Дальнего Востока: достижения, проблемы, перспективы» (г. Чита, 16–17 сентября 2021 года), Всероссийская конференция «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (г. Махачкала, 1-3 октября 2021 г.), APMAS 2021, 11th International Advances in Applied Physics & Materials Science Congress & Exhibition (Muğla, Turkey. October 17-23, 2021), VI Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 21–23 декабря 2021 г.), V Всероссийский научно-образовательный

конгресс с международным участием «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (Москва, 18-20 февраля 2022 г.), VIII Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, 6-8 сентября 2022), Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Особенности оказания онкологической помощи на территориях с малой плотностью населения» (г. Якутск, 16-17 июня 2022 г.), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Интеграция наук: междисциплинарность в медицине» (г. Якутск, 20 – 22 июня 2022 г.), VI Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (Москва, 10-12 февраля 2023 г.), X Международная конференция по математическому моделированию, посвященная 30-летию Академии наук РС (Я) (г. Якутск, 16 - 20 июля 2023 г.); Международная конференция Физика.СПб (г. Санкт-Петербург, 23-27 октября 2023 г.), Международная конференция Физика.СПб (г. Санкт-Петербург, 21-25 октября 2024 г.).

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.1 — Радиобиология по направлению исследований: 1. Исследование закономерностей биологического ответа на воздействие ионизирующих излучений (исследование влияния ионизирующего излучения на эритроциты и НРС крови пациентов с диагнозом РШМ во время ЛТ, во время проведения эксперимента по изучению влияния фракционного ионизирующего излучения на организм обезьян в модельных условиях); 3. Механизмы формирования клеточных, молекулярных, генетических изменений в клетках млекопитающих и человека при действии различных видов излучений с разными физическими характеристиками (изменения морфологии эритроцитов, формирование и распространение экзосом в крови, изменения в составе химических соединений крови во время ЛТ, во время проведения облучения обезьян в модельных условиях, исследование поверхности эритроцитов во время лучевой терапии методом СЭМ и АСМ, влияния ИИ на наличие вирусных частиц и экзосом в крови во время ЛТ методами микроскопии, ИК и КР спектроскопии, ПЦР-РВ, иммунофлуоресцентного анализа); 8. Медицинская радиобиология: радиобиология опухолей, основы лучевой терапии опухолей; индивидуальная радиочувствительность; противолучевая защита и создание новых радиопротекторных препаратов; радиационная иммунология и гематология; радиационная гигиена и эпидемиология (исследование морфологии эритроцитов, НРС во время лучевой терапии методом СЭМ и АСМ; моделирование физических характеристик эритроцитов пациентов с диагнозом РШМ и во время ЛТ).



Исследования **поддержаны** Эндаумент фондом Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова («Комплексный научно-исследовательский проект по медицинской физике», 2019-2025 гг.), Министерством науки и высшего образования Российской Федерации («Разработка и внедрение новых комплексных подходов исследования актуальных задач медицины, сельского хозяйства, промышленности, в том числе, обработки драгоценных камней, а также палеонтологии, биологии, вирусологии с применением методов спектроскопии, микроскопии и радиационных технологий» № FSRG-2021-0014, «Междисциплинарные исследования и разработки в области медицины, палеонтологии и экологии с применением радиационных технологий» № FSRG-2024-0002).

**Публикации.** Основные результаты диссертации отражены в 41 публикациях, в том числе 21 статье в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus и входящих в ядро РИНЦ.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 325 страницах печатного текста и включает 148 рисунка и 6 таблиц. Работа состоит из введения, 5 глав, заключения. Список литературы включает 371 наименование.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, определена цель работы, поставлены задачи, указаны научная новизна и практическая значимость работы, перечислены основные защищаемые положения.

**Первая глава** является обзорной, в которой излагается цель, методика исследования и постановка задачи.

В настоящее время все более широкое распространение приобретают исследования и методы, которые в комплексе могут обеспечить использование высокотехнологичного физического и биологического оборудования, вычислительной техники, математического моделирования, численного и натурального экспериментов.

В настоящее время, в связи с необходимостью проведения эффективных научных исследований и формирования нанобиотехнологий для диагностики биологического объекта на уровне наноразмерных структур (НРС) основное внимание уделяется использованию электронных микроскопов (ЭМ), в том числе сканирующих (растровых) электронных микроскопов (СЭМ). Эти подходы позволяют выявить молекулярные и субмолекулярные механизмы биологических процессов и причины их изменений при возникновении (этиологии) заболеваний и их развития. Например, это результаты, полученные с помощью ЭМ [14], которые предлагают использовать для анализа изменений в клетках при раке поджелудочной железы. Именно с помощью ЭМ исследуют

внеклеточные везикулы, которые выполняют важную роль как в росте первичной опухоли, так и в процессе образования метастазов [15]. Очевидно, что контроль за формированием и транспортом НРС (везикул, экзосом), которые могут рассматриваться как биомаркеры и новые терапевтические мишени, может остановить или снизить темпы прогрессирования рака, и стать необходимым способом прогнозирования и предотвращения будущего метастатического развития.

Однако, роль экзосом (везикул) во множестве биологических процессов, размер и морфология их относительно неизвестны. В настоящее время, только такие физические методы, как СЭМ, обеспечивают пространственное разрешение, необходимое для визуализации НРС, и обычно используются для исследования клеток. Например, аналогичные исследования по выявлению рака, контролируя характеристики везикул также проводят на кафедре медицинской биофизики клетки в университете Твенте.

Таким образом, цель и задачи настоящего исследования являются актуальными для формирования нового направления молекулярных биологических исследований параметров и распределения наноразмерных биологических объектов, модифицируя конкретные режимы работы СЭМ, методики пробоподготовки и разрабатывая математические модели биологических объектов. Для СЭМ исследований в биомедицине и нанобиотехнологии необходимо повысить эффективность методик, связанных с разрешающей способностью и качеством изображений, на основе экспериментальных работ с применением существующих модификаций СЭМ, а также физики взаимодействия ионизирующего электронного излучения с биологическим образцом.

Особый научный интерес для биомедицины представляют исследования состояний эритроцитов в норме и при патологии, проявляющихся в изменении их форм и размеров, обусловленные адсорбцией НРС, что приводит к изменениям их электрических характеристик. Эти параметры эритроцитов при патологии организма коррелируют с различными расстройствами физиологических функций и нарушениями деятельности отдельных систем и органов. Мы обращаем особое внимание на исследование морфологии поверхности эритроцитов как платформы для адсорбции НРС, что важно при разработке диагностики онкологических заболеваний, которые сопровождаются увеличением числа сосудов в опухоли и возможности распространения эритроцитов в них, что повышает эффективность предлагаемого нами подхода.

Известно, что вирусы папилломы человека 16 и 18 типов (ВПЧ) являются причиной возникновения РШМ. Размеры ВПЧ составляют около 45 нм. Факт того, что НРС сходных размеров могут быть обнаружены в крови и то, что в крови у пациентов с РШМ были обнаружены участки ДНК вируса может свидетельствовать о том, что часть из этих НРС

могут являться экзосомами и вирусами. Также в последнее время были получены существенные доказательства, свидетельствующие о том, что ВПЧ может играть определенную роль в развитии рака молочной железы. Кроме того, важная задача разработки методик мониторинга состояния пациентов во время лучевой терапии, являющейся одной из основных в терапии раковых заболеваний, с учетом существующих проблем неясности происхождения явлений метастазирования и рецидивов рака после применения современных радикальных методов терапии, требует внедрения новых подходов в ее решении.

Исходя из того, что на клеточном и молекулярном уровнях состояния пациентов во время и после лучевой терапии практически не исследован, необходимо внедрение методов исследования с применением микроскопии, в том числе СЭМ. Однако, в настоящее время мало изучены эмиссионные характеристики и конфигурации полевых и термополевых эмиттеров электронных пучков в электронно-оптических системах СЭМ для изучения биологических образцов, атомы которых состоят из легких элементов, что в данное время не позволяет изучать биообразцы на нанометровом диапазоне размеров исследуемых биологических образцов, что имеет важное значение в фундаментальных исследованиях проводимых в биомедицине и клинических исследованиях в медицине в целях диагностики и мониторинга эффективности терапии заболеваний. Влияния управляющего и фокусирующего магнитного поля на эмиссионные характеристики как полевого, так и термополевого электронных катодов также недостаточно изучены. Имеющие экспериментальные данные не дают достаточно полной картины влияния внешнего магнитного поля на характеристики рассматриваемых источников, возможно из-за малого значения магнитных полей создаваемых в настоящее время.

В первой же главе рассмотрена физика электронной микроскопии в задачах определения режима работы СЭМ и пробоподготовки для исследования формирования и распределения НРС в исследованиях биологических образцов.

**Во второй** главе приводится описание объектов исследования, методик экспериментальных исследований, перечень оборудования и программного обеспечения, используемых в работе.

Объектами исследования данной диссертационной работы служили сухие мазки и специальным образом подготовленные образцы биологических жидкостей пациентов и млекопитающих.

Для исследования морфологии эритроцитов при различных видах патологии и обнаружения на них НРС объектами исследования были: сухие мазки крови и мочи 44 детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии, 6 пациентов с заболеваниями почек, 50

пациентов с диагнозом РШМ, 4 пациентов с РМЖ, 8 из трупного материала; синовиальной жидкости, полученные при пункции коленного сустава 101 пациентов; специальным образом подготовленные образцы венозной крови 5 пациенток с диагнозом РШМ для исследования методом ПЦР-РВ и образцы венозной крови 18 пациентов с диагнозом РШМ и 9 пациентов с диагнозом РМЖ для исследования методом иммунофлуоресцентного анализа, а также образцы крови 40 обезьян.

Пациентам с диагнозом РШМ проводилась лучевая терапия с использованием ускорителя Elekta Synergy MultiSource HDR (Германия, брахитерапевтический аппарат с источником Кобальт-60).

В серии экспериментов по исследованию воздействию ионизирующего излучения (ИИ) на параметры крови обезьян облучение проводилось на установке УПГД 2М с источником излучения цезий Cs<sup>137</sup>.

В диссертационной работе были использованы следующие методы исследования: для определения характеристик и выбора оптимальных режимов работы СЭМ в исследовании биообъектов использовался сканирующий электронный микроскоп JSM 7800 F фирмы JEOL; для формирования наноструктурированной подложки окисление графита проводили по модифицированному методу Хаммерса; исследование морфологии эритроцитов крови с помощью ACM Solver Next фирмы NT-MDT в полуконтактном режиме; спектральный анализ мазков крови проводился с помощью ИК спектрометра Varian 7000 FT-IR (USA) (диапазон 4000 - 400 см<sup>-1</sup> с разрешением 2 см<sup>-1</sup>) методом нарушенного полного внутреннего отражения; линейные размеры эритроцитов и НРС определяются с помощью программы JMicroVision 1.2.7.; КР спектроскопия образцов крови проводилась на установке NTEGRA Spectra с конфокальной КР/флуоресцентной микроскопией и спектроскопией, длина волны источника излучения 532 нм при температуре помещения 23°C; для исследования крови обезьян проводили с помощью центрифуги Adams Readacrit CT-3400, спектрофотометра Specol 11 (Zeiss) при длине волны 540 нм, программы "МОРС", пакет программ Matlab 7.5., аргонового лазера, оригинальной программы Raman, разработанной в лаборатории биофизики клетки биологического факультета МГУ; для обнаружения специфических фрагментов циркулирующей ДНК ВПЧ в крови пациентов использовали метод ПЦР-РВ. ПЦР-РВ исследование проводилась на амплификаторе CFX96 (Biorad) с использованием готовой реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Evrogen) согласно параметрам, рекомендуемым производителем. Для детекции фрагментов ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагментов ДНК, кодирующих β-глобин генома человека, использовались праймеры MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'/5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') и PC03/04 (5'-ACACAACCTGTGTTCACCTAGC-3'/5'-

СААСТТСАТССАСГТТСАСС-3') соответственно; для определения длины ампликонов определяли методом электрофореза в агарозном геле; для характеристики химического состава НРС на поверхности эритроцитов использовали метод МФА; для проведения эксперимента были использованы первичные антитела Ms Anti-Papilloma virus antibodies против папилломавирусов белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 MAB837 (Sigma-Aldrich); первичные антитела ARG56108 ARIGO против белка HPV16 L1 с идентификатором CamVir-1; вторичные антитела Goat Anti-Mouse IgG Antibody представлены козыими поликлональными антителами против H и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированными с флуоресцеином (FITC) (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI); подготовленные специальным образом образцы визуализированы при помощи инвертированного микроскопа ZEISS Axio Vert.A1 F, камеры ZEISS AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss, Германия), программного обеспечения ZEN lite 2012 и системы цифровой визуализации Celena S (Logos Biosystems, Корея) с флуоресцентным фильтром FITC; численный расчет математических моделей, представляющих собой системы обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка с начальными условиями, был произведен с помощью численного метода Рунге Кутты 4 порядка и система компьютерной алгебры Mathcad.

Последующие главы являются оригинальными.

