

СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.К. АММОСОВА  
ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

*На правах рукописи*



**Мамаева Саргылана Николаевна**

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

1.5.1. Радиобиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Научный консультант:  
Максимов Георгий Владимирович,  
доктор биологических наук, профессор

Якутск – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В БИОЛОГИИ.....	21
1.1. Применение электронных микроскопов в исследованиях в биологии ....	21
1.2. Особенности режима работы для исследования биологических образцов	37
1.2.1 Физические основы метода.....	38
1.2.2 Пробоподготовка биологических образцов .....	55
1.2.3 Низковольтная сканирующая электронная микроскопия .....	61
1.3. Моделирование эмиссионных характеристик катодов в электронно-оптических системах .....	70
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	81
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР НА ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ .....	92
3.1. Режим работы и пробоподготовка в исследованиях биологических образцов .....	93
3.1.1. Характеристики и выбор оптимальных режимов работы сканирующего электронного микроскопа в исследовании биообъектов.....	93
3.1.2. Разработка наноструктурированных подложек для исследования наноразмерных структур на эритроцитах.....	102
3.2. Использование сканирующей электронной микроскопии для исследования морфологии и НРС эритроцитов .....	110
3.2.1. Исследования морфологии и НРС эритроцитов при гематурии методом сканирующей электронной микроскопии и инфракрасной спектроскопии.....	111
3.2.2. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при заболеваниях почек .....	129
3.2.3. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при раке шейки матки.....	132
3.2.4. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при раке молочной железы.....	136
3.2.5. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при отморожении .....	137
3.2.6 Исследование синовиальной жидкости при ревматических заболеваниях методом сканирующей электронной микроскопии .....	149
3.2.7 Формирование базы данных изображений эритроцитов в патологии, полученных методом сканирующей электронной микроскопии, и их основных параметров .....	155
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАДИАЦИИ .....	160

4.1. Исследование влияния ионизирующего излучения на морфологию эритроцитов крови методом сканирующей электронной микроскопии.....	161
4.2. Исследование свойств наноразмерных структур методами инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния .....	177
4.3. Исследование действия ионизирующего излучения на молекулярно-клеточные структуры крови животных .....	186
4.4. Исследование состава наноразмерных структур на поверхности эритроцитов с помощью полимеразной цепной реакции .....	199
4.5. Исследование состава наноразмерных структур на поверхности эритроцитов методом иммунофлуоресцентного анализа .....	207
<b>ГЛАВА 5. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ЭЛЕКТРОННЫХ ПУЧКОВ СКАНИРУЮЩИХ МИКРОСКОПОВ И ФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ, НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР .....</b>	<b>222</b>
5.1. Математическое моделирование электронного пучка сканирующего электронного микроскопа .....	223
5.1.1. Математическое моделирование основных эмиссионных характеристик термополевого электронного катода сканирующего электронного микроскопа .....	225
5.1.2. Математическое моделирование основных эмиссионных характеристик полевого электронного катода сканирующего электронного микроскопа .....	246
5.1.3. Параболоидальный катод сканирующего электронного микроскопа в продольном магнитном поле .....	253
5.2. Математическое моделирование физических свойств эритроцитов в патологии на основе экспериментальных данных при исследовании морфологии эритроцитов методом сканирующей электронной микроскопии.....	259
5.2.1. Модели определения поверхностных зарядов эритроцитов и наноразмерных структур .....	269
5.2.2. Динамика движения эритроцитов крови под воздействием внешнего электрического поля с учетом сопротивления буферной жидкости и пространственного заряда эритроцитов .....	271
5.2.3. Моделирование динамики движения эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля с применением уравнения Навье-Стокса .....	277
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>283</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>286</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>290</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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 секреторируемых 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 элементным 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 мышиных 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, параболаидальный 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 низковольтных 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 наименования.

## **ГЛАВА 1. СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В БИОЛОГИИ**

### **1.1. Применение электронных микроскопов в исследованиях в биологии**

В настоящее время происходит интенсивное развитие технологий в области электронной микроскопии (ЭМ), возрастает роль метода ЭМ в диагностике и терапии патологий, в том числе сканирующей (растровой) электронной микроскопии (СЭМ) в исследованиях причин возникновения патологий и молекулярно-клеточных механизмов их развития. Например, электронные микроскопы (ЭМ) используются для анализа различных типов клеток при раке поджелудочной железы [14]. Также с помощью ЭМ наблюдают внеклеточные везикулы, которые играют важную роль как в росте первичной опухоли, так и в процессе образования метастазов. Везикулы могут быть биомаркерами и новыми терапевтическими мишенями против прогрессирования рака, особенно для прогнозирования и предотвращения будущего метастатического развития [15]. Несмотря на их распространенность в организме и участие во множестве биологических процессов, размер и морфология этих везикул относительно неизвестны. Такие методы, как СЭМ, обеспечивают необходимую разрешающую способность и обычно используются для визуализации клеток [16]. Например, исследования по выявлению рака по везикулам проводят на кафедре медицинской биофизики клетки в Университет Твенте [17].

Изучение поражения костей, вызванные опухолями, на сегодняшний день является актуальной проблемой. В 2016 году немецкими учеными были проведены сравнения результатов терапии костных поражений с помощью аллотрансплантатов (ткани, полученные из тела пациента) и с использованием синтетических или обработанных ксеногенных костных трансплантатов (ткани, полученные от другого человека) [18]. Полученные СЭМ-изображения помогли сделать вывод о равной эффективности двух материалов и подтвердили эффективность синтетических трансплантатов с высокой степенью обработки. В работе польских исследователей по изучению травм скелета была проведена оценка применения титановых каркасов в тканевой инженерии [19]. Установлено, что можно восполнить потерю костной массы, используя специально разработанные титановые каркасы, которые поддерживают сетчатые структуры, созданные с помощью аддитивного производства. Влияние химической полировки на пористость и морфологию каркасов было изучено также с помощью СЭМ и с использованием программного обеспечения PoroMetric, с помощью которого

визуализировали и измеряли влияние химической полировки на поры каркаса. Группа австралийских исследователей изучили влияние рН слюны на ортодонтические дуги из нержавеющей стали. С помощью СЭМ установили, что неровности поверхности дуг могут быть вызваны их коррозией при различных уровнях рН [20].

В исследовании [21] был рассмотрен вклад ЭМ в диагностику биопсии почки. На основании результатов многие эксперты рекомендуют включать ЭМ в диагностику почечных заболеваний, а также рассматривают случаи заболевания, в которых электронная микроскопия необходима как рутинный метод диагностики.

Кембриджским университетом были проведены исследования по применению просвечивающей электронной микроскопии в диагностике онкологических заболеваний [21]. Целью исследования “Компьютерная сканирующая электронная микроскопия” [22] является разработка новых методов для более эффективного и точного изображения и описания атомных и наноразмерных объектов и реализации СЭМ с самым высоким разрешением. Проводятся исследования по моделированию методом Монте-Карло в математическом анализе данных СЭМ [23]. ЭМ также может помочь в идентификации патогенных организмов. В исследовании [24] рассматривали ряд инфекций, для идентификации и классификации которых ЭМ играет решающую роль. Кроме того, ЭМ используется в ситуациях, когда большинство вирусных частиц присутствует в виде пустых вирионов, лишенных нуклеиновой кислоты.

Рассматривалась новая система обнаружения предраковых состояний шейки матки с использованием анализа текстуры изображений, полученных с помощью СЭМ [25]. Чтобы различать нормальные и предраковые клетки на изображениях клеток шейки матки, в качестве индикаторов использовали вирус папилломы человека (ВПЧ). СЭМ в биомедицине традиционно использовалась для характеристики топографии поверхности клеток и тканей. В исследовании 2020 г. [26] демонстрируется полезность СЭМ для диагностики патологии и ультраструктурных исследований клеточной биологии.