**В третьей** были рассмотрены режимы работы в исследованиях биологических образцов, а также задачи при исследованиях патологий с применением СЭМ. Исследования биологических образцов – сухих мазков крови на стеклянных подложках производились при низких киловольтных ускоряющих напряжениях (1-3 кВ) на СЭМ JEOL JSM 7800F с разрешающей способностью 1,2 нм (при 1 кВ) с использованием и без проводящих покрытий. Применение проводящего покрытия ограничивало возможность исследования нанообъектов, т. к. толщина слоя наносимого слоя покрытия было соразмерно с величинами малых вирусов. При данном исследовании рассматриваются СЭМ изображения, полученные путем детектирования вторичных электронов с образцов с помощью нижнего детектора микроскопа. Такие ускоряющие напряжения позволяют не покрывать поверхность образцов проводящим слоем, что увеличивает возможности повышения качества изображения при таких низких ускоряющих напряжениях. Толщина мазков равняется примерно толщине эритроцитов крови – от 2 до 2.5 микрон. Размеры образцов составляли около 20x20 мм. Образцы закреплялись с помощью проводящего двухстороннего углеродного скотча, который позволяет частично снимать наведенную зарядку образца. Для улучшения качества изображения менялись параметры работы микроскопа, в том числе рабочее расстояние WD.

Установлено, что для данной модификации СЭМ при проведении экспериментов с образцами крови в виде сухих мазков на предметном стекле необходимо работать при низком ускоряющем напряжении 1 кВ без напыления проводящего слоя на образец с использованием нижнего детектора вторичных электронов и с выбором рабочего расстояния  $WD=3.9$  мм.

Таким образом, для определения подходов в выборе параметров в разработке метода исследования образцов крови с применением СЭМ было предложено, что существует зависимость качества изображения от четкого определения режима работы СЭМ с учетом большого влияния  $WD$  на него. Качество изображений влияет на проведение анализа морфологии эритроцитов, что является важной информацией в изучении патологии, выявления особенностей его проявления на клеточном уровне.

В настоящее время при СЭМ исследованиях мазки крови наносятся на подложки, как правило, стеклянные, которые являются электрическими изоляторами. В то же время, недостаточно изучена роль подложек на формирование контрастных СЭМ изображений крови при использовании низковольтных ускоряющих напряжений. Эффект зарядки поверхности образцов существенно ограничивает возможности СЭМ при исследовании объектов с размерами меньше 1 мкм. Для проверки влияния подложек на качество изображений использовали мазки крови детей с гематурией и пациентов с диагнозом РШМ и были обнаружены наноразмерные объекты (от 30 до 300 нм). Выбор образцов крови детей с гематурией был обусловлен тем, что существуют предположения о вирусной этиологии некоторых видов гломерулонефритов, основным симптомом которых является гематурия. Очевидно, что контроль за формированием и распространением наноразмерных биообъектов является основой для максимально эффективного исследования влияния физико-химических свойств подложек на качество изображения, получаемых с помощью СЭМ. Таким образом, целью данной работы стало изучение влияния различных подложек (изолирующих и проводящих) на качество изображений, получаемых с помощью СЭМ, при исследовании сухих мазков крови. Для проведения экспериментов были использованы подложки на основе стекла (предметное стекло), кристаллов кремния (КДБ5-15), восстановленного оксида графена (ВОГ), ВОГ с наночастицами серебра (СНЧ) и стеклянные подложки, напыленные титаном. Суспензию оксида графена (ОГ) получали окислением графита по модифицированному методу Хаммерса. Для приготовления суспензии с наночастицами серебра (НЧ) к 1,25 мл воды добавляли водные растворы цитрата натрия (1 мл) и нитрата серебра (0,25 мл). Далее растворы серебра НЧ и ОГ смешивали в объемном соотношении 1:1. Измерения методом атомно-силовой микроскопии показали, что толщина нанокompозитных пленок составляет от нескольких

единиц до десятков нанометров. Полученные образцы были частично восстановлены обработкой при температуре 250°C в течение 30 минут в атмосфере аргона с целью снижения содержания функциональных групп кислорода в ОГ. Удельные сопротивления стекла, кремния, ВОГ (rGO), ВОГ с СНЧ (GO-Ag Nps) и титана составляют  $10^{11} - 10^{13}$ ,  $2 \cdot 10^5$ ,  $0,05 \cdot 10^{-3} - 0,5 \cdot 10^{-3}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $4,2 \cdot 10^{-5}$  Ом·см, соответственно. Наибольшее разрешение было получено при использовании подложек на основе ВОГ с СНЧ, обладавшего наиболее высокой электропроводностью.

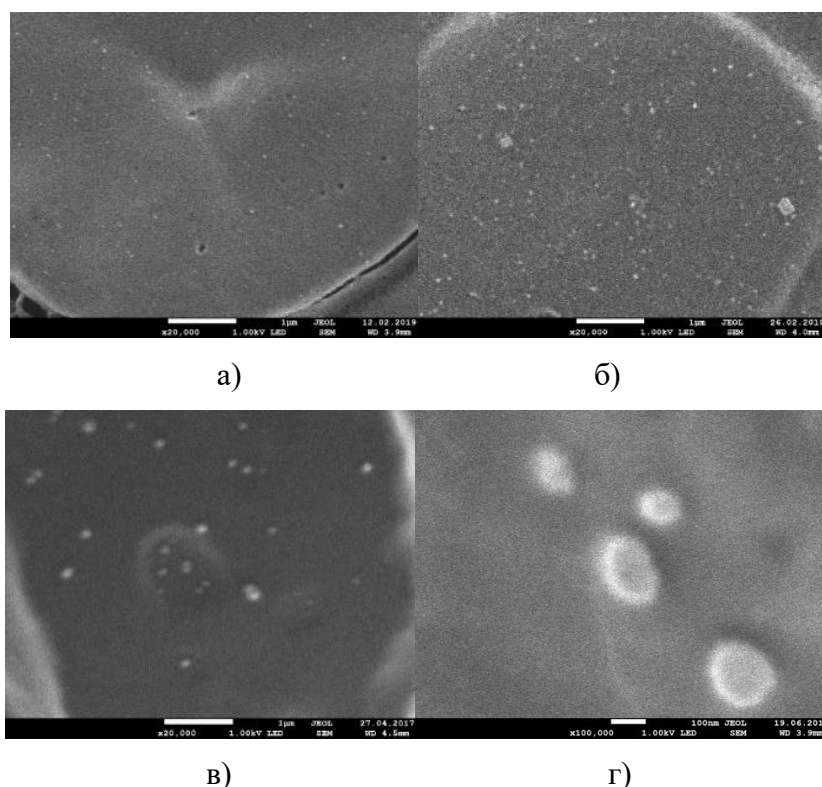


Рисунок 1. СЭМ изображения эритроцитов крови детей с гематурией и пациентов с диагнозом РШМ, полученные на подложке: из стекла при увеличении 20.000x (а); на основе кремния (20.000x) (б); на основе восстановленного оксида графена (20.000x) (в); на основе оксида графена с наночастицами серебра (100.000x) (г).

Итак, уменьшение электрического сопротивления подложек, используемых для исследования мазков крови, приводит к увеличению разрешения наноразмерных объектов в изображениях СЭМ. Данный эффект объясняется устранением эффекта зарядки, существенного для изолирующих подложек.

Во третьей главе рассмотрены примеры использования СЭМ в выбранном режиме в исследованиях размеров и морфологии эритроцитов образцов крови при различных патологиях: заболеваниях почек у детей с синдромом гематурии, в том числе заболевание Берже, и у взрослых, рака шейки матки, холодовых травмах, а также синовиальной жидкости при патологии суставов. В ходе исследований были выявлены особенности дисморфии эритроцитов при различных патологиях, а также наличия на поверхности

эритроцитов нанообъектов, размеры которых были сопоставимы с размерами вирусов и везикул.

По результатам СЭМ исследований образцов капиллярной крови в виде сухих мазков 20 детей с синдромом гематурии и 6 детей контрольной группы установлено, что наблюдаются большое количество сцепленных эритроцитов, так называемых «монетных столбиков», распределения эритроцитов имеют вид одиночных пиков с одинаковыми ширинами на полувысоте пиков, смещенных относительно друг друга. Линейные размеры эритроцитов и НРС на них определяются с помощью программы JMicroVision 1.2.7. Данные, определенные с помощью JMicroVision 1.2.7, вводятся в Excel и стандартными методами строятся гистограммы размеров эритроцитов и НРС на поверхности эритроцитов. Их средние значения, дисперсии, стандартные отклонения, распределения эритроцитов и НРС по размерам определяются с использованием закона нормального распределения Гаусса.

Среднее значение линейных размеров эритроцитов мазков крови контрольной группы составило  $6.90 \pm 1.03$  мкм, а среднее значение диаметров эритроцитов пациентов с синдромом гематурии –  $7.64 \pm 1.14$  мкм. Также выявлено, что до лечения в крови детей с синдромом гематурии на поверхности некоторых эритроцитов наблюдается большое количество в среднем от нескольких десятков до нескольких сотен (например, до 1600) НРС на поверхности эритроцита, в то время как в плазме крови НРС наблюдаются в незначительном количестве.

Установлено, что на поверхности клеток локализованы в большом количестве НРС, размеры которых составляют 45–50 нм, и в меньшем количестве НРС с размерами 100-300 нм. НРС данных размеров в существенно меньшем количестве присутствуют также и вне клеток (на плазме).

Наряду с исследованиями крови детей с синдромом гематурии были исследованы образцы венозной крови 50 пациентов с диагнозом РШМ, поступивших в радиотерапевтическое отделение Якутского республиканского онкологического диспансера, до проведения ЛТ. В образцах крови всех пациентов методом СЭМ были обнаружены на поверхности эритроцитов НРС различных размеров, значения которых варьировались от 30 до 60 нм и от 100 до 300 нм. Важно, что НРС с размерами 45-50 нм сравнимы с размерами ВПЧ (50-55 нм), лишенных внешней оболочки и капсиды которых имеют сходные размеры. Этим же размерам соответствуют размеры вирусов гепатита В и С, имеющих суперкапсиды. Размеры более крупных частиц (от 100 до 300 нм) соответствует размерам вириона герпеса и цитомегаловируса.



С помощью ИК спектроскопии исследовали состав белков и липидов сухих мазков крови детей при патологии (острый и хронический гломерулонефриты, геморрагический васкулит, тубулоинтерстициальный нефрит, IgA нефропатия), что позволило выявить взаимосвязь изменений формы и размеров эритроцитов в присутствии НРС на поверхности эритроцитов, выявленные с помощью СЭМ, с изменениями химического состава образцов. Анализ мазков крови проводился с помощью ИК спектрометра Varian 7000 FT-IR (USA) (диапазон  $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$  с разрешением  $2 \text{ см}^{-1}$ ) методом нарушенного полного внутреннего отражения. Полученные результаты исследования свидетельствует о существенных изменениях состава белков эритроцитов в присутствии НРС (пациентов образцов крови в зависимости от видов патологии почек). Очевидно, что с помощью ИК спектроскопии крови можно оценить изменения не только молекулярного состава, но и конформации ряда белков крови (альбумин, или гемоглобин), а также, более четко охарактеризовать молекулярные изменения или появление новых молекул (экзосомы) при патологии.

Итак, в ходе проведенного с помощью методом СЭМ исследования установлено, что у детей с синдромом гематурии и у пациентов с РШМ наблюдается большое количество дисморфных эритроцитов, так и НРС на клеточной поверхности.

Для подтверждения результатов СЭМ исследований и выяснения изменений рельефа поверхности плазматической мембраны эритроцита в присутствии НРС на поверхности эритроцитов использовали метод АСМ. С помощью АСМ исследований тех же эритроцитов были выявлены характерные изменения форм и размеров эритроцитов при наличии НРС на поверхности эритроцитов.

Общее охлаждение и отморожения являются одними из тяжелых видов холодовой травмы, зачастую приводящие к высокому уровню инвалидизации и летальному исходу пострадавших. В настоящее время в мире до конца не изучены вопросы смерти от общего охлаждения в условиях сверхнизких температур окружающей среды (ниже  $-40^{\circ}\text{C}$ ). Объектами изучения были мазки крови из трупного материала восьми умерших от различных причин (два от колото-резаных ран, три от огнестрельных ран, три от переохлаждения при температуре от  $-60^{\circ}\text{C}$  до  $-45^{\circ}\text{C}$ ), подготовленные в «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения РС(Я). В ходе исследований эритроцитов методом СЭМ и АСМ было показано, что в мазках крови у умерших от общего переохлаждения преобладали эхиноциты, в то время как у умерших от ранений преобладали акантоциты (необратимо измененные формы эритроцитов).

В ряде случаев (при исследованиях синовиальной жидкости коленного сустава) обнаружены НРС с размерами, сопоставимыми с размерами вирусов – около 50 и 100 нм

(рис. 2 а)), и биологические структуры обладающие размерами более 1 микрона (рис. 2 б) и в)).

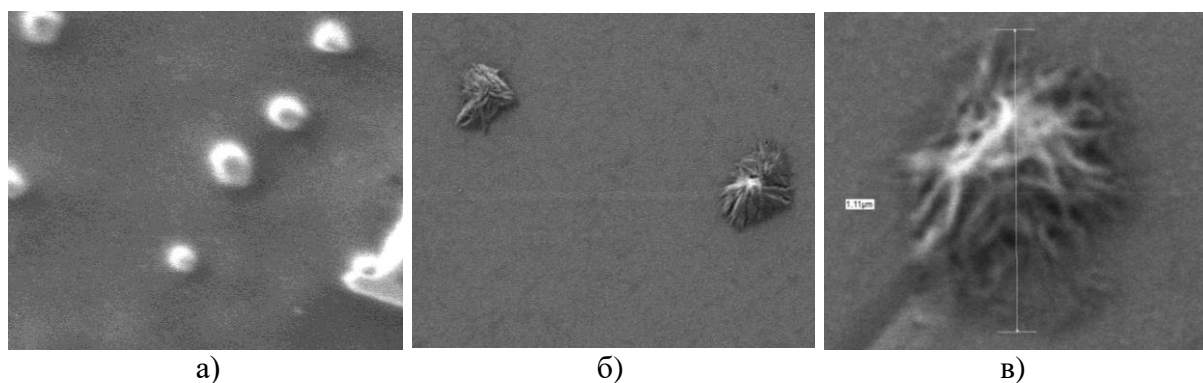


Рисунок 2. СЭМ изображения образца синовиальной жидкости: а) НРС ( $100\pm 15$  нм) при увеличении в 50 000 раз; биологических объектов при увеличениях: б)  $\times 10\ 000$ ; в)  $\times 60\ 000$  с указанием его размера (1.11 мкм).

Нами доказано, что СЭМ является весьма информативной методикой обследования при различных патологиях. Перспективность ее использования заключается в выявлении патологии на ранних стадиях и возможности более детальной оценки динамики лечения.

Таким образом, представленные результаты исследований поверхности и состава мембран эритроцитов в присутствии НРС (различных патологий) свидетельствуют о возможности широкого и эффективного применения СЭМ в качестве метода для создания комплексного исследования и диагностики формирования и распространения НРС в клетках и биологических жидкостях, используя низкие энергии ускорения электронных пучков, а также с высоким пространственным разрешением и эффективностью контроля формирования биологических объектов на поверхности эритроцитов.

В четвертой главе представлены результаты исследования влияния радиации на эритроциты крови пациентов до, во время и после лучевой терапии (ЛТ) (дистанционной и контактной), а также эритроциты обезьян в модельных экспериментах.

Дистанционная гамма-терапия, внутриволостная гамма-терапия пациентов проводились в радиотерапевтическом отделении Якутского Республиканского онкологического диспансера на линейных ускорителях Elekta Synergy (Швеция) с облучением опухоли по схеме: 2 Гр  $\times$  (5 и 15) и аппарате «MultiSource HDR» с источником Кобальт-60 (Германия) по схеме: 5 Гр  $\times$  5. Дистанционная терапия проводилась различными методами (IMRT, IGRT, VMAT), чтобы обеспечить точное подведение к опухоли высоких доз, к области здоровых тканей – низких доз облучения. Рассматривались образцы крови 37 пациентов с диагнозом РШМ. С помощью методов СЭМ и АСМ установлено, что при терапии, ионизирующее излучение влияет на размер и морфологию

эритроцита, возрастает как общее количество дисморфных эритроцитов, так и число, и диапазон размеров НРС (рис. 3).

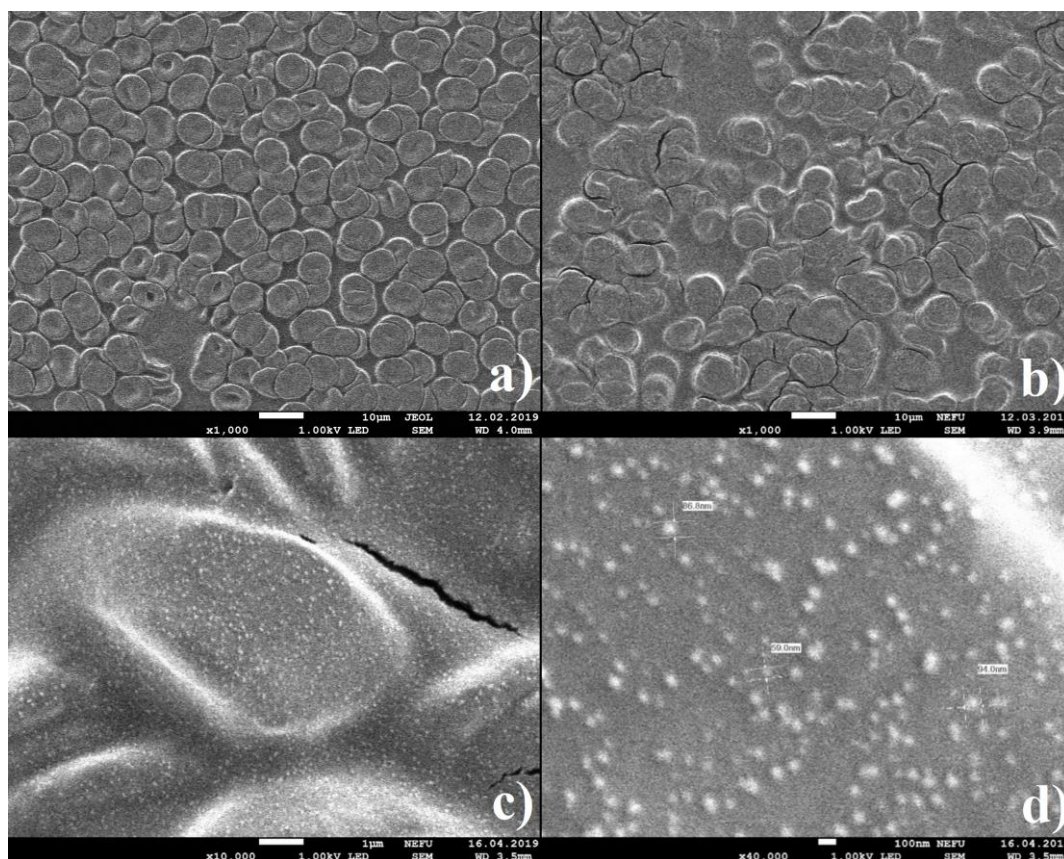


Рисунок 3. Наноразмерные объекты на поверхности эритроцитов до (а) и во время (b, c, d) лучевой терапии образца крови пациентки с РШМ при увеличении в 1.000, 10.000 и 40.000 раз и ускоряющем напряжении 1 кВ.

Установлено, что средняя величина диаметра эритроцита крови доноров контрольной группы, составляет  $8,38 \pm 0,36$  мкм, а у больных –  $9,41 \pm 0,47$  мкм (по данным АСМ исследования). Средняя величина диаметра НРС, обнаруженных на поверхности эритроцитов пациентов, составила  $69,91 \pm 12,15$  нм, а средняя высота –  $23,75 \pm 3,70$  нм. После курса терапии морфология эритроцитов восстанавливается и количество НРС снижается. На рисунке 4 представлено распределение линейных размеров НРС у пациентов во время проведения ЛТ, полученный на основе СЭМ данных.

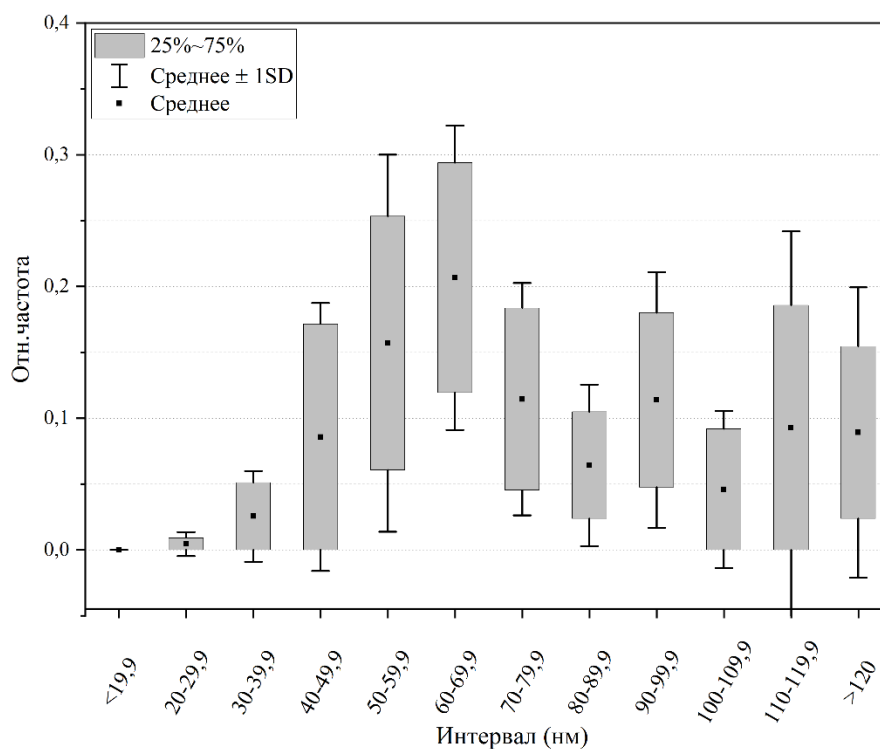


Рисунок 4. Распределение линейных размеров наноразмерных структур на поверхности эритроцитов крови пациентов с диагнозом РШМ.

Размеры НРС, локализованные на поверхности эритроцитов до ЛТ, соответствуют размерам вирусов, и распределение размеров которых имеет дискретный характер в небольшом диапазоне (НРС-В). А размеры НРС, появляющихся в большом количестве во время ЛТ, соответствуют размерам экзосом, и для них было получено непрерывное распределение линейных размеров НРС в более широком диапазоне (НРС-Э).

В ходе дальнейших исследований, анализа и сопоставления СЭМ изображений НРС были обнаружены различия в их морфологии и количества в зависимости от условий ЛТ. Установлено, что НРС-В имеют более четкие контуры, их значительно меньше по сравнению с числом НРС-Э, возникающих во время ЛТ. Нами доказано, что НРС-Э равномерно распределены не только на поверхности эритроцитов, но и обнаруживаются в плазме крови. Количество НРС-В в некоторых образцах уменьшается во время ЛТ, в то время как НРС-Э могут как увеличиваться, так и уменьшаться в количестве в ходе ЛТ. Линейные размеры НРС-Э характеризуются распределением Гаусса, т.е. имеют нормальное непрерывное распределение в одном диапазоне, в то время как НРС-В имеют нормальное распределение размера в определённых диапазонах с различными средними значениями, т.е. имеют дискретное распределение средних значений во всем диапазоне их линейных размеров. Также количество НРС-В, имеющих разные линейные размеры, существенно

отличаются. С помощью рентгеновского излучения СЭМ установлен характерный элементный состав НРС.

Выявленные различия в размерах и составе НРС могут служить основанием для предположения об их различной природе и рассматриваться в качестве критерия при оценке эффективности ЛТ состояния пациента во время ЛТ, а также для прогноза его состояния после терапии.

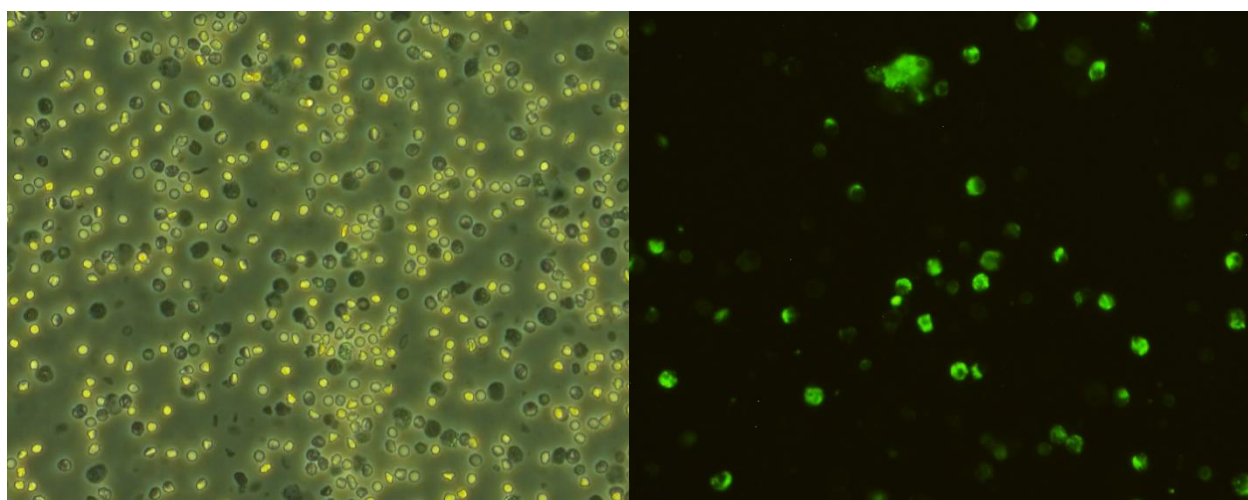
Кроме того, в четвертой главе представлены результаты химической идентификации наноразмерных частиц на поверхности эритроцитов – определения их физико-химической природы с помощью метода КР спектроскопии, ПЦР исследования, иммунофлуоресцентного анализа.

При исследовании венозной крови пациентов с диагнозом РШМ, проходивших дистанционную и контактную ЛТ и получивших суммарную дозу 50 Гр, методом КР спектроскопии с применением аппарата NTEGRA Spectra NT-MDT выявлено, что при патологии: способность гемоглобина связывать кислород снижена, концентрация дезоксигемоглобина незначительно снижена; заметно повышены число комплексов гемоглобина с NO и текучесть мембраны клеток; упорядоченность и плотность упаковки аминокислот повышены; повышена полярность окружения аминокислот. Методом КР выявлено, что после ЛТ: способность гемоглобина связывать кислород снижается; изменение концентрации дезоксигемоглобина не выявлено; незначительно снижается число комплексов гемоглобина с NO; увеличивается текучесть мембраны клеток; полярность окружения аминокислот сохраняется; упорядоченность и плотность упаковки аминокислот снижается. Изменение конформации гема гемоглобина человека при действии ЛТ, вероятно, обусловлено действием как радиации (это доказано на обезьянах), так и наличием НРС.