Кроме того, развиваются методики усовершенствования технологий визуализации методом СЭМ. Так, моделированием процессов в СЭМ при низкой энергии электронов занимаются на кафедре электроники Йоркского университета [27]. В их исследовании описываются новые методы СЭМ низких энергий, а также обрисовываются проблемы, связанные с попытками количественно оценить получаемые сигналы, учитываются эффекты заряда и спин-поляризованного измерения. Ученые Калифорнийского

университета и Университета Карнеги–Меллон исследуют усовершенствование приема сигналов детектора и электронного луча для получения изображений с помощью СЭМ высокого разрешения [28]. Используя быструю выборку сигналов электронного детектора, были идентифицированы внутренние дефекты пучка электронов и рассмотрены подходы смягчения этих дефектов.

Итак, существует большое количество разнообразных биомедицинских задач, которые возможно решить с помощью СЭМ, но область рассматриваемых проблем может быть расширена. И для того, чтобы представить возможность применения СЭМ в исследовании патологии рассмотрим существующие проблемы в биомедицине и некоторые представления о объектах исследования.

#### *Рост заболеваемости раком шейки матки, проблемы диагностики и терапии*

В данное время существует проблема роста онкологических заболеваний, несмотря на интенсивно развивающиеся методы их диагностики, лечения и профилактики, в том числе рака молочной железы и рака шейки матки. По данным глобальных демографических характеристик, к 2025 году ежегодно будет регистрироваться около 420 миллионов новых случаев рака. В 2020 году во всем мире было зарегистрировано около 8,5 миллионов случаев среди женщин. Так по количеству новых случаев у женщин РМЖ находится на первом месте, по данным Globocan в 2020 году количество новых случаев составило 2 261 419, что составляет 24,5%, а РШМ занимает 4 по распространённости место, с 604 127 новыми случаями (6.5%). Кроме того, наблюдаются ранние и поздние рецидивы онкозаболеваний после их радикального лечения с применением высоких технологий, оборудования и современных дорогостоящих фармпрепаратов, в том числе лучевой терапии, направленной на полное излечение больного от опухоли. В связи с недостаточной разработанностью методов мониторинга за качеством и безопасностью лечения онкологических заболеваний с применением высокотехнологичного медицинского оборудования, планируется создание методик мониторинга реакции на локальное воздействие радиации во время лучевой терапии, в ходе которой рассматривается роль везикул как потенциальных участников онкогенеза. Везикулы также могут быть вовлечены в метастазирование или перенос молекул, которые участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе. Рак шейки матки развивается в результате ряда постепенных изменений, и нормальным клеткам требуются годы или десятилетия, чтобы произошел переход от состояния предракового поражения шейки

(цервикальная интраэпителиальная неоплазия) к состоянию инвазивного злокачественного РШМ, который включает длительную и обратимую стадию предракового поражения [29]. Широко распространено мнение, что раннее выявление и лечение предраковых поражений может предотвратить прогрессирование рака у почти девяноста процентов пациенток с РШМ. В настоящее время наиболее часто используемые методы скрининга для раннего выявления рака шейки матки включают цитологический тест Thinprep и обнаружение вируса папилломы человека (ВПЧ). Известно, что ВПЧ 16 и 18 типа могут вызывать РШМ. Тест на ВПЧ определяет, существует ли вирусная инфекция высокого риска. Thinprep тест определяет, происходят ли аномальные изменения в клетках шейки матки под воздействием патогенных факторов, которые могут привести к РШМ [30]. Хотя РШМ и является предотвращаемым заболеванием, однако, ограниченные социально-экономическим статусом и уровнем образования, большинство женщин плохо осведомлены о причинах, факторах риска, профилактике и лечении РШМ. Заболеваемость РШМ в развитых странах остается ниже, чем в менее развитых странах. Фактически, примерно 95% смертей от РШМ приходится на страны с низким уровнем дохода [31]. В связи с этим, существует необходимость в формировании нового малоинвазивного, доступного метода ранней диагностики РШМ, объяснения причин возникновения явления метастазирования и рецидивов.

### *Морфология и функции эритроцитов в норме и при патологии*

Эритроциты, также известные как красные кровяные клетки, являются клетками, содержащимися в крови. Это круглые, двояковыпуклые клетки без ядра, которые содержат в себе гемоглобин и выполняют роль основного переносчика кислорода в организме. Функции эритроцитов многочисленны: [32, 33, 34] 1) транспортируют кислород — это основная функция эритроцитов — перенос кислорода от легких к тканям организма. Гемоглобин, содержащийся в эритроцитах, связывает кислород в легких и доставляет его к тканям через кровеносную систему; 2) транспортируют углекислый газ: эритроциты собирают углекислый газ, образующийся в тканях, и переносят его обратно к легким для выведения из организма; 3) регулируют pH: эритроциты помогают поддерживать оптимальный pH крови, регулируя концентрацию кислорода и углекислого газа; 4) могут выполнять некоторые иммунные функции, такие как связывание антител и антигенов, а также участие в иммунных реакциях организма; 5) эритроциты могут играть

роль в поддержании гомеостаза организма, участвуя в регуляции объема и вязкости крови; 6) осуществляют питательную функцию – переносят перенос на своей поверхности аминокислот, холестерина, глюкозы, витаминов (В1, В2, В6, С) от органов пищеварения к клеткам организма; 7) выполняют защитную функцию за счет адсорбции на поверхности эритроцитов токсических веществ, ряда вирусов и микробов; разрушения медиаторов типа ацетилхолина холинэстеразой эритроцитов. Кроме того, эритроциты содержат компоненты системы антиоксидантной защиты; 8) участвуют в осуществлении гуморальной регуляции адаптационных процессов в норме, в том числе при беременности, а также при патологии; 9) несут в себе групповые признаки крови и детерминанты Rh; 10) активно участвуют в метаболизме катехоламинов, ацетилхолина, иммунных комплексов и ряда лекарственных средств; 11) являются регуляторами сосудистого тонуса.

Хотя мембрана эритроцита составляет всего 1% от массы эритроцита, она определяет гомеостаз и функции эритроцита. Мембрана эритроцита определяет взаимодействие эритроцита с окружающей средой, активность мембраноассоциированных ферментов, ионный транспорт и газообмен, а также продолжительность жизни эритроцитов в периферической крови. Мембрана эритроцитов - важнейший компонент антиоксидантной системы организма, содержащий группу ферментов гликолиза, пентозофосфатного цикла, системы глутатиона, аденозиновой системы и других метаболических реакций анаэробного энергоанаболического пути [35].

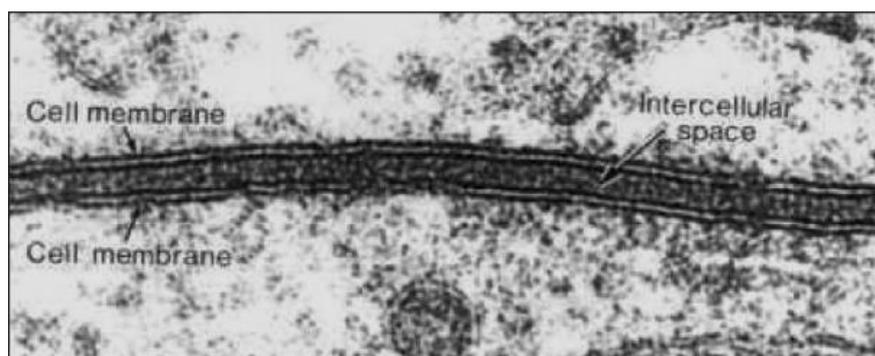


Рисунок 1.1. Мембрана клетки в электронном микроскопе [36].

Структура клеточной мембраны типичной дисковой клетки одинакова по всей поверхности эритроцита. Хотя в разных частях клеточной мембраны могут возникать впадины и выпуклости, изменения внутриклеточного и внеклеточного давления на  $\pm 15\%$  не вызывают сморщивания клетки.

В состав плазматической мембраны эритроцита входят:

1. Липидный бислой. Обеспечивает барьер между окружающей средой и цитоплазмой эритроцита. Составляет 50–60% от массы мембраны эритроцита.

2. Мембранные белки, встроенные в липидный бислой для выполнения различных функций эритроцита.

3. Цитоскелет эритроцита. Определяет форму эритроцита.

Известно, что при различных видах патологии, заболеваниях происходят заметные разнообразные изменения форм эритроцитов, которые определяются как сфероцитоз, овалоцитоз, акантоцитоз, стоматоцитоз, шизоцитоз, аннулоцитоз и т.д. При определённых видах патологии наблюдаются преобладание тех или иных видов форм и размеров эритроцитов.

Например, при РШМ и РМЖ можно наблюдать такие изменения в морфологии эритроцитов, обозначаемые как анизоцитоз и пойкилоцитоз. Одним из наиболее часто встречающихся явлений при патологии является изменение размера (анизоцитоз) и формы (пойкилоцитоз) эритроцитов. Эти изменения могут быть следствием разрушения нормальных клеток, а также влияния опухолевых метаболитов на эритроциты. Например, при РШМ и РМЖ наблюдаются как уменьшенные (микроциты), так и увеличенные (макроциты) эритроциты. Микроцитоз может быть ассоциирован с дефицитом железа, часто встречающимся у онкологических пациентов, тогда как макроцитоз может быть следствием дефицита витамина В12 или фолиевой кислоты. Кроме того, при патологии наблюдается явление фрагментации эритроцитов. У пациентов с диагнозом РШМ и РМЖ также наблюдаются фрагментированные эритроциты, что может указывать на микроангиопатическую гемолитическую анемию, связанную со злокачественными процессами.

Размер эритроцита взрослого человека обычно составляет примерно 6-8 микрометров в диаметре (Рисунок 1.2). Это делает их одними из самых маленьких клеток в организме. Важно отметить, что размер эритроцитов может незначительно варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как возраст, пол и состояние здоровья человека.

Эритроциты образуются в костном мозге в процессе, называемом эритропоэзом. Производство эритроцитов регулируется гормоном эритропоэтином, который вырабатывается почками в ответ на низкий уровень кислорода в организме.

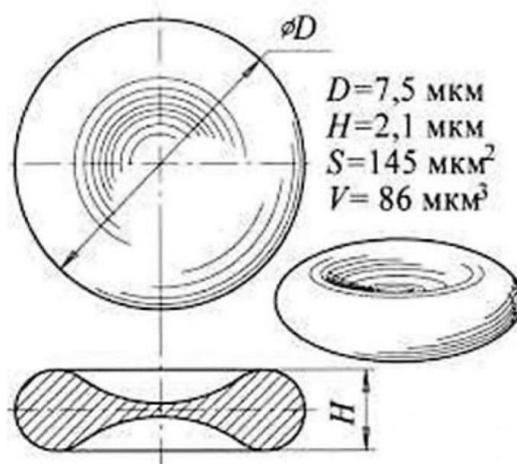


Рисунок 1.2. Размеры эритроцита в норме.

Эритропоэтин стимулирует костный мозг производить больше эритроцитов, тем самым повышая кислородную емкость крови.

Эритроциты имеют ограниченное время жизни – примерно 120 дней. По истечении этого срока они разрушаются, а их компоненты перерабатываются и повторно используются для производства новых эритроцитов.

Плазматическая мембрана эритроцита – важнейший элемент клетки. Она одновременно является механической оболочкой с регулируемыми физическими свойствами и «диспетчерским пунктом», осуществляющим координацию работы клетки в зависимости от физических и химических сигналов, поступающих к ней в организме [37]. Биологические мембраны эукариотических клеток, включая плазматическую мембрану эритроцита, имеют общие структурные особенности: они представляют собой ансамбли липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий. Благодаря этим взаимодействиям поддерживается структурная целостность мембран. Однако сами по себе клеточные мембраны являются подвижными, «текучими» структурами и большинство входящих в их состав молекул способны перемещаться в плоскости мембраны [38].

Форма эритроцитов, их упругость и мембранные особенности позволяют им легко проникать через узкие сосуды и капилляры, обеспечивая эффективный газообмен. Эритроциты являются легко деформируемыми клетками. Деформация эритроцитов — это способность эритроцитов принимать различную конфигурацию под воздействием окружающих факторов. На степень деформации влияют: рН, осмолярность, газовый состав крови, температура, липидный спектр. Деформируемость клетки красной крови оптимальна при рН 7.4. Способность эритроцитов менять форму и проходить через узкие

капилляры повышается с увеличением отношения площади (величины) поверхности клетки к ее объему. Эритроциты с аномальной формой характеризуются повышенной резистентностью к деформации [39].

При снижении деформируемости уменьшается контакт мембраны эритроцита со стенкой капилляров и ухудшается перенос кислорода между альвеолами и эритроцитами в легких и между эритроцитами и тканями на периферии. Более того, деформация эритроцита также зависит как от вязкости мембраны эритроцита, так и от цитоплазматической вязкости. Известно, что при насыщении мембраны эритроцита холестерином при дис- и гиперлипидемиях повышается микровязкость липидного бислоя и жесткость мембраны, и как следствие, уменьшается деформируемость эритроцитов, увеличивается скорость их агрегации и снижается активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [39-41].

В работе [42] изменения метаболизма эритроцитов выявлены у пациенток с РМЖ и гинекологическими заболеваниями и усиливаются при обострении РМЖ, что свидетельствует о том, что периферические эритроциты вовлечены в сложные процессы изменений в организме задолго до возникновения РМЖ. Выявленные изменения в липидном спектре мембраны эритроцитов, очевидно, могут быть использованы в качестве прогностического критерия прогрессирования доброкачественных заболеваний молочной железы. Выраженное нарушение липидного состава мембраны эритроцитов, в свою очередь, приводит к клеточной гипоксии.

В работе [43] изучено состояние вязкости мембран эритроцитов у больных РМЖ (68 в менопаузе и 32 с сохраненным менструальным циклом) в сопоставлении с содержанием рецепторов стероидных гормонов в опухолевой ткани и возрастом пациентки. Результаты показали, что вязкость мембраны эритроцитов увеличивалась по мере снижения гормонозависимости опухоли, что выражалось в снижении коэффициента эксимеризации пирена (КЭП) в белково-липидном слое мембраны, особенно в липидно-липидном слое. Увеличение ЭК пирена в липидно-липидном слое мембраны эритроцитов выше 1,7 ед. отражает снижение микровязкости мембраны эритроцитов и может рассматриваться как дополнительный внеопухолевый критерий гормонозависимости новообразования.

У больных холестеринемией обнаружено увеличение микровязкости плазматической мембраны эритроцита, связанное с изменением конформации порфирина и глобина в мембрансвязанном гемоглобине [44]. Авторы предполагают, что это связано

с действием NO, проникающим снаружи, преимущественно на примембранный гемоглобин. Было также показано, что при патологии сердца (инфаркт миокарда) меняется структура порфиринового макроцикла гемоглобина, увеличивается размер порфиринового «ядра» и уменьшается спиновое состояние атома железа. Способность гемоглобина связывать кислород снижается [45].