Для определения природы НРС, локализованных на поверхности мембраны эритроцита, контролировали наличие ДНК, которая может быть маркером РШМ, у пациенток с впервые выявленным РШМ в плазме и в эритроцитарной фракции крови. Так как в соответствии с результатами исследования методом СЭМ НРС на поверхности эритроцитов имели размеры сходные с размерами ВПЧ 16-го и 18-го типов, в крови пациентов с РШМ определяли наличие генов, соответствующих участку белка L1 ВПЧ, и генов, соответствующих участку  $\beta$ -глобина ДНК генома человека. Основной задачей данной серии экспериментов было доказать следующее: прикреплена ли циркулирующая ДНК, которая может быть маркером РШМ, к эритроцитам селективно (с рецептором) или неспецифически (на поверхности мембраны за счет электростатического взаимодействия с заряженными группами белков или липидов). В результате исследований у пациенток с

впервые выявленным РШМ, гены, соответствующие участку белка L1 ВПЧ и участку  $\beta$ -глобина ДНК генома человека, обнаруживались в эритроцитарной массе чаще, чем в плазме. Учитывая то, что продукты амплификации изучаемых генов исходной ДНК присутствовали в эритроцитарной массе, предполагается, что циркулирующая ДНК, которая может быть маркером РШМ, прикреплена к поверхности эритроцитов, скорее всего с помощью рецепторов.

Кроме того, были проведены исследования образцов крови пациентов с РШМ до и после проведения ЛТ методом иммунофлуоресцентного анализа с применением светового инвертированного микроскопа для идентификации НРС. Для выделения ДНК ВПЧ в эритроцитарной массе методом иммунофлуоресцентного анализа в качестве первичного и вторичного антител были использованы мышинные моноклональные антитела против белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 МАВ837 (Sigma-Aldrich) и козы поликлональные антитела против Н и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированные с флуоресцеином (FITC) (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI). В результате было обнаружено, что характерная флуоресценция в изображениях некоторых эритроцитов не исчезает и после ЛТ (рис. 5).



а) б)  
Рисунок 5. Изображения эритроцитов пациента с РШМ (400х):  
а) фазовый контраст; б) флуоресцентный режим.

Т.е. локальное радиационное воздействие на опухоли не влияет на наличие и физический механизм адсорбции или десорбции НРС на поверхности эритроцитов. Таким образом, можно утверждать, что ВПЧ может ассоциироваться и транспортироваться на поверхности эритроцитов, влияя на их морфологию, биофизические свойства, играть определяющую роль в распространении и развитии заболевания, иметь влияние на результаты терапии и рецидивов заболевания.

В связи с тем, что ЛТ человека оказывает влияние на состояние эритроцитов и формирование комплекса эритроцит и НРС, в данной главе представлены результаты комплексного исследования воздействия ионизирующего излучения на состояние эритроцитов (содержание гемоглобина в крови и гематокрит; изменения объема эритроцита; содержание конформация гемопорфирина гемоглобина) до и после воздействия на животное ионизирующего излучения (ИИ). Исследовали действие ИИ на параметры крови обезьян (макака-резус, самцы). Животных группы 1 облучали 1/10 суммарной дозы (50 сЗв) в течение 10 дней с перерывом в два дня, а животных группы 2 облучали 1/2 суммарной дозы (50 сЗв) в течение двух дней. Установлено, что режимы облучения влияют специфически на состояние эритроцитов и гемоглобина: при облучении снижение величины гематокрита становится более выраженным на 36 день у группы 1 и на 64 день у второй группы. Как правило, после облучения наблюдается снижение содержания гемоглобина, что может свидетельствовать об изменении кислородтранспортной функции кроветворной системы и формировании гипоксии в ходе облучения. С помощью КР спектроскопии исследованы молекулярные изменения каротиноидов плазмы крови и гема гемоглобина эритроцитов. Доказано, что после облучения в группе 2 микроокружение каротиноидов в липопротеиновых комплексах плазмы становится менее вязким, чем в группе 1. Данный результат свидетельствует о том, что на 36-е сутки в плазме крови животных группы 2 запускаются процессы, меняющие характер белок-липидных взаимодействий в липопротеиновых комплексах плазмы, в которых локализованы каротиноиды. В определенные дни после облучения происходят достоверные изменения свойств Гб в группах 1 и 2 по сравнению друг с другом. Вероятно, что облучения с разным режимом по-разному оказывают воздействие на Гб эритроцитов. Вероятно, ИИ, проводимое для группы 1, оказывает более выраженное действие на Гб, чем для группы 2. Различия в сродстве Гб к O<sub>2</sub>, наблюдающееся для группы 1 и группы 2 после первой серии облучений, не коррелируют с изменениями гематокрита или содержания Гб в крови, а связаны с другими процессами, влияющими на конформацию Гб. Результаты исследования содержания или конформации молекул каротиноидов в липопротеиновых комплексах плазмы крови позволяют разработать и внедрить методологию диагностики состояния целого организма.

В результате совместного использования методов иммунофлуоресцентного анализа, оптической, атомно-силовой и электронной микроскопии, а также ПЦР-РВ эритроцитарной массы венозной крови подтверждена, гипотеза о вирусной природе НРС, локализованных на поверхности эритроцита у пациентов с раком шейки матки. Установлено, что на цитоплазматической мембране эритроцитов локализованы частицы ВПЧ 16 и 18 типов.

Таким образом, вирусы циркулируют в крови пациента, прикрепляются на поверхности эритроцитов и это, влияет на развитие РШМ, его рецидивов и метастазирования.

Итак, в данной главе представлены результаты исследований, полученных с помощью методов АСМ, КР спектроскопии и иммунофлуоресцентного анализа, которые свидетельствуют о том, что на поверхности эритроцита локализованы наноразмерные биологические структуры, содержащие ДНК. Полученные данные свидетельствуют о правомерности использования СЭМ результатов для анализа данного механизма в норме и при патологии.

В **пятой главе** представлены математические модели биофизических свойств эритроцитов, сформулированные с учетом данных экспериментов, представленных в третьей и четвертой главах, и математические модели, сформулированные с учетом эмиссионных характеристик полевых и термополевых электронных катодов, которые являются источниками электронных пучков в СЭМ.

Результаты, полученные в ходе экспериментальных исследований, требуют разработки математических моделей и их численной реализации для их подтверждения и развития, а также выработки рекомендаций для создания новых модификаций СЭМ в области биомедицины и медицины, расширения возможностей применения СЭМ в исследованиях биологических образцов.

#### *Основные эмиссионные характеристики катодов СЭМ*

В настоящее время интенсивно развивается применение электронных микроскопов в медицине, в том числе СЭМ, разработанных для исследования большого количества проблем в различных областях с широким диапазоном ускоряющих электроны напряжений, энергии электронных пучков. Однако, разработка СЭМ с определёнными эмиссионными характеристиками, с диапазоном более низких энергий пучков для исследования биообразцов, является актуальной задачей. Действительно, модификация характеристик СЭМ оптимальных для решения биомедицинских задач позволит повысить эффективность исследования биоматериала не снижая качества изображения биообразцов. Для разработки новых СЭМ с определёнными характеристиками необходимо проведение менее затратных исследований с помощью численных методов на основе математических моделей процессов в электронно-оптических системах СЭМ.

Нами установлено, что при использовании СЭМ данной модификации, при увеличении более чем 50.000 раз ухудшается качество изображения – уменьшается пространственное разрешение, т.е. трудно получить необходимое качество изображения.



Это не позволяет более точно определить формы и размеры объектов с размерами менее ста нанометров.

Для повышения эффективности и разрешающей способности метода мы предложили использовать специальные подложки, что позволило повысить качество изображения НРС с размерами в диапазоне от 30 до 300 нм при увеличении 100.000 раз и более четко контролировать контуры, их формы и размеры. Повышение эффективности и качества изображения обусловлено снижением накопления приповерхностного заряда, который можно снять с помощью более проводящих подложек. Но в связи с необходимостью упрощения пробоподготовки мы предложили использовать подложку из стекла, что оптимально для создания технологии как фиксации эритроцитов, так и достаточного повышения качества изображения за счет снижения эффекта заряда с использованием углеродных скотчей для закрепления образцов при увеличении разрешающей способности микроскопа более чем в 50.000 раз.

С другой стороны, формирование математических моделей важно: во-первых, для создания опции и автоматизации поиска необходимого режима работы и во-вторых, определения новых структур электронно-оптической системы СЭМ с необходимыми параметрами для исследования биообразцов. Таким образом, математическое моделирование позволит автоматизировать, т.е. ускорить процесс поиска оптимального режима работы при исследовании биообразцов для определённой модификации СЭМ с учетом формы и размеров катодов, а также других параметров электронно-оптической системы, включая структуры анода, объективной линзы и т.д., а также с учетом износа катода, т.е. ослабления интенсивности тока пучка и степени рассеяния эмитируемых с поверхности катодов электронов, т.е. автоматизировать процедуру калибровки электронного пучка.

В связи с этим одной из задач данной работы было определение размера и формы пучка, основных эмиссионных характеристик термоэлектронного катода Шоттки (ТПЭК) СЭМ, находящегося под воздействием возбуждающего полевого электронную эмиссию (ПЭЭ) электрического поля и внешнего продольного магнитного поля путем исследования движения крайнего электрона пучка с учетом влияния пространственного заряда электронов пучка, внешнего магнитного поля. В модели ТПЭК аппроксимируются различными поверхностями второго порядка, например, эллипсоидом, вводится понятие граничного «крайнего» электрона, траекторией которого определяются форма и размер пучка. На основе предложенного допущения задача расчета эмиссионных характеристик вдоль траектории крайнего электрона острейшего ТПЭК, находящегося под воздействием

возмущающего ПЭЭ электрического поля  $\vec{E}$  и внешнего продольного магнитного поля  $\vec{B}$ , решается с помощью математической модели, включающей следующие уравнения:

1) уравнение движения крайнего электрона:

$$m\ddot{\vec{r}}_V = e\vec{E}^V + e[\dot{\vec{r}}_V, \vec{B}],$$

2) уравнения Максвелла:

$$\text{rot}\vec{E}^V = 0, \text{div}\vec{E}^V = 0,$$

где  $m, e$  — соответственно масса и заряд электрона,  $\vec{E}^V$  — напряженность электрического поля,  $\vec{B}$  — индукция внешнего магнитного поля;

3) уравнение движения крайнего электрона внутри пучка:

$$m\ddot{\vec{r}} = e\vec{E} + e[\dot{\vec{r}}, \vec{B}];$$

4) соответствующие уравнения Максвелла:

$$\text{rot}\vec{E} = 0; \text{div}\vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0};$$

5) уравнение непрерывности для плотности тока:

$$\text{div}\vec{j} = 0;$$

6) уравнение Ричардсона-Дэшмана (РД) с учетом эффекта Шоттки с пренебрежением величины коэффициента отражения электронов на границе тело-вакуум:

$$j_0 = A_0 T^2 \exp\left(-\frac{\phi - e\sqrt{eE_0}}{kT}\right),$$

где  $\rho$  — плотность пространственного заряда пучка эмитированных электронов,  $j_0$  — плотность тока на поверхности катода,  $E_0$  — напряженность электрического поля на поверхности катода,  $T$  — температура катода по абсолютной шкале Кельвина (К),  $A_0 = \frac{4\pi me k^2}{h^3} = 120.4 \frac{A}{\text{см}^2 \text{К}^2}$  — термоэмиссионная постоянная Зоммерфельда,  $k = 1.38 \cdot 10^{-23} \frac{\text{Дж}}{\text{К}}$  — постоянная Больцмана,  $e = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{Кл}$  — заряд электрона,  $\phi$  — работа выхода электронов;

7) условие на границе пучок-вакуум для крайнего электрона:

$$\frac{\dot{x}_1}{\dot{x}_2} = \frac{\dot{x}_1^V}{\dot{x}_2^V},$$

где  $\dot{x}_1^V, \dot{x}_2^V$  — компоненты скорости частицы заряда в криволинейных координатах вне пучка;  $\dot{x}_1, \dot{x}_2$  — компоненты скорости электрона в криволинейных координатах внутри пучка (в случае эллипсоидального катода  $x_1 = \sigma, x_2 = \tau$ , где  $\sigma$  и  $\tau$  — эллипсоидальные координаты).

Реализация модели заключается в совместном решении всех этих уравнений системы, в результате которого определяются траектория, скорость крайнего электрона, напряженности электрического поля, плотности тока.

Для того, чтобы понизить порядок дифференциальных уравнений второго порядка (уравнения движения), вводятся новые координатные переменные для эллипсоидального катода:

$$\xi = \tau \dot{\sigma} + \sigma \dot{\tau},$$

$$\eta = \frac{\sigma \dot{\sigma}}{\sigma^2 - 1} - \frac{\tau \dot{\tau}}{1 - \tau^2}.$$

В модели предполагается, что ось симметрии диода и магнитное поле имеют одинаковое направление, т.е. рассматриваемая система является аксиально-симметричной и поэтому векторы напряженности электрического поля внутри и вне пучка, а также плотности тока можно представить следующим образом соответственно:

$$\vec{E} = E_\sigma(\sigma, \tau) \vec{e}_\sigma + E_\tau(\sigma, \tau) \vec{e}_\tau,$$

$$\vec{E}^V = E_\sigma^V(\sigma, \tau) \vec{e}_\sigma + E_\tau^V(\sigma, \tau) \vec{e}_\tau$$

$$\vec{j} = j_\sigma(\sigma, \tau) \vec{e}_\sigma + j_\tau(\sigma, \tau) \vec{e}_\tau.$$

А координатные составляющие функций вектора напряженности и плотности тока можно рассматривать как произведение функций, зависящих только от одного из эллипсоидальных координат  $\sigma, \tau$ . Тогда напряженность электрического поля внутри и вне пучка в эллипсоидальных координатах ищем в следующем виде соответственно:

$$\vec{E} = \frac{F_\sigma(\sigma)G_\sigma(\tau)}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\sigma + \frac{F_\tau(\sigma)G_\tau(\tau)}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\tau;$$

$$\vec{E}^V = \frac{F_\sigma^V(\sigma)G_\sigma^V(\tau)}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} \vec{e}_\sigma + \frac{F_\tau^V(\sigma)G_\tau^V(\tau)}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} \vec{e}_\tau,$$

где  $F_\sigma, G_\sigma, F_\tau, G_\tau, F_\sigma^V, G_\sigma^V, F_\tau^V, G_\tau^V$  — компоненты вектора напряженности электрического поля внутри и вне пучка в эллипсоидальных координатах  $\sigma, \tau$ .