Увеличение микровязкости мембраны в поверхностных слоях установлены у женщин с ожирением, независимо от его типа. При метаболическом синдроме отмечается не только увеличение микровязкости мембраны по всему профилю, но и изменение структуры мембраносвязанных белков [46].

Цитоплазматическая упругость или жесткость эритроцита существенно зависит от концентрации гемоглобина. При физиологических концентрациях это влияние невелико, однако при высокой концентрации гемоглобина величина цитоплазматической жесткости значительно возрастает, при этом существенно ухудшается деформируемость эритроцита [39]. Низкая способность эритроцитов к деформации наблюдается у новорожденных, что объясняется более высоким содержанием гемоглобина.

Жесткость цитоплазмы эритроцита зависит и от вида гемоглобина. Так, при серповидно-клеточной анемии для восстановленной формы HbS характерно снижение растворимости в десятки раз и это приводит к образованию геля, имеющего более высокую жесткость [39]. Снижение деформируемости эритроцитов имеет место и при других гемоглинопатиях [44]. При сердечно-сосудистой патологии было обнаружено также наличие фетального гемоглобина (HbF). Последний отличается от HbA (взрослого) тем, что содержит аминокислоту изолейцин. HbF спонтанно накапливает MeHb значительно быстрее, чем HbA [47].

Вероятно, что гетерогенность Hb предотвращает кристаллизацию его в эритроцитах, защищает клетки от деформации и преждевременного разрушения. Разнообразие форм Hb дает определенные преимущества организму в процессе его приспособления к условиям среды [47].

Деформация эритроцита, особенно растяжение мембраны в результате возрастания осмотического давления внутри клетки, сопровождается увеличением проницаемости мембран для одно- и двухвалентных катионов, вероятно, это связано с изменением поверхностного натяжения на границе раздела мембрана/вода [41]. Повышение

внутриклеточной концентрации кальция в эритроците приводит к превращению двояковогнутых дисков в эхиноциты [39].

Изменение объема эритроцитов сопряжено с изменениями в транспорте основных катионов в клетке. Уменьшение объема клетки сопровождается увеличением концентрации гемоглобина и уровня миграции энергии между молекулами гемоглобина. В результате увеличения локальной концентрации гемоглобина, индуцированного сжатием эритроцитов, меняются содержание мембрано-связанной формы гемоглобина и структура как белковой части молекулы, так и протопорфирина [45].

При гипертонической болезни (первичной гипертензии человека) было выявлено уменьшение среднего объема эритроцитов и изменение формы этих клеток – появление редко встречающихся в норме эритроцитов в виде односторонне выгнутого диска чашевидной формы. Было установлено, что эти изменения формы и объема клеток сопровождаются усилением фосфорилирования белка полосы 4,9 мембранного цитоскелета, играющего определяющую роль в изменениях этих параметров. Фосфорилирование белков цитоскелета вызвано активированием протеинкиназы С эритроцитов. Активирование этого фермента осуществляется через усиление обмена фосфоинозитидов плазматической мембраны, в частности, диацилглицерином [48].

При ишемии сердца (ИБС) возрастает встраивание холестерина в мембрану эритроцита, что приводит к увеличению их размера и изменению формы. В крови здоровых людей содержатся эритроциты размером от 5,5 до 7,9 мкм, при обследовании больных с осложненным атеросклерозом (инфаркт миокарда, нарушение мозгового кровообращения) и больных с тяжелыми формами гиперлипидемии, гиперхолестеринемии диаметр клеток может достигать 10 мкм и более и их доля с увеличением тяжести заболевания растет. Также наблюдается превращение двояковогнутых дисков в сфероциты и эхиноциты [41].

Все описанные выше структурные перестройки в эритроцитарной мембране сопровождаются изменениями активности различных ферментов, определяющих нормальное функционирование эритроцитов, изменением проницаемости мембраны, снижением скорости переноса кислорода, нарушением функции мембранных гликопротеидов. Изменение липид-белковых и белок-белковых взаимодействий вызывает перераспределение зарядов на поверхности эритроцитов и снижение общего

заряда клетки, приводя к увеличению агрегации эритроцитов и изменению реологических свойств крови [41].

Известно, что при лейкозах эритроциты имеют редуцированный гликокаликс, вследствие чего изменяется его структурная основа для какой-либо стимуляции мембранных антигенов и рецепторов [49]. Очевидно, это можно сказать в отношении и других патологий.

Межклеточный транспорт веществ (транцитоз) имеет отношение к обмену макромолекул между клетками. Например, он обнаруживается при движении белков плазмы через эндотелий капилляров (кровь–эндотелий–клетка или субэндотелиальное пространство). Через межклеточные щелевидные контакты неповрежденного эндотелия капилляров осуществляется быстрый обмен макромолекулами (с Мм менее 40 кД) в обоих направлениях [41].

При развитии атеросклероза, межэндотелиальные щели расширяются, и их поперечный размер увеличивается в диапазоне от 10 до 20 нм, что способствует проникновению липопротеидных частиц [41]. Также, на ранних стадиях атеросклероза в эндотелии резко активизируется неспецифический эндоцитоз липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), которые попадают в крупные эндосомы и кавеолы. Процесс интернализации ЛПНП усиливается в результате обогащения апо-Еаргинином, т. е. активация эндоцитоза вызывается возрастанием электростатического взаимодействия положительных зарядов ЛПНП с отрицательно заряженной мембраной эндотелия и накоплением в стенке артерий протеогликанов, способных адсорбировать ЛПНП и ЛПНОП. Длительная активация неспецифического эндоцитоза приводит к патологическим изменениям в клетках и оказывает цитотоксическое действие [50].

### *Роль вирусов и везикул в развитии рака шейки матки*

Рак шейки матки (РШМ) занимает четвертое место среди наиболее часто диагностируемых видов раковых заболеваний и является четвертой по значимости причиной смертности от рака у женщин. В 2018 году всего в мире было зарегистрировано около 570 000 случаев рака шейки матки и 311 000 смертей [44], а в 2020 году уровень заболеваемости повысился до 604 000 новых случаев и 342 000 смертей.

В России показатели заболеваемости РШМ (в среднем 17 на 100.000 (значительно варьируется в зависимости от региона)) выше, чем в среднем в мире (В 2019 году

заболеваемость РШМ была равна 15,4, а смертность 5,0 на 100.000 женского населения. Было зарегистрировано 17 500 случаев рака шейки матки (РШМ) и 6 300 случаев смерти [45]). Этот показатель значительно ниже самых высоких мировых показателей заболеваемости, но выше, чем во многих странах Европы [44]. В общей структуре онкологической заболеваемости женского населения РШМ составляет 5,3%, занимая 6-е место, а среди органов репродуктивной системы — третье (14%) после рака молочной железы (54,5%) и эндометрия (19,3%) [46].

В течение последнего десятилетия в России наблюдается постепенный рост заболеваемости РШМ со среднегодовым темпом прироста 2,19% и общим темпом прироста 24,93%. Так, количество выявленных женщин с РШМ в 2019 году на 18,01% больше, чем в 2009-м со среднегодовым темпом прироста – 1,98% [47]. Тенденция роста заболеваемости РШМ в России будет сохраняться. К 2030 г. показатель заболеваемости достигнет 20/100000 населения, что в два раза больше, чем в 1990 г. Россия – одна из немногих стран, в которых заболеваемость и смертность от РШМ не снижается [48].