Для решения систем используются следующие выражения для координатных составляющих плотности тока:

$$j_\sigma = \frac{f_\sigma(\sigma)g_\sigma(\tau)}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}}, j_\tau = \frac{f_\tau(\sigma)g_\tau(\tau)}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}},$$

где  $f_\sigma, g_\sigma, f_\tau, g_\tau, f_\sigma^V, g_\sigma^V, f_\tau^V, g_\tau^V$  — компоненты плотности тока в эллипсоидальных координатах  $\sigma, \tau$ .

Таким образом, получена замкнутая система из 18 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка с 18-ю неизвестными:

$\sigma, \tau, \xi, \eta, F_\sigma, G_\sigma, F_\tau, G_\tau, f_\sigma, g_\sigma, f_\tau, g_\tau, \sigma_V, \tau_V, \xi_V, \eta_V, F_\sigma^V, G_\sigma^V, F_\tau^V, G_\tau^V$  для эллипсоидального ТПЭК:

$$\dot{\sigma}_V = \frac{\sigma_V^2 - 1}{\sigma_V^2 - \tau_V^2} (\xi_V \tau_V + \eta_V \sigma_V (1 - \tau_V^2)),$$

$$\dot{\tau}_V = \frac{1 - \tau_V^2}{\sigma_V^2 - \tau_V^2} (\xi_V \sigma_V - \eta_V \tau_V (\sigma_V^2 - 1)),$$

$$\dot{\xi}_V = \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} (\tau_V (\sigma_V^2 - 1)^{1/2} F_\sigma^V G_\sigma^V + \sigma_V (1 - \tau_V^2)^{1/2} F_\tau^V G_\tau^V),$$

$$\begin{aligned}
\dot{\eta}_V &= K_V + \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} \left( \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_\sigma^V G_\sigma^V - \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} F_\tau^V G_\tau^V \right) - \eta_V^2, \\
\dot{F}_\tau^V &= \frac{c_2}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_\sigma^V \dot{\sigma}_V, \\
\dot{G}_\sigma^V &= \frac{c_2}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_\tau^V \dot{\tau}_V, \\
\dot{F}_\sigma^V &= \left( \frac{c_3}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_\tau^V - \frac{\sigma_V}{\sigma_V^2 - 1} F_\sigma^V \right) \dot{\sigma}_V, \\
\dot{G}_\tau^V &= \left( -\frac{c_3}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_\sigma^V + \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_\tau^V \right) \dot{\tau}_V, \\
\dot{\sigma} &= \frac{\sigma^2 - 1}{\sigma^2 - \tau^2} (\xi \tau + \eta \sigma (1 - \tau^2)), \\
\dot{\tau} &= \frac{1 - \tau^2}{\sigma^2 - \tau^2} (\xi \sigma - \eta \tau (\sigma^2 - 1)), \\
\dot{\xi} &= \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)} (\tau (\sigma^2 - 1)^{1/2} F_\sigma G_\sigma + \sigma (1 - \tau^2)^{1/2} F_\tau G_\tau), \\
\dot{\eta} &= K + \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)} \left( \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} F_\sigma G_\sigma - \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} F_\tau G_\tau \right) \eta^2, \\
\dot{G}_\sigma &= \frac{c_4 G_\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} \dot{\tau}, \\
\dot{F}_\tau &= \frac{c_4 F_\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} \dot{\sigma}, \\
\dot{G}_\tau &= \frac{G_\sigma \dot{\tau}}{2(1 - \tau^2)^{1/2}} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2 - 1)^{1/2}}{\varepsilon_0 \dot{\sigma} F_\tau G_\sigma} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} - \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \\
\dot{F}_\sigma &= \frac{F_\tau \dot{\sigma}}{2(\sigma^2 - 1)^{1/2}} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2 - 1)^{1/2}}{\varepsilon_0 \dot{\sigma} F_\tau G_\sigma} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} + \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \\
\dot{f}_\sigma &= \frac{c_1 f_\sigma \dot{\tau}}{g_\tau (1 - \tau^2)^{1/2}} \frac{A_0 T^2}{f_\sigma(\sigma_0)} \exp \left( -\frac{\phi(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} - e\sqrt{eF_\sigma(\sigma_0)G_\sigma(\tau)}}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} k T} \right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} - \frac{\sigma}{\sigma^2 - 1} f_\sigma \dot{\sigma}, \\
\dot{g}_\tau &= \left( -\frac{c_1}{(1 - \tau^2)^{1/2}} \frac{A_0 T^2}{f_\sigma(\sigma_0)} \exp \left( -\frac{\phi(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} - e\sqrt{eF_\sigma(\sigma_0)G_\sigma(\tau)}}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} k T} \right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} + \right. \\
&\quad \left. + \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} g_\tau \right) \dot{\tau},
\end{aligned}$$

где  $c_1, c_2, c_3, c_4$  — постоянные, определяемые из начальных условий.

Полученная система, состоящая из 18 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка, решается с помощью численного метода Рунге-Кутты 4 порядка и расчетных параметров, значения которых соответствуют требованиям исследований биологических образцов, с применением программного обеспечения MathCAD 15.

В результате численных расчетов были получены траектории движения крайнего электрона, определяющие форму и размер пучка, а также значения напряженности электрического поля, плотности тока при различных условиях, скорости электронов: с учетом пространственного заряда; под влиянием внешнего магнитного поля при разных значениях индукции внешнего магнитного поля, в том числе и в условиях его отсутствия.

Кроме ТПЭК в работе рассматривались эмиссионные характеристики полевых электронных катодов (ПЭК) СЭМ с различными конфигурациями, которые аппроксимировались с помощью эллипсоида и параболоида. В случае ПЭК вместо уравнения Ричардсона-Дэшмана для плотности тока вблизи поверхности катода использовалась формула Фаулера-Нордгейма:

$$j_0 = aE_0^2 \exp(-b/E_0)$$

где  $j_0$  — плотность тока на поверхности катода,  $E_0$  — напряженность электрического поля на поверхности катода,  $a, b$  — постоянные величины.

Например, сравнение траекторий крайних электронов параболоидного диода при различных условиях (рис. 6), показывает, что учет пространственного заряда приводит к расширению пучка, а внешнее продольное магнитное поле фокусирует пучок.

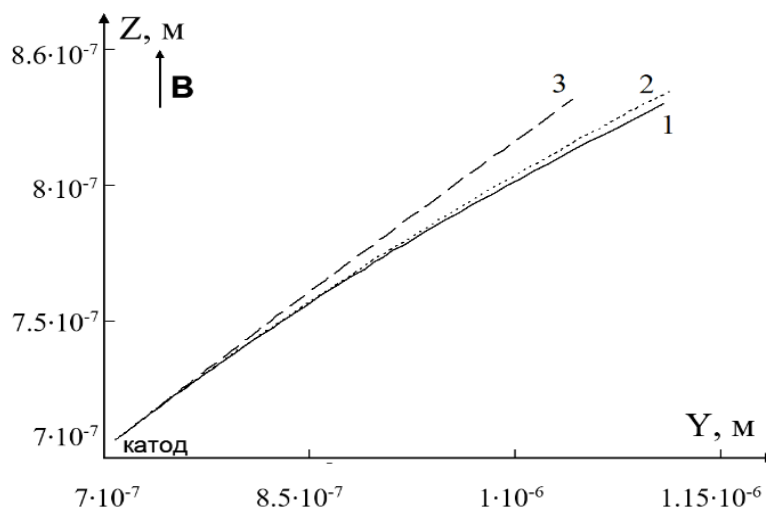


Рисунок 6. Сравнение траекторий крайнего электрона параболоидного катода с учетом пространственного заряда во внешнем магнитном поле при его различных значениях: 1 — без влияния внешнего магнитного поля; 2 — во внешнем магнитном поле  $B_1$ ; 3 — во внешнем магнитном поле  $B_2$  (при условии  $B_2 > B_1$ ).

Полученные результаты из предложенной модели формы и размеры пучков, определяемые траекторией «крайнего электрона», а также численные значения плотности тока, распределения напряженности электрического поля вблизи поверхности катода, а также расчет на основе этих данных значений токов пучка, позволили определить эмиссионные характеристики ТПЭК и ПЭК электронно-оптических систем СЭМ с уточнением формы и размеров ТПЭК и ПЭК, производить выбор оптимального режима работы СЭМ и т.д. Очевидно, что на основе результатов этих исследований, можно обсуждать и анализировать целесообразность создания макета СЭМ с определенными эмиссионными характеристиками для исследований биообразцов, разработки новых и развития уже применяемых методов диагностики и терапии в медицине, в

междисциплинарных научно-исследовательских работах с улучшением качества изображения.

*Математические модели электрических характеристик эритроцитов в условиях прикрепления к ним НРС с учетом форм и размеров эритроцитов в патологии и во время проведения ЛТ*

В этой же главе представлены математические модели ряда биофизических характеристик эритроцитов (поверхностный заряд, форма), необходимые для анализа результатов и прогнозирования формирования НРС на поверхности эритроцитов в норме и при патологии. В разработанной физико-математической модели решена задача определения зарядов наноразмерной биологической частицы, которая взаимодействует с поверхностью клетки за счет поверхностного заряда молекул плазматической мембраны эритроцита. Предположено, что вблизи поверхности эритроцита значение электрического поля поверхностного заряда измененного эритроцита, аппроксимированного эллипсоидом с параметрами  $a_{\text{пат}}, b_{\text{пат}}, c_{\text{пат}}$  должно быть примерно таким же как и значение электрического поля вблизи поверхности нормального эритроцита, аппроксимированного эллипсоидом вращения с нормальными линейными размерами  $a_{\text{норм}}, b_{\text{норм}}, c_{\text{норм}}$ , с использованием для численных расчетов известных линейного размера эритроцита, а также значения поверхностного заряда эритроцита в норме.

Разработанная модель состоит из следующих частей:

1) Учитывая величину поверхностного заряда эритроцитов в норме, мы можем определить напряженность электрического поля вблизи поверхности эритроцита (поверхностный потенциал). Известно, что для заряженного проводящего тела любой конфигурации вблизи его поверхности поверхностная плотность заряда равна:  $\sigma = D$ , где  $D$  — электрическое смещение вблизи поверхности заряженного тела. В нашей модели допускается, что данную формулу можем использовать для определения электрического смещения  $\vec{D}_{\text{эр}}$  в пространстве вблизи поверхности эритроцита. Тогда для нахождения напряженности электрического поля  $\vec{E}_{\text{эр}}$  в приповерхностной области заряженного эритроцита можно использовать следующее выражение:  $\vec{D}_{\text{эр}} = \varepsilon \varepsilon_0 \vec{E}_{\text{эр}}$ , где  $\varepsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \frac{\text{Ф}}{\text{м}}$  — фундаментальная электрическая постоянная,  $\varepsilon$  — диэлектрическая проницаемость крови.

Итак, при определении заряда эллипсоидального эритроцита в норме используется метод определения поверхностного заряда заряженного проводящего эллипсоида:  $q_{\text{эр}} = 4\pi abc \varepsilon \varepsilon_0 E_{\text{эр}} \left( \frac{1}{a^2} + \frac{1}{b^2} + \frac{1}{c^2} \right)^{\frac{1}{2}}$ , где  $a, b, c$  — полудлины главных диаметров эллипсоида

вращения. Исходя из этой формулы была рассчитана напряженность приповерхностного электростатического поля, создаваемого поверхностным зарядом эритроцита в норме, аппроксимированного эллипсоидом с параметрами  $a_{\text{норм}}, b_{\text{норм}}, c_{\text{норм}}$ , используя следующую формулу:  $E_{\text{эр норм}} = \frac{q_{\text{эр норм}}}{4\pi abc\epsilon\epsilon_0 \left(\frac{1}{a_{\text{норм}}^2} + \frac{1}{b_{\text{норм}}^2} + \frac{1}{c_{\text{норм}}^2}\right)^{\frac{1}{2}}}$ , где  $q_{\text{эр норм}}$  – численное значение поверхностного заряда эритроцита в норме.

2) Для определения поверхностного заряда патологического эритроцита в патологии, например, овалоцита, использовали другие параметры для значений полуосей главных диаметров эллипсоида —  $a_{\text{пат}}, b_{\text{пат}}, c_{\text{пат}}$ , т.е., исходя из предположения, что изменение формы и размеров эритроцита должно нивелировать дополнительные изменения заряда и поддержать на прежнем уровне напряженность электрического поля по следующей формуле:  $q_{\text{эр пат}} = 4\pi a_{\text{пат}} b_{\text{пат}} c_{\text{пат}} \epsilon\epsilon_0 E_{\text{эр норм}} \left(\frac{1}{a_{\text{пат}}^2} + \frac{1}{b_{\text{пат}}^2} + \frac{1}{c_{\text{пат}}^2}\right)^{\frac{1}{2}}$ ;

3) Предполагая, что на поверхности эритроцита за счет электростатических взаимодействий сорбируются положительно заряженные НРС (вирусы), поверхностный заряд эритроцитов измененной формы можно представить, как алгебраическую сумму поверхностного заряда эритроцита в норме и суммарный заряд НРС на дисморфном эритроците:  $q_{\text{эр пат}} = q_{\text{эр норм}} + N \cdot q_{\text{нано}}$ , где  $N$  — это количество НРС на поверхности эритроцитов. Так как заряд эритроцита отрицателен, а заряд вируса положителен, поверхностный заряд дисморфного эритроцита уменьшен по сравнению с зарядом эритроцита в норме. Заряд НРС на поверхности эритроцита можно рассчитать по формуле:  $q_{\text{нано}} = \frac{q_{\text{эр норм}} - q_{\text{эр пат}}}{N}$ .

В данной работе, для проведения расчетов нахождения зарядов и напряженности электрического поля вблизи поверхности эритроцитов используются известное численное значение поверхностного заряда нормального эритроцита, которое берется равным  $q_{\text{эр норм}} = 5,93 \cdot 10^{-14}$  Кл, значения для постоянных эллипсоида в норме – эллипсоида вращения (сфероида):  $a_{\text{норм}} = 0,20 \cdot 10^{-6}$  м;  $b_{\text{норм}} = c_{\text{норм}} = 3,75 \cdot 10^{-6}$  м, а также для приближения к реальным результатам параметры эллипсоида при патологии:  $a_{\text{пат}} = 5,06 \cdot 10^{-6}$  м;  $b_{\text{пат}} = 2,32 \cdot 10^{-6}$  м,  $c_{\text{пат}} = 0,20 \cdot 10^{-6}$  м, которые были определены с помощью программы JMicroVision 1.2.7 из снимков, полученных методом СЭМ. Установлено, что приблизительное количество НРС на поверхности эритроцита  $N$  на основе СЭМ снимка составляет примерно 1540 (рис. 7).

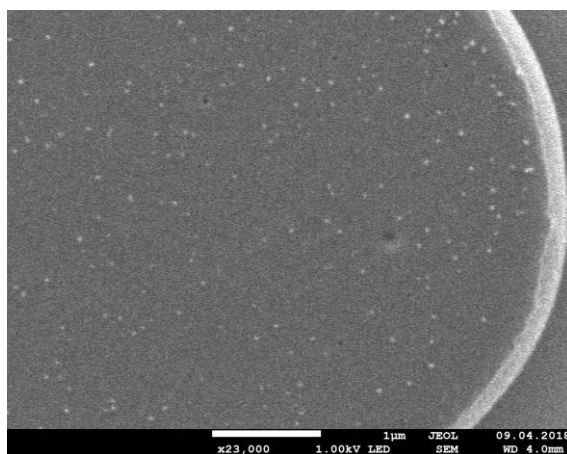


Рисунок 7. СЭМ-изображение поверхности эритроцита с НРС (рак шейки матки)

В результате численных расчетов поверхностный заряд дисморфного эритроцита оказался равным  $q_{\text{эр пат}} = 4,95 \cdot 10^{-14}$  Кл, а заряд предполагаемых вирусов оказался примерно равным  $q_{\text{нано}} = 0,63 \cdot 10^{-17}$  Кл, т.е. приблизительный заряд одного предполагаемого вируса составил  $40 e$ , где  $e$  – элементарный заряд.

В следующей серии численных экспериментов мы использовали разработанную модель для исследования механизма движения эритроцита в жидкости при воздействии внешнего электрического поля с учетом сопротивления жидкости для моделирования электрофоретической подвижности эритроцитов. Эта модель позволит контролировать содержание и свойства НРС в ходе изменения гемодинамики крови в сосудах при патологии и ЛТ. В первом приближении предположено, что движение эритроцита установившееся во времени и происходит в тонком слое буферной жидкости, находящемся на гладкой и плоской поверхности между двумя плоскими электродами. Т.е. жидкость представляется как бесконечная плоская структура, находящаяся под воздействием внешнего электрического поля  $\vec{E}_{\text{внешн}}$ .

На первом этапе, в модели динамики движения, эритроциты аппроксимировались как точечные заряды, численные значения которых можно определить с помощью выше указанных моделей. Скорость эритроцитов определяется в зависимости от воздействия на них внешнего и внутреннего электрических полей – с учетом пространственного распределения заряда эритроцитов, сопротивления жидкости.

С учетом предложенных допущений расчет динамики эритроцитов решается с помощью математической модели, включающей, например:

1) уравнения движения эритроцитов с учетом вязкости и пространственного заряда эритроцитов:  $m_{\text{эр}} \dot{\vec{v}} = q_{\text{эр}} \frac{\vec{E}}{\epsilon} - SC \frac{\rho v^2 \vec{v}}{2}$ , где  $m_{\text{эр}}$  — масса эритроцита,  $\rho$  — плотность буферной жидкости,  $C$  — коэффициент сопротивления раствора,  $S$  — наибольшее



поперечное сечение тела;  $q_{эр}$  — поверхностный заряд эритроцита;  $\vec{E} = \vec{E}_{внешн} + \vec{E}_{внутр}$ ,  $\vec{E}_{внешн}$  — внешнее электрическое поле;  $\vec{E}_{внутр}$  — внутреннее электрическое поле пространственных зарядов эритроцитов в крови,  $\vec{v}$  — скорость эритроцита;

2) уравнения для электрического смещения электрического поля пространственного заряда эритроцитов:  $div \vec{D}_{внутр} = \rho_{зар}$ ;  $rot \vec{E}_{внутр} = 0$ , где  $\rho_{зар}$  — плотность пространственных зарядов эритроцитов в жидкости, которую можно определить по следующей формуле:  $\rho_{зар} = \frac{q_{эр} N}{V}$ , где  $N$  — количество эритроцитов в объеме жидкости

$$V, \vec{D}_{внутр} = \epsilon \epsilon_0 \vec{E}_{внутр};$$

$$3) \text{ уравнение непрерывности: } \nabla \rho_{зар} \vec{v} + \rho_{зар} div \vec{v} = 0.$$

Так как в данном случае рассматривается бесконечная плоская система, то все искомые величины в данном случае зависят только от координаты  $y$ , поэтому решение ищется в следующем виде:  $v_x = v_x(y)$ ,  $v_y = v_y(y)$ ,  $\rho_{зар} = \rho_{зар}(y)$ ,  $\vec{E} = E_{внутр}(y) \vec{e}_x + E_{внутр}(y) \vec{e}_y$ .

В результате была получена система из четырех обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка:

$$\begin{aligned} \dot{v}_x &= \frac{q_{эр}}{m_{эр}} \frac{E_{внутр} x}{\epsilon} - C \frac{\rho v_x^2}{2} S \\ \dot{v}_y &= \frac{q_{эр}}{m_{эр}} \frac{E_{внешн} + E_{внутр} y}{\epsilon} - C \frac{\rho v_y^2}{2} S, \\ \dot{\rho}_{зар} &= \frac{\rho_{зар}}{v_y} \dot{v}_y, \\ \dot{E}_{внутр} y &= \frac{\rho_{зар}}{\epsilon_0 \epsilon} \dot{y}. \end{aligned} \quad (*)$$

Решение системы дифференциальных уравнений (\*) производилось с помощью в Mathcad 15 с использованием численного метода Рунге-Кутты 4-го порядка. На рисунке 8, например, представлены результаты реализации математической модели динамики эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля с учетом сопротивления среды: сравнение скоростей движения эритроцитов в норме и патологии. Установлено, что скорости движения измененных эритроцитов значительно ниже, чем скорость движения нормальных эритроцитов при различных условиях численного эксперимента, что подтверждается в некоторых экспериментальных исследованиях.

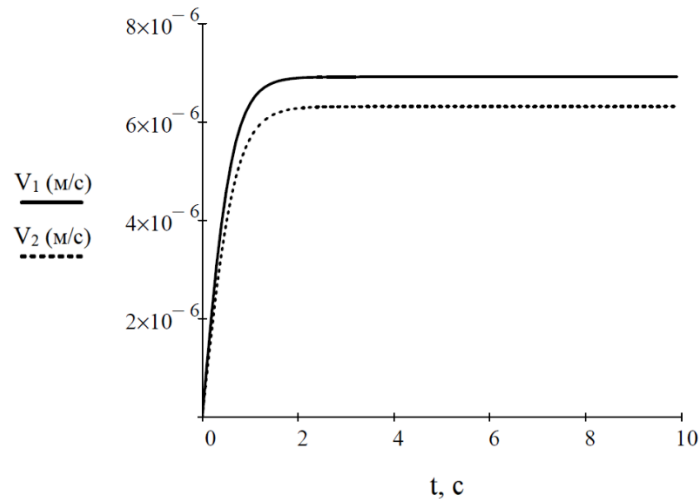


Рисунок 8. Графики зависимости скоростей движения эритроцитов от времени при различных значениях поверхностных зарядов и других равных условиях численного эксперимента: сплошная линия – при  $q = 6 \cdot 10^{-14}$  Кл; штрихованная линия – при  $q = 5 \cdot 10^{-14}$  Кл.

Таким образом, благодаря представленным в данной работе физико-математическим моделям, можно оценить поверхностный заряд мембраны эритроцитов в норме и в патологии с учетом их формы и размеров, а также оценить электрические заряды предполагаемых вирусов на поверхности эритроцитов и исследовать динамику патологических и нормальных эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля, а также зависимости скорости движения эритроцитов от параметров внутреннего электрического поля, поверхностного заряда эритроцита и свойств среды, что позволит получить дополнительную информацию о свойствах эритроцитов в норме и патологии. Очевидно, что результаты данного исследования могут быть использованы для проведения с помощью СЭМ диагностики заболеваний и для анализа результатов экспериментальных исследований электрофоретической подвижности эритроцитов под воздействием различных внешних физических факторов.

**В заключении** дается анализ основных наиболее важных результатов, полученные в диссертации, из которых были сформулированы следующие **выводы**:

1. Разработана технология визуализации НРС на поверхности эритроцитов крови с помощью модифицированной методики на базе сканирующего электронного микроскопа JSM 7800 F JEOL с термополевым катодом Шоттки и с супергибридной линзой в режиме детектирования вторичных электронов для исследований эритроцитов образцов крови в виде сухих мазков, в которой необходимо использовать ускоряющее напряжение 1-2 кВ без напыления проводящего слоя на образец, с выбором рабочего расстояния  $WD = 3.9 \pm$

0.2 мм с учетом физических особенностей воздействия электронного излучения на биологический образец.

2. Получено максимальное разрешение для данной модификации сканирующего электронного микроскопа JSM 7800 F JEOL с термополювым катодом Шоттки и с супергибридной линзой в режиме детектирования вторичных электронов при использовании подложек с высокой электропроводностью, синтезированных на основе восстановленного оксида графена с наночастицами серебра без напыления проводящего слоя на образец и с учетом физических особенностей воздействия электронного излучения на биологический образец (при ускоряющем низкокиловольтном напряжении от 1 – 3 кВ). Возможно, производство таких подложек способствовало дальнейшему развитию СЭМ — расширению области применения СЭМ в биомедицине и медицине.

3. Методами СЭМ и АСМ показано, что при патологии в сухих мазках крови обнаруживаются существенные изменения в морфологии эритроцитов: появляются в значительном количестве определённые виды патологических эритроцитов с измененными линейными размерами в сторону их увеличения с наличием на их поверхности НРС с размерами от 30 до 300 нм, которые соответствуют размерам вирусов и внеклеточных везикул — экзосом.

4. Созданная база данных СЭМ изображений эритроцитов в патологии и их основных параметров (определённые методами математической статистики с применением программы Microsoft Excel) может использоваться в биомедицине для проведения научно-исследовательских работ, связанных как с изучением механизма формирования НРС на поверхности клеток при развитии онкологических заболеваний, с выделением особенностей эритроцитов во время лучевой терапии, так и для разработки методик дифференциальной диагностики ряда патологий, в том числе заболеваний почек у детей с синдромом гематурии, рака шейки матки.

5. Созданная база данных СЭМ изображений эритроцитов в патологии и их основных параметров может использоваться для образовательного процесса в качестве учебного материала для студентов медицинских ВУЗов, факультетов и институтов естественных направлений.

6. Методами СЭМ и АСМ показано, что во время ЛТ происходит изменение форм и размеров эритроцитов в сторону их увеличения, наблюдается увеличение количества дисморфных эритроцитов, увеличивается количество НРС и расширяется диапазон их размеров, что восстанавливается после ЛТ: снижение степени дисморфии эритроцитов и восстановление количества НРС, а также диапазона их размеров.

7. При исследовании мазков крови пациентов с РШМ до и после ЛТ (суммарная доза дистанционной и контактной ЛТ 45-50 Гр) методом КР спектроскопии выявлено, что при патологии наблюдается отличие в соотношениях пиков КР спектров, характеризующих способность гема гемоглобина связывать кислород, относительное количество комплексов дезоксигемоглобина, комплексов гемоглобина с NO, текучесть мембраны клеток, упорядоченность и плотность упаковки аминокислот и полярность окружения аминокислот.

8. Методом КР спектроскопии были получены результаты, свидетельствующие о существенных изменениях крови млекопитающих при различных режимах воздействия ионизирующего излучения (суммарная доза 50 сЗв). Так, выявлены уменьшение гематокрита и концентрации гемоглобина при одновременном увеличении объёмов эритроцитов. Были выявлены молекулярные изменения каротиноидов плазмы крови и гема гемоглобина, а также увеличение доли комплексов оксигемоглобина, причем характер изменений был разным при различных режимах доставки дозы.