В 2022 г. в Республике Саха (Якутия) впервые в жизни выявлено 2 614 случаев злокачественных новообразований (2021 г. – 2 506), в том числе 1 291 (49,4%) у мужчин и 1 323 (50,6%) у женщин. РШМ в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения РС(Я) в 2022 г. занимает второе место, с абсолютным показателем в 124 выявленных случаев (9,4%).

Первое место в структуре онкологической заболеваемости репродуктивной системы женщины в РС(Я) занимает рак молочной железы и рак шейки матки. Темп прироста показателя по этим двум заболеваниям в 2001–2009 гг. составил 28,5 % и 9,6 % соответственно [49]. Так, проблема РШМ актуальна для всех регионов Дальнего Востока, на территории которых проживают более 4,2 млн женщин (по данным Росстата на 2021 г.). Показатели заболеваемости РШМ на Дальне-Восточном федеральном округе выше, чем в среднем по России. Так, в Республике Саха (Якутия), входящей в состав Дальневосточного региона России, было выявлено 19,56 новых случаев РШМ на 100.000 населения, что значительно выше среднероссийских показателей. Более того, наблюдается тенденция к росту количества случаев РШМ (102 случая в 2008 и 130 в 2021 гг.). Ежегодно в республике отмечается увеличение количества вновь выявленных случаев РШМ. Так, если в начале века РШМ в структуре онкологических заболеваний женского населения занимал 3 место, то в последние годы стал занимать одну из

лидирующих позиций, уступая лишь раку молочной железы. Диапазон среднего возраста заболевших в 2003 году составлял 40-54 лет, однако, наблюдается сдвиг в данном диапазоне в сторону более молодого возраста.

На протяжении 10 последних лет в структуре заболеваемости РШМ отмечается постепенный рост числа заболевших женщин молодого и среднего возраста, то есть женщин трудоспособного возраста.

Женщины трудоспособного возраста находятся в группе высокого риска по заболеваемости РШМ, и эта группа женщин должна максимально привлекаться к профилактическим обследованиям [50]. Рак шейки матки — это вирус ассоциированная форма рака, для которой рекомендуется современная модель скрининга. По данным исследователей США, было установлено, что вирусы папилломы человека (ВПЧ) выявляются в 91% случаев при раке шейки матки: в 51% наблюдений — ВПЧ 16 типа, в 16% — ВПЧ 18 типа и в 24% — другие онкогенные и редкие вирусы [51]. Как альтернатива традиционному цитологическому скринингу, во многих странах в настоящее время применяется тестирование на ДНК вируса папилломы человека. Количество выявленных предопухолевых или опухолевых образований при этом методе тестирования выше (90–95%) по сравнению с традиционным цитологическим методом. Однако доля женщин без аномальных находок, но с положительными результатами при тестировании на ВПЧ значительно больше среди женщин моложе 30 лет. Возникает необходимость получения данных участниц скрининга трудоспособного возраста, у которых ВПЧ-положительные результаты клинических анализов [52]. Метод Папаниколау остается золотым стандартом в скрининге РШМ, но большую популярность приобретает метод жидкостной цитологии, повышающий качество исследования. Метод при первичном скрининге обладает повышенной чувствительностью при диагностике интраэпителиальной неоплазии CIN1, а также способствует снижению числа неадекватных мазков приблизительно с 9 до 1% [53, 54].

В России в течение последних трех десятилетий не изменились подходы к организации цитологического скрининга. Такие важные составляющие, как соотношение преинвазивного рака и ранних форм рака, есть ли тестирование на наличие вирусов папилломы человека (ВПЧ), используются ли более современные методы диагностики патологии шейки матки, достигается ли увеличение охвата населения, происходит ли более пристальное обследование молодых групп населения, изменяются медленными

темпами. В настоящее время результаты активного выявления злокачественных новообразований, и в том числе РШМ, не совсем адекватны имеющимся возможностям здравоохранения. Данные статистики свидетельствуют о том, что ежегодно число вновь заболевших РШМ увеличивается, а доля выявленных больных 1-й стадией и рака in Situ нарастает более медленными темпами [55].

Все методы раннего выявления рака, программы скрининга отдельных форм рака работают эффективно только при соблюдении имеющихся рекомендаций и научных данных, полученных в результате проведения полномасштабных скрининговых программ.

Несмотря на ряд выдающихся достижений в изучении механизмов канцерогенеза, в разработке новых методов ранней диагностики РШМ, санитарно-просветительской работе, рак шейки матки продолжает оставаться одной из серьезных проблем онкологии во многих странах мира и требует дальнейшего изучения.

До сих пор нет четкого понимания механизмов инфицирования папилломавирусом человека, а также его элиминации из организма [56]. Известно, что рак шейки матки вызывается папилломавирусом человека в 99 процентах случаев, но лишь у небольшого количества женщин инфицирование папилломавирусом человека ведет к развитию рака шейки матки. При этом на основании цитологических и гистологических исследований образцов шейки матки женщин, инфицированных папилломавирусом, в настоящее время невозможно достоверно установить критерии, которые указывали бы на возможность злокачественного прогрессирования патологических изменений. Кровь, как уникальная ткань, обладающая специфическими и неспецифическими защитно-приспособительными механизмами, может явиться источником получения ключевой информации о механизмах инфицирования организма человека папилломавирусом.

Папилломавирусы человека (ВПЧ) представляют собой небольшие двухцепочечные ДНК-вирусы, которые инфицируют эпителиальные клетки. Примерно одна треть из них обладает тропизмом к генитальному эпителию. Эти вирусы можно разделить на типы высокого риска (включая ВПЧ-16, -18, -31 и -33), которые связаны с развитием аногенитальных злокачественных новообразований и вирусов низкого риска (ВПЧ-6 и -11) которые индуцируют гиперпролиферативные поражения, но редко связаны со злокачественными новообразованиями [57]. Типы 16 и 18 ответственны за большинство случаев рака, вызванного папилломавирусами человека [58].

В случае рака шейки матки ВПЧ является возбудителем примерно в 99 процентах случаев [59]. При этом известно, что лишь у небольшого количества женщин инфицирование папилломавирусом человека ведет к развитию инвазивного рака, и на основании цитологических и гистологических исследований образцов шейки матки пока невозможно достоверно установить критерии, которые указывают на прогрессирование патологических изменений до развития рака шейки матки [60].

До сих пор нет четкого понимания механизмов клеточного иммунного ответа, способствующих элиминации ВПЧ-инфекции из организма человека [61]. Считается, что врожденный иммунный ответ, включающий макрофаги, естественные киллерные клетки и Т- киллеры, может играть определенную роль в первой линии защиты от ВПЧ-инфекции [54].

Недостаточные знания механизмов инфицирования папилломавирусом и его элиминации достаточно расширяет поле исследований. Особый интерес представляет изучение роли крови в реализации этих механизмов.

Достаточно долго поддерживалось мнение, что ВПЧ не вызывает вирусемии. Ранее ДНК ВПЧ, обнаруженную в крови, интерпретировали как ДНК из метастазирующих опухолевых клеток [62].

С течением времени, с усовершенствованием методов молекулярной биологии, появились доказательства наличия ВПЧ в крови у пациентов с злокачественными новообразованиями, преинвазивными изменениями и у здоровых людей. Хотя, ранее, кровь у здоровых считалась стерильной средой [63].

К настоящему моменту присутствие генов ВПЧ в крови показано в значительном количестве исследований.

В мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) у женщин с раком шейки матки обнаружены гены ВПЧ типов 16 и 18 [64], у женщин с асимптомной урогенитальной ВПЧ-инфекцией – гены типов 6, 11, 16, 18 [65], у ВИЧ-инфицированных педиатрических пациентов (медиана возраста 13,2 лет) - гены ВПЧ-16 [62], у мужчин с инфицированной ВПЧ-16 спермой – гены ВПЧ этого же типа [66]. В МКПК здоровых доноров крови также удалось обнаружить гены ВПЧ-16 [62]. В Австралии же у здоровых доноров крови - мужчин из МКПК выделили множество разновидностей генов ВПЧ разных типов, принадлежащих к кожным бета- и гамма-папилломавирусам, альфа-папилломавирусам слизистых, причем гены ВПЧ высокого риска были обнаружены в 1,7%

случаев. При этом показано, что ВПЧ прикреплен к клеточной поверхности, а не находится внутри [67]. Доказательств размножения ВПЧ в МКПК в настоящее время еще нет.

В сыворотке крови гены ВПЧ 16 и 18 типов были обнаружены у пациентов с раком шейки матки [68,69], раком прямой кишки, орофарингеальным раком [69], плоскоклеточным раком головы и шеи [70]. ДНК ВПЧ-16 найдена в сыворотке пациентов с раком молочной железы [71,72], а также с доброкачественными новообразованиями молочных желез [72].

В плазме у пациенток с раком шейки матки определялась ДНК ВПЧ 16 и 18 типов [1,73,74], 45, 51, 52 типов [1]. У пациенток с бессимптомным течением инфекции шейки матки в плазме была обнаружена ДНК ВПЧ 45, 51, 16 типов, причем ВПЧ-16 показал наивысшую вирусную нагрузку [1].

В пуповинной крови была обнаружена ДНК ВПЧ типов 6, 11, 18, 52 [2].

В цельной гепаринизированной крови гены ВПЧ 16 и 18 типов найдены у пациентов с раком шейки матки [2], раком легкого [3].

Данные о совпадении типов ВПЧ в крови и в ткани шейки матки различны. Рядом исследователей установлено, что тип ВПЧ, обнаруженный в ткани шейки матки и в крови один и тот же [2,4], в других же исследованиях показано, что тип ВПЧ может не совпадать [1,75].

Также противоречивы результаты исследований, посвященные корреляции между наличием ДНК ВПЧ в крови и прогнозом течения онкологических заболеваний. Некоторые исследования свидетельствуют о том, что обнаружение ДНК ВПЧ в образцах крови может быть полезным маркером тяжести заболеваний, связанных с ВПЧ, метастазированием или рецидивированием заболевания [1,70,73,76,77]. Однако Peedicauil и др. [5] показали, что обнаружение ДНК ВПЧ в плазме не является прогностическим маркером рецидива рака шейки матки.

Остаются без ясного понимания множество моментов, включая, как ВПЧ попадает в кровь, является ли вирусемия естественной стадией инфицирования организма человека папилломавирусами, и, каким образом кровь участвует в механизмах их элиминации.

Являясь древнейшими спутниками человека, ВПЧ рассматриваются исследователями в роли источника изучения эволюционной истории, включающей период нескольких миллионов лет [78]. Чтобы достичь этого эволюционно успешного

образа жизни, ВПЧ должны избегать систем защиты хозяина с помощью механизмов иммунного уклонения, который ингибирует и задерживает иммунный ответ хозяина на папилломавирусную инфекцию [79].

В свою очередь, организм человека, контактируя с ВПЧ на протяжении многих миллионов лет, должен был выработать эффективные, в какой-то мере наименее энергозатратные механизмы, способствующие элиминации вируса.

Потенциал крови, уникальной ткани, соединяющей воедино весь организм, обладающей специфическими и неспецифическими защитно-приспособительными механизмами, определяет продолжающийся значительный интерес к научным исследованиям в этой области.

## **1.2. Особенности режима работы для исследования биологических образцов**

Проникновение человека в глубины атома позволило создать ряд уникальных физических приборов, используемых во многих областях, включая медицину. Ими стали электронные микроскопы, разрешающая способность которых на два-три порядка превышала разрешающую способность оптического микроскопа.

Сканирующие электронные микроскопы (СЭМ) широко используются в лабораториях, в различных областях науки и практики, включая металлургию, медицину и химию. На сегодняшний день, биомедицина и ее приложения постоянно развиваются. СЭМ до сих пор остается незаменимым инструментом для анализа, диагностики и детального изучения биологических объектов.

СЭМ (или растровая электронная микроскопия) основана на отражении электронного пучка от объекта; принцип действия СЭМ заключается в сканировании поверхности образца сфокусированным электронным пучком и анализе рентгеновского излучения, возникающего в результате взаимодействия электронов, отраженных от поверхности, с материалом. Изображения поверхности объекта формируются с пространственным разрешением в несколько нанометров, что позволяет получить информацию о составе, структуре и других свойствах приповерхностных слоев исследуемого образца. В современных сканирующих микроскопах используются пучки электронов с энергией до 50 кэВ. В настоящее время наилучшее разрешение составляет 0,12 нм. Увеличение объекта при этом достигает 200 000 раз. Анализ отраженного электронного пучка дает информацию о рельефе поверхности и кристаллической

структуре приповерхностных слоев, а анализ рентгеновского излучения, возникающего при взаимодействии электронного пучка с образцом, позволяет качественно и количественно охарактеризовать химический состав приповерхностных слоев.

### 1.2.1 Физические основы метода

СЭМ применяется для исследования и анализа морфологии микроструктур и изучения химического состава материалов. Физические основы СЭМ базируются на принципах световой оптики. Глаз человека различает объекты с угловыми размерами до  $1/60$  градуса, т.е. разрешающая способность человеческого глаза как оптического прибора примерно равна  $0,1$  мм на расстоянии  $25$  см для наблюдения. Разрешение оптического микроскопа составляет около  $2000 \text{ \AA}$ . Световая микроскопия до сих пор широко и активно используется в различных сферах деятельности человека, в том числе в медицине: в диагностике и исследовании заболеваний. На основе результатов экспериментов, связанных с обнаружением влияния магнитных полей на траектории движения электронов, проведенных в 90-х годах XIX века [14], были разработаны принципы электронной микроскопии: лучи света были заменены пучком электронов. В настоящем параграфе будут изложены теоретические основы СЭМ.

#### Пространственное разрешение и уравнение Аббе

Предел разрешения — это минимальное расстояние, при котором отдельно наблюдаются две структуры. Пространственное разрешение в идеальной оптической системе описывается уравнением Аббе [80]:

$$d = \frac{0,612 \cdot \lambda}{n \sin \alpha}$$

где  $d$  — предел разрешения,  $\lambda$  — длина волны излучения, с помощью которого получается изображение,  $n$  — относительный показатель преломления среды между точечным источником и линзой,  $\alpha$  — половина угла конуса света, выходящего из плоскости образца и принимаемого объективом (полуугловая апертура в радианах),  $n \sin \alpha$  — числовая апертура.

Первый электронный микроскоп был сконструирован в 1930-х гг. [81] по подобию оптического микроскопа. Вместо источника света и линзы, фокусирующие свет начали использовать электронную пушку и электромагнитные катушки для фокусировки электронного пучка. В СЭМ для визуализации используется в качестве зонда для сканирования поверхности исследуемого образца сфокусированный электронный пучок.

### *Взаимодействие электронов с образцом.*

Формирование изображения в СЭМ производится на основе сигналов, получаемых в результате упругих и неупругих взаимодействий электронного пучка с исследуемым образцом. В зависимости от вида взаимодействия получают следующие частицы, излучения: 1) отраженные электроны (ОЭ), появляющиеся вследствие упругого рассеяния – отражения падающих электронов при их взаимодействии с атомными ядрами или электронами внешних оболочек, обладающими близкой по величине энергией. Энергии ОЭ незначительно отличаются от энергий первичных электронов, а углы отклонения траекторий движения рассеянных электронов значительны от направления первичных электронов. Первичные электроны, которые упруго рассеялись на угол больший, чем  $90^\circ$ , называются отраженными электронами (ОЭ) и дают полезный сигнал для получения изображения образца. Неупругое рассеяние — это многократное взаимодействие первичных электронов с электронами и атомами образца со значительной потерей их энергии – передаче энергии от первичного электронного пучка к атому образца, которая зависит от возбуждения электронов образца (одиночное либо коллективное) и от энергии связи электрона с атомом образца. В результате ионизации атомов образца генерируются вторичные электроны (ВЭ), энергия которых ниже 50 эВ. ВЭ используются и для получения изображения, и для анализа образца. Кроме ОЭ и ВЭ в результате взаимодействия первичных электронов с образцом генерируются рентгеновское излучение, Оже-электроны и катодолюминесценция. На рисунке 1.3 показаны области, из которых детектируются различные сигналы.

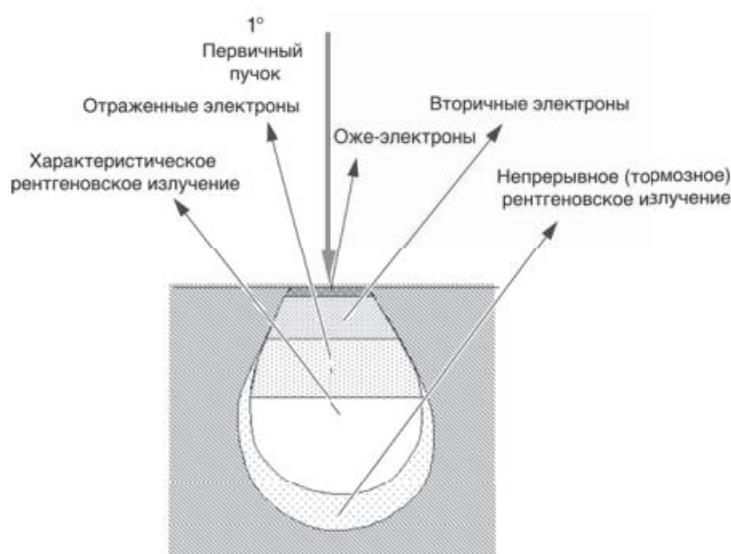


Рисунок 1.3. Излучения, генерируемые в процессе взаимодействий электронного пучка с образцом в СЭМ, и области, из которых они детектируются.

Большая часть первичных электронов высокой энергии проходят на некоторое расстояние вглубь образца вплоть до их столкновения с атомами образца – образуют область первичного возбуждения, размер и форма которой в большей степени зависят от энергии электронного пучка и атомного номера элемента, т.е. плотности исследуемого образца. На рисунке 1.4 показана зависимость объема взаимодействия от ускоряющего напряжения и атомного номера материала образца: объем зоны взаимодействия, и глубина проникновения первичных электронов возрастают с увеличением энергии электронного пучка и падают с возрастанием атомного номера материала образца; форма зоны взаимодействия также меняется в зависимости от ускоряющего напряжения. Применение более высокого ускоряющего напряжения уменьшает получаемую информацию о подробностях структуры поверхности образца. На рисунке 1.5 показано изображение образца плотноупакованной структуры опала, наблюдаемый в СЭМ с полевой эмиссией при различных ускоряющих напряжениях. Очевидно, что при высоких ускоряющих напряжениях ухудшается качество изображения – поверхности сфер становятся гладкими.

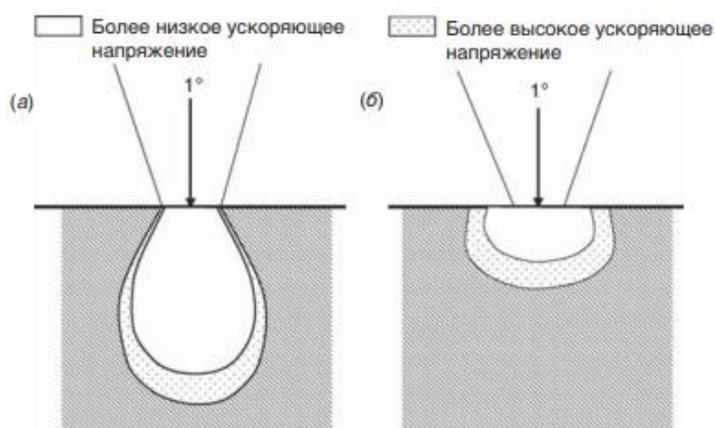


Рисунок 1.4. Зона взаимодействия в зависимости от ускоряющего напряжения и атомного номера материала образца: для материала с низким атомным номером (а) и высоким атомным номером (б).

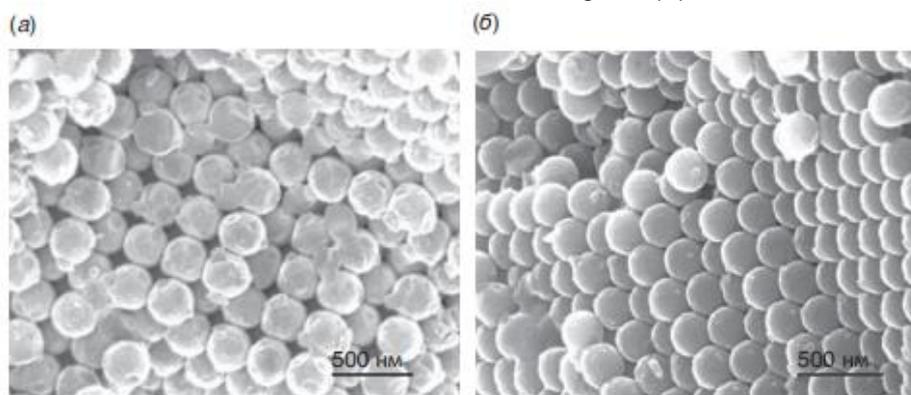


Рисунок 1.5. Изображения плотноупакованной структуры опала  $\text{CaF}_2$ , которые были получены в СЭМ при различных ускоряющих напряжениях: 1 кВ (а); 20 кВ(б).

### *Вторичные электроны*

В связи с тем, что ВЭ являются наиболее информативными для получения изображения поверхности образцов, рассмотрим их наиболее детально. ВЭ образуются при взаимодействии первичных электронов вблизи поверхности образца, а именно при столкновении высокоэнергетических электронов пучка с электронами внутри самого образца с передачей энергии от первичных электронов к электронам образца. В результате конечная энергия ВЭ становится достаточной для того, чтобы они покинули образец. Большая часть ВЭ имеет энергию менее 10 эВ. ВЭ делятся на два типа: на ВЭI, которые генерируются ближе к поверхности в результате взаимодействия первичного электронного пучка и электронов образца, и ВЭII, которые генерируются в результате взаимодействия обратно-рассеянных, или ОЭ и электронов образца. Итак, ВЭ – это выбитые из атомов слабо связанные электроны первичными электронами в процессе ионизации атомов, энергия которых в среднем лежит в интервале 3 – 5 эВ и они могут достигать лишь области в пределах нескольких нанометров от поверхности материала. ВЭ привязаны к положению пучка и могут дать топографическую информацию с хорошим разрешением. Низкоэнергетические ВЭ легко притягиваются к детектору Эверхарта-Торнли (ЭТ), который применяется в большинстве СЭМ. Для детектирования вторичных электронов сцинтиллятор ЭТ преобразует энергию электронов в фотоны, которые проходят по световоду из плексигласа или из полированного кварца и выходят через стенку камеры образцов в фотоэлектронный умножитель (ФЭУ), который снова преобразует энергию фотонов в электроны. Выходное напряжение ФЭУ еще усиливается и в конечном итоге модулирует яркость изображения на экране дисплея СЭМ.