9. Методом ПЦР-РВ с использованием праймера MY09/11 было доказано наличие фрагментов циркулирующей ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, в безъядерных фракциях крови — в эритроцитарной массе венозной крови пациентов с раком шейки матки, что свидетельствует: 1) о циркуляции НРС в крови в патологии путем их адсорбции на поверхности эритроцитов; 2) о роли эритроцитов в циркуляции НРС в крови и возможной их доставки в любой орган, в развитии патологии.

10. Иммунофлуоресцентный анализ с использованием первичных моноклональных антител против капсидных белков ВПЧ и вторичных антител меченых флуоресцеином подтверждает гипотезу наличия вирусных частиц на поверхности эритроцитов до и после лучевой терапии у пациентов с раком шейки матки и молочной железы, что свидетельствует: 1) о циркуляции НРС в крови в патологии путем их адсорбции на поверхности эритроцитов; 2) о роли эритроцитов в циркуляции НРС в крови и возможной их доставки в любой орган, в развитии патологии; 3) об отсутствии влияния ЛТ на наличие НРС на поверхности эритроцитов; 4) о появлении во время ЛТ в крови (и на эритроцитах, и в плазме крови) большого количества НРС, размеры которых сопоставимы с размерами экзосом, что в свою очередь может свидетельствовать усиление их секреции во время ЛТ; 5) о необходимости создания новых подходов в разработке новых методик диагностики патологии, оценки эффективности ЛТ.

11. Предложена комплексная методика исследования эритроцитов в присутствии НРС с применением СЭМ, АСМ, светового инвертированного микроскопа, иммунофлуоресцентного анализа, которая может быть использована в разработке методики

диагностики для раннего выявления патологии, определения влияния радиации на эритроциты человека в ходе лучевой терапии, методики определения эффективности лучевой терапии.

12. Разработана методика проведения комплексного исследования воздействия физических факторов ионизирующего излучения на функциональные состояния эритроцитов (содержание гемоглобина в крови и гематокрит; изменения объема эритроцита; содержание конформация гемопорфирина гемоглобина) до и после воздействия ионизирующего излучения на целый организм.

13. Результаты численной реализации математических моделей эмиссионных характеристик полевых и термополевых катодов СЭМ с учетом формы и размеров катодов, влияния вызывающего эмиссию и ускоряющего электрического поля, внешнего магнитного поля, физических свойств катодов, пространственного заряда пучка, результатов экспериментальных исследований СЭМ в численной реализации моделей, физики взаимодействия электронного излучения с веществом с низким атомным номером показывают: 1) учет формы и размеров катодов позволяет получить различной формы и размеров пучки; 2) значение ускоряющего напряжения влияет на скорость электронов, соответственно на их энергию; 3) учет пространственного заряда расширяет пучок, а внешнее магнитное поле фокусирует его.

14. Модели эмиссионных характеристик катодов СЭМ могут быть использованы в качестве базовой математической модели формирования электронного зонда в разработке программного обеспечения СЭМ для автоматизации выбора режима работы при исследовании биообразцов, а также формулировки рекомендаций для создания новых модификаций СЭМ в области медицины и биомедицины.

15. В результате численных расчетов математических моделей физических характеристик эритроцитов при патологии и влиянии радиации на организм человека во время лучевой терапии показано, что численное значение поверхностного заряда эритроцита в патологии уменьшается вследствие изменения его формы, размера и адсорбции на них НРС, которые имеют электрические заряды противоположного знака численно равные нескольким десяткам элементарного заряда, а также показано, что динамика скорости эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля различается в зависимости от патологии и влияния ЛТ.

16. Математические модели физических характеристик эритроцитов при патологии и влиянии радиации на организм человека во время ЛТ, определяющие поверхностные заряды эритроцитов и прикрепленных к ним НРС, с учетом форм, размеров эритроцитов, количества НРС и динамики эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля

могут быть применены для интерпретации результатов экспериментов электрофоретической подвижности эритроцитов в комплексных исследованиях эритроцитов в патологии и под воздействием радиации.

### **Публикации автора с соавторами по теме диссертации**

**Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и входящих в ядро РИНЦ:**

1. **Мамаева С.Н.**, Егоров Н.В., Яковлев Б.В. Определение размера и формы пучка полевого электронного эллипсоидального диода //Журнал Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005, № 1. С.43-47. (Импакт-фактор (РИНЦ) 0,648). (Egorov, N.V., **Mamaeva, S.N.**, Yakovlev, B.V. Determination of size and shape of beam for field emission diode // Poverkhnost Rentgenovskie Sinkhronnye i Nejtronnye Issledovaniya. 2005. Issue 1. P. 43-47.) (Scopus, SJR 0,11; 0,3 п.л./85%).
2. Maksimov G.V., **Mamaeva S.N.**, Antonov S.R., Munkhalova Ya.A., Kononova I.V., Sheikin I.Yu. Measuring Erythrocyte Morphology by Electron Microscopy to Diagnose Hematuria // Measurement Techniques. 2016. V. 59 (3). P. 327-330. (Scopus, SJR 0,215; Q4; 0,5 п.л./70%).
3. **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В., Мунхалова Я.А., Антонов С.Р., Дьяконов А.А., Винокуров П.В. Исследование эритроцитов крови с заболеваниями почек с синдромом гематурии с использованием растровой электронной и атомно-силовой микроскопии // Медицинская физика. 2017. Т. 73, № 1, С. 58-62. (Импакт-фактор 0,244, RSCI; 0,4 п.л./70%).
4. **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В., Антонов С.Р., Мунхалова Я.А., Павлов А.Н. Моделирование динамики движения эритроцитов крови под воздействием внешнего электрического поля // Медицинская физика. 2017. Т. 75 № 3, С. 69-76. (Импакт-фактор 0,244, RSCI; 0,5 п.л./70%).
5. **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В., Гольдерова А.С., Мунхалова Я.А., Павлов А.Н., Федоров А.Л. Инфракрасная спектроскопия крови детей с синдромом макрогематурии // Якутский медицинский журнал. 2018. Т. 61, №1. С. 33-35. (Импакт-фактор (РИНЦ) 0,215) (**Mamaeva S.N.**, Maksimov G.V., Golderova A.S., Munkhalova Ya.A., Pavlov A.N., Fedorov A.L. Infrared spectroscopy of children with macrohematuria syndrome //Yakut Medical Journal. – 2018. – №. 1. – С. 33-35.). (WoS JIF 0.1, 0,3 п.л./70%).
6. **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В., Мунхалова Я.А., Кононова И.В., Захарова Ф.А., Николаев И.Н., Павлов А.Н., Федоров А. Л. Исследование крови детей с синдромом гематурии методом ИК-спектроскопии // Медицинская физика. 2018. Т. 79, № 3, С. 31-35. (Импакт-фактор 0,244, RSCI; 0,3 п.л./70%).

7. Неустроев Е.П., Куркина И.И., **Мамаева С.Н.**, Ноговицына М.В. «Синтез, характеристика и применение нанокompозитов на основе серебряных наночастиц и оксида графена» // Журнал структурной химии, 2018. Т. 59, № 4, С. 883-888. (Импакт-фактор РИНЦ 1,004) DOI: 10.26902/JSC20180413. (Neustroev E.P., Kurkina I.I., **Mamaeva S.N.**, Nogovitsyna M.V. Synthesis, characterization and applications of nanocomposites based on silver nanocomposites and nanoparticles and graphene oxide // Journal of Structural Chemistry. 2018. V. 59, N 4, P. 847-852, DOI: 10.1134/S0022476618040145.) (Scopus, SJR 0,19; Q4; 0,5 п.л./35%).
8. Кононова И.В., Захарова Ф.А., Кириллина М.П., Никифоров П.В., **Мамаева С.Н.**, Антонов С.Р., Павлов А.Н., Николаева Н.А. «Диагностическое значение определения вируса папилломы человека в крови» // Якутский медицинский журнал. 2018. Т. 64, № 4. С. 100-101. DOI 10.25789/YMJ.2018.64. (Импакт-фактор (РИНЦ) 0,215). (Kononova I.V., Zakharova F.A., Kirillina M.P., Nikiforov P.V., **Mamaeva S.N.**, Antonov S.R., Pavlov A.N., Nikolaeva N.A. Diagnostic significance of the human papilloma virus detection in blood // Yakut Medical Journal. – 2018. – №. 4. – С. 100-101.). (WoS, JIF 0,1; 0,3 п.л./40%).
9. Алексеев Р.З., Гольдерова А.С., **Мамаева С.Н.**, Николаева Н.А., Бузинаева М.Т. Оценка изменения эритроцитов методом растровой электронной микроскопии у лиц, умерших от переохлаждения // Якутский медицинский журнал. 2018. Т. 64, № 4. С. 18-21. DOI 10.25789/YMJ.2018.64. (Импакт-фактор (РИНЦ) 0,215). (Alekseev R.Z., Golderova A.S., Mamaeva S.N., Nikolaeva N.A., Buzinaeva M.T. Assessment of change of erythrocytes by method of raster electronic microscopy at the persons who died of fatal hypothermia // Yakut Medical Journal. – 2018. – №. 4. – С. 18-21.). (WoS, JIF 0,1, 0,3 п.л./35%).
10. Максимов Г.В., Слатинская О.В., Тхор Е.С., Анисимов Н.А., **Мамаева С.Н.**, Шутова В.В. Роль рецепторов эритроцита в регуляции конформации и распределения гемоглобина // Журнал Биофизика. 2019. Т. 64, № 1. С. 70–76. (Импакт-фактор РИНЦ 1,236). (Maksimov G.V., Slatinskaya O.V., Tkhor E.S., Anisimov N.A., **Mamaeva S.N.**, Shutova V.V. The Role of Erythrocyte Receptors in Regulation of the Conformation and Distribution of Hemoglobin // Biophysics. 2019. V. 64, N 1. P. 57–61. (Scopus, SJR 0,22, 0,3 п.л./15%).
11. **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В., Антонов С.Р., Платонова В.А., Гольдерова А.С., Кононова И.В., Мунхалова Я.А., Николаева Н.А., Лебедева Т.М. Изучение действия низких температур на морфологию эритроцитов крови детей с гематурией методами оптической и электронной микроскопии // Медицинская физика. 2019. Т. 83, № 3, С. 75-82. (Импакт-фактор 0,244, RSCI; 0,5 п.л./70%).
12. **Mamaeva S.N.**, Kononova I.V., Ruzhansky M, Nikiforov P.V., Nikolaeva N.A., Pavlov A.N., Fedorova N.V. Huang J.U., Semenova M.N., Barashkova D.V., Frolova L.S., Maksimov G.V. Using Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy to Study the Formation of

Nanoparticles on Red Blood Cell Surface in Cervical Cancer Patients // International Journal of Biomedicine. 2020. V. 10(1). P. 70-75. : [http://dx.doi.org/10.21103/Article10\(1\)\\_OA12](http://dx.doi.org/10.21103/Article10(1)_OA12). (Scopus, SJR 0.14, 0,5 п.л./60%).

13. Кононова И.В., Кириллина М.П., Софронова С.И., Никифоров П.В., Алексеев В.А., Илларионова Н.А., **Мамаева С.Н.**, Аржакова Л.И., Захарова Ф.А. Сопряженность смертности от рака шейки матки с численностью и размещением населения в республиках РФ, расположенных в Сибири, в период с 2007 по 2018 г. // Якутский медицинский журнал. 2020. Т. 69, № 1, С.46-49. DOI 10.25789/YMJ.2020.69.11. (Импакт-фактор (РИНЦ) 0,215). (Kononova I.V., Kirillina M.P., Sofronova S.I., Nikiforov P.V., Alekseev V.A., Illarionova N.A., **Mamaeva S.N.**, Arzhakova L.I., Zakharova F.A. Relations of cervical cancer mortality with the population's number and distribution in Republics, located in Siberia (2007-2018) // Yakut Medical Journal. – 2020. – №. 1. – С. 46-49.). (WoS, JIF 0.1, 0,3 п.л./40%).

14. **Mamaeva S.N.**, Kononova I.V., Alekseev V.A., Nikolaeva N.A., Pavlov A.N., Semenova M.N., Maksimov G.V. Determination of blood parameters obtained under SEM as a prototype model for evaluating the effectiveness of radiation therapy for cervical cancer // International Journal of Biomedicine, 2021, V. 11 (1) P. 32-38: [http://ijbm.org/articles/i41/ijbm\\_11\(1\)\\_oa6.pdf](http://ijbm.org/articles/i41/ijbm_11(1)_oa6.pdf). [http://dx.doi.org/10.21103/Article11\(1\)\\_OA6](http://dx.doi.org/10.21103/Article11(1)_OA6). (Scopus, SJR 0.14, 0,5 п.л./60%).

15. Кононова И.В., Кириллина М.П., Софронова С.И., Илларионова Н.А., **Мамаева С.Н.**, Аржакова Л.И., Захарова Ф.А. Различия между республиками, расположенными в Сибири, и Россией в целом в заболеваемости раком шейки матки и смертности от него в период с 2007 по 2019 г. // Якутский медицинский журнал. 2021. Т. 73, № 1, С. 50-54. DOI 10.25789/YMJ.2021.73.14. (Импакт-фактор (РИНЦ) 0,215). (Kononova I.V., Kirillina M.P., Sofronova S.I., Nikiforov P.V., Alekseev V.A., Illarionova N.A., **Mamaeva S.N.**, Arzhakova L.I., Zakharova F.A. Differences of cervical cancer and mortality indices in the republics located in Siberia and all over Russia in the period from 2007 to 2019. // Yakut Medical Journal. – 2021. – №. 1. – С. 50-54.). (WoS, JIF 0.1, 0,3 п.л./15%).

16. Kononova I.V., **Mamaeva S.N.**, Alekseev V.A., Nikolaeva N.A., Afanasyeva L.N., Nikiforov P.V., Vasilyeva N.A., Vasiliev I.V., Maximov G.V. Simultaneous Detection of the HPV L1 Gene and the Human  $\beta$ -Globin Gene in the Blood Components of Cervical Cancer Patients Living in Yakutia // International Journal of Biomedicine. 2022. V.12 (1). P. 109-114. DOI: 10.21103/Article12(1)\_OA10. (Scopus SJR 0.14, 0,5 п.л./45%).

17. **Мамаева С.Н.**, Иванова С.М., Шутова В.В., Максимов Г.В. Исследование изменений состояния эритроцитов и плазмы крови обезьян при воздействии ионизирующего излучения // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Естественные науки, 2022, № 5 (104),



С. 86-104. DOI: <https://doi.org/10.18698/1812-3368-2022-5-86-104>. (Scopus, SJR 0,228, Q3, 0,6 п.л./35%).

18. **Мамаева С.Н.**, Алексеев В.А., Кононова И.В., Николаева Н.А., Крылова Т.А., Павлов А.Н., Габышева А.А., Максимов Г.В. Исследование поверхности эритроцитов пациентов с раком шейки матки методом иммунофлуоресцентного анализа // Медицинская физика. 2022. №4 (96). С. 64-72. (RSCI, Импакт-фактор 0,244, 0,7 п.л./70%).

19. **Mamaeva S.N.**, Alekseev V.A., Nikolaeva N.A., Krylova T.A., Gabysheva A.A., Pavlov A.N., Kononova I.V., Maksimov G.V. Immunofluorescence Analysis of Erythrocyte Membranes of Cervical Cancer Patients // International Journal of Biomedicine. 2023. V. 13(1). P. 69-72. doi:10.21103/Article13(1)\_OA8. (Scopus, SJR 0.14, 0,3 п.л./70%).

20. Кононова И.В., **Мамаева С.Н.** Сравнение количества наноразмерных частиц в плазме крови и на поверхности эритроцитов с использованием сканирующей электронной микроскопии у пациентки с раком шейки матки // Якутский медицинский журнал. 2023. Т. 84, № 4, С. 134-136. DOI 10.25789/YMJ.2023.84.31. (Импакт-фактор (РИНЦ) 0,215). (Kononova I.V., **Mamaeva S.N.** Comparison of the number of nano-sized particles in blood plasma and on the erythrocytes surface using scanning electron microscopy in a cervical cancer patient // Yakut Medical Journal. – 2023. – №. 4. – С. 134-136.). (WoS, JIF 0,1, 0,3 п.л./50%).

21. **Мамаева С.Н.**, Павлов А.Н., Николаева Н.А., Максимов Г.В. Математическое моделирование основных эмиссионных характеристик полевого и термополевого электронных катодов сканирующих микроскопов при исследовании биообразцов // Журнал технической физики. 2023. Т. 93, №. 12, С. 1716-1719. DOI: 10.61011/JTF.2023.12.56802.f210-23. (RSCI, Импакт-фактор 1.1) (**Mamaeva S.N.**, Pavlov A.N., Nikolaeva N.A., Maksimov G.V. Mathematical Modeling of the Main Characteristics of Cold Field and Thermal Field Electron Cathodes of Scanning Electron Microscopes in the Study of Biological Samples // Technical Physics. 2024. V. 69. – №. 7. P. 2045-2048. DOI: 10.1134/S1063784224070284) (Scopus, SJR 0,3, 0,4 п.л./85%).

#### **Прочие публикации**

22. Кононова И.В., Мунхалова Я.А., Антонов С.Р., **Мамаева С.Н.** «Изучение поверхности эритроцитов крови пациента с болезнью Берже методом электронной микроскопии». Сборник научных трудов V Конгресса с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере». Якутск, Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, 24-29 ноября 2014 г./ Под ред. академика АН РС(Я), профессора П.Г. Петровой, профессора Н.В. Савиной. – Электрон.текст.дан. (1 файл 6,1 Мб). – Киров: МЦНИП, 2014. – 827 с. С. 272-277.

23. **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В., Антонов С.Р., Мунхалова Я.А., Кононова И.В., Шейкин И.Ю. «Нанодиагностика гематурии у детей». Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке». Саранск, МГУ им.Н.П. Огарева, 23-25 сентября 2015 г. – Саранск: Типография ООО «Референт», 2015. – С. 214-217.
24. **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В., Мунхалова Я.А., Кононова И.В., Дьяконов А.А., Корякина В.Н., Шутова В.В. Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии //Вестник Мордовского университета. 2016. Т.26, №3. С. 381-390.
25. Максимов Г.В., **Мамаева С.Н.**, Антонов С.Р., Мунхалова Я.А., Кононова И.В., Шейкин И.Ю. Измерение морфологии эритроцитов методом электронной микроскопии для диагностики гематурии //Метрология. Ежеквартальное приложение к Ж. Измерительная техника. 2016. №1. С.47-52.
26. **Mamaeva S.N.**, Maksimov G.V., Antonov S.R. “The study of the dynamics of erythrocytes under the influence of an external electric field”// Citation: AIP Conference Proceedings 1907, 030035 (2017).
27. **Mamaeva S.N.**, Maksimov G.V., Neustroev E.P., Munkhalova Y.A., Antonov S.R., Pavlov A.N., (2018), “Use of Nanocomposite Material Based on Graphene Oxide and Silver Nanoparticles in Research of Blood Erythrocytes in Various Diseases” in The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine, KnE Energy & Physics, pages 212–222.
28. Кононова И.В., **Мамаева С.Н.** О вероятном участии циркулирующих эритроцитов в инфицировании папилломавирусом человека и возможностях растровой электронной микроскопии для исследования в этом направлении Сборник: Современные проблемы науки и образования, 2018. Том II. М.: Издательский дом Академии Естествознания.
29. **Mamaeva S. N.**, Maksimov G.V., Antonov S.R., Neustroev E.P., Kononova I.V., Zakharova F.A., Vasiliev I.V., Pavlov A.N. Studying of erythrocytes of blood during radiation therapy in cases of cancer of neck of an uterus with application of methods of medical physics and nanobiotechnologies // AIP Conference Proceedings 2018. V. 2041, P. 050016.
30. Кононова И.В., Алексеев В.А., Васильева Н.А., Кириллина М.П., **Мамаева С.Н.**, Никифоров П.В., Афанасьева Л.Н. Разработка способа подготовки образцов для обнаружения ДНК вируса папилломы человека в клетках крови // Научно-практический журнал «Лабораторная служба». 2019. Т. 8, №1, С. 31.

31. Alekseev R.V., Golderova A.S., **Mamaeva S.N.** Diagnosis of changes in red blood cells after death from general hypothermia // Materials of the international conference «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration». Beijing, China. 2019. July 31, P.147-153.
32. **Мамаева С.Н.**, Кононова И.В., Мунхалова Я.А., Максимов Г.В., Захарова Ф.А., Антонов С.Р., Николаева Н.А., Федорова Н.Ф., Платонова К.Н., Саввинова Л.Н. Исследование эритроцитов пациентки с хроническим мезангиопролиферативным гломерулонефритом методом сканирующей электронной микроскопии // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 3; DOI:10.17513/spno.29910.
33. **Мамаева С.Н.**, Винокуров Р.Р., Мунхалова Я.А., Дьяконова Д.П., Платонова В.А., Захарова Ф.А. Растровый электронный микроскоп: возможности исследования заболеваний почек // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». 2020, Т. 22, № 12. С. 176-182.
34. **Mamaeva S.N.**, Maksimov G.V., Egorov N.V., Antonov S.R., Neustroev E.P., Nikolaeva N.A., Pavlov A.N. Scanning Electron Microscope: a Model for Determining of Main Emission Characteristics for the Schottky Cathode in the Mode of Working with Biological Samples // AIP Conference Proceedings. 2021, V. 2328, P. 040002.
35. Alekseev R.Z., Golderova A.S., **Mamaeva S.N.**, Platonova V.A., Markova O.G. Synovial Fluid in joint Patholgy by the Method of Scanning Electron Microscopy // Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 2021, V. 25(2), P. 1804 - 1812.
36. **Mamaeva S.N.**, Semenov O.A., Kononova I.V., Ermolaev A.R., Gerasimova V.V., Maksimov G.V. «Study of the Morphology of Erythrocytes in Patients with Cervical Cancer: A Technique for Machine Recognition of the Shapes and Sizes of Erythrocytes SEM Images». Volume Title: Proceedings of the Conference on Health and Wellbeing in Modern Society (CHW 2021) Series: Advances in Health Sciences Research. Copyright © 2022 The Authors. Published by Atlantis Press International B.V. Publication Date: 17 January 2022.
37. Кононова И.В., **Мамаева С.Н.**, Алексеев В.А., Васильев И.В., Николаева Н.А., Иноземцева Л.О. Обнаружение циркулирующей ДНК в безъядерных фракциях крови у пациентки с раком шейки матки // Современные проблемы науки и образования. 2022. № 2. DOI 10.17513/spno.31543.
38. Павлов А.Н., **Мамаева С.Н.**, Максимов Г.В. Исследование биологических образцов детей с синдромом гематурии методом ИК спектроскопии // Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М. К. Аммосова. 2023, Т. 1, С. 42-51.
39. Гоголева Т.Е., **Мамаева С.Н.**, Платонова В.А., Алексеев Р.З. Исследование эритроцитов в норме и патологии в натуральных и модельных экспериментах в условиях низких и сверхнизких температур методами медицинской физики. Холод и здоровье: Сборник

материалов междисциплинарного мобильного научно-практического семинара (24-29 марта 2021 г.) / Под ред. С.С. Слепцова. – Новосибирск: Наука, 2023. – 92 с.

40. Alekseev R.Z., **Мамаева S.N.**, Platonova V.A., Golderova A.S. Investigation of the morphology of red blood cells in those who died from hypothermia by scanning electron and atomic force microscopy // AIP Conf. Proc. 2023, V. 2803, P. 040007

41. **Мамаева С.Н.**, Егоров Н.В., Яковлев Б.В., Павлов А.Н., Николаева Н.А., Максимов Г.В. Математическое моделирование эмиссионных характеристик полевого электронного катода в растровом электронном микроскопе в условиях исследования биообразцов. // Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М. К. Аммосова. 2024, Т. 21(1), С.70-80.

### Список использованной литературы

1. Liu V. W. S. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients / Liu V. W. S. et al. //Gynecologic oncology. – 2001. – Т. 82. – № 2. – С.269-272.
2. Jeannot E. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma / Jeannot E., Becette V., Campitelli M. et al. //The Journal of Pathology: Clinical Research. – 2016. – Т. 2. – №. 4. – С. 201-209.
3. Capone R.B. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma / Capone R.B., Pai S.I., Koch W.M. et al. //Clinical cancer research. – 2000. – Т. 6. – №. 11. – С. 4171-4175.
4. Widschwendter A. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history / Widschwendter A., Brunhuber T., Wiedemair A. et al //Journal of Clinical Virology. – 2004. – Т. 31. – №. 4. – С. 292-297.
5. Peedicayil A. Can recurrence of cervical cancer be predicted by human papillomavirus DNA in nodes or plasma? / Peedicayil A., Sathish N., Gnanamony M. et al. //Journal of Lower Genital Tract Disease. – 2009. – Т. 13. – №. 2. – С. 102-106.
6. Roden R. B. et al. Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor //Journal of virology. – 1995. – Т. 69. – №. 8. – С. 5147-5151.
7. Vogt A. M. et al. Heparan sulphate identified on human erythrocytes: a Plasmodium falciparum receptor //Biochemical Journal. – 2004. – Т. 381. – №. 3. – С. 593-597. doi: 10.1042/BJ20040762.
8. Cocuzza C. E. Human papillomavirus DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia / Cocuzza C. E. et al. //PloS one. – 2017. – Т. 12. – №. 11. – С. e0188592.

9. Doyle L. M., Wang M. Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis // *Cells*. – 2019. – Т. 8. – №. 7. – С. 727.
10. Zhang W., Ou X., Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis // *International journal of oncology*. – 2019. – Т. 54. – №. 5. – С. 1719-1733
11. Tamkovich S. What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? / S. Tamkovich, A. Grigor'eva, A. Tupikin [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2019. – Vol. 495. – P. 529-537. – DOI 10.1016/j.cca.2019.05.028.
12. Шендеров Б. А. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала / Б. А. Шендеров, А. В. Сеница, М. М. Захарченко, Е. И. Ткаченко // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2020. – № 7(179). – С. 118-130. – DOI 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
13. Fahrman J. F. Plasma-derived extracellular vesicles convey protein signatures that reflect pathophysiology in lung and pancreatic adenocarcinomas / Fahrman J. F., Mao X., Irajizad E., Katayama H., Capello M., Tanaka I., Vykoukal J // *Cancers*. – 2020. – Т. 12. – №. 5. – С. 1147.
14. Ishiwata T. Electron microscopic analysis of different cell types in human pancreatic cancer spheres / Ishiwata T. et al. // *Oncology letters*. – 2018. – Т. 15. – №. 2. – С. 2485-2490.
15. Noble J. M. Direct comparison of optical and electron microscopy methods for structural characterization of extracellular vesicles / Noble J. M. et al. // *Journal of structural biology*. – 2020. – Т. 210. – №. 1. – С. 107474.