Топографическое изображение зависит от количества ВЭ, достигающих детектора. С помощью ВЭ можно получить пространственное разрешение поверхностных структур с размером порядка 10 нм. ВЭ, не достигшие детектора, приводят к образованию теней или более темных участков.

### *Характеристическое рентгеновское излучение*

Характеристическое рентгеновское излучение, получаемое вследствие взаимодействия первичных электронов с образцом, применяется для изучения его элементного (химического) состава, микроанализа в СЭМ. Это излучение возникает, когда в результате столкновения с первичным электроном выбивается электрон

внутренней оболочки атома образца с его орбитали и на его место переходит электрон с внешней оболочки.

### *Устройство сканирующих (растровых) электронных микроскопов*

В данном разделе рассматриваются основные составные части СЭМ. На рисунке 1.6 показано строение колонны СЭМ. В электронной пушке из катода (обычно вольфрамовый) эмитируются электроны и ускоряются электрическим полем. Энергии электронов могут быть от 0,1 кэВ до 30 кэВ. Т.к. диаметр электронного пучка катода велик для формирования изображения с высоким разрешением – около 50 мкм для вольфрамового катода, его фокусируют электромагнитными линзами и апертурными диафрагмами до требуемого значения размера пятна (1–100 нм). Для устранения рассеяния электронов в воздухе в колонне требуется создание высоковакуумной среды в колонне СЭМ. Кроме того, в СЭМ устанавливаются столик для образцов, катушки развертки (отклоняющая система) электронного пучка, система детектирования сигнала и система обработки, позволяющие получать изображения поверхности образца в реальном времени.

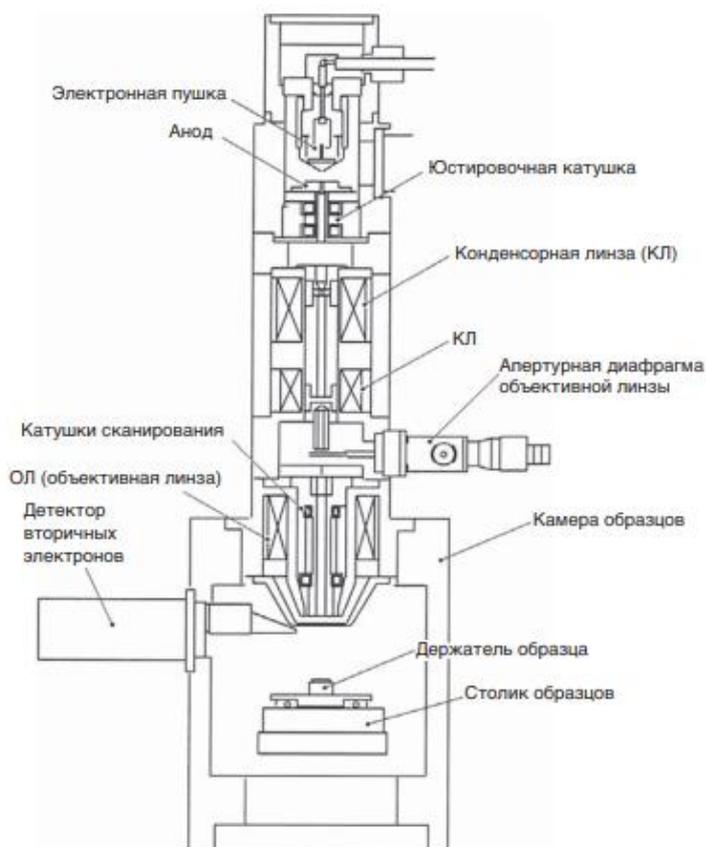


Рисунок 1.6. Схематическое изображение растрового электронного микроскопа (JSM-5410, с разрешения фирмы JEOL, США).

## Электронные пушки

Для обеспечения требуемого качества изображения необходимо, чтобы электронная пушка СЭМ генерировала стабильный электронный пучок с большим током, малым размером пятна, изменяемой энергии и малой энергетической дисперсией. В электронно-оптической системе СЭМ используется несколько типов электронных пушек. В более ранних конструкциях СЭМ обычно использовались вольфрамовые V-образные или гексаборид-лантановые ( $\text{LaB}_6$ ) катоды. В современных СЭМ применяются другие эмиттеры электронов – полевые катоды, которые позволяют получать более высокую плотность тока при более низкой энергетической дисперсии. Для СЭМ имеют важное значение также срок эксплуатации катодов.

В настоящее время широкое применение имеют надежные и недорогие электронные пушки с вольфрамовым катодом с диаметром примерно 100 мкм (часто для получения изображений с низким увеличением и рентгеновского микроанализа) [82]. Электронная пушка обычно состоит из трех частей: V-образной вольфрамовой нити (катода), цилиндра Венельта и анода (рисунок 1.7).

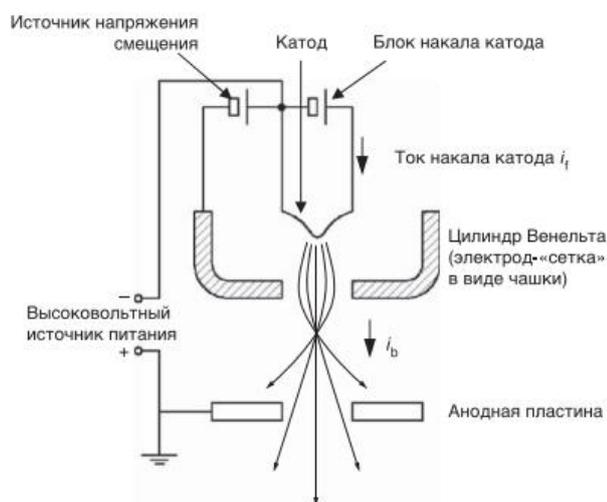


Рисунок 1.7. Схема термоэлектронной пушки с вольфрамовым прямонакальным катодом и с автоматическим смещением (с эффектом предварительной фокусировки, оказываемый цилиндром Венельта).

Эмиссия электронов с поверхности вольфрамового катода в вакуум производится при нагревании катода током накала до температуры более 2800 К, которое способствует преодолению электронами работы выхода из металла. Между катодом и цилиндром Венельта прилагается от источника высокого напряжения разность потенциалов от 0,1 до 30 кВ. Т.к. анод заземлен, электрическое поле, создаваемое между катодом и анодной пластиной, ускоряет электроны в направлении анода. Электроны разлетаются по

траекториям, направленными в широком диапазоне углов. При этом вблизи отверстия в цилиндре Венельта формируются круто изогнутые эквипотенциальные поверхности, которые обеспечивают грубую первичную фокусировку электронного пучка (рисунок 1.7).

Эмиссия электронов, т.е. ток пучка, возрастает с увеличением тока накала катода (рисунок 1.8) до точки насыщения тока накала – наименьшее значение тока накала, при котором эмиссия электронов достигает максимума. Перегрев катода за счет превышения током накала значения в точке насыщения приводит к существенному уменьшению срока службы катода.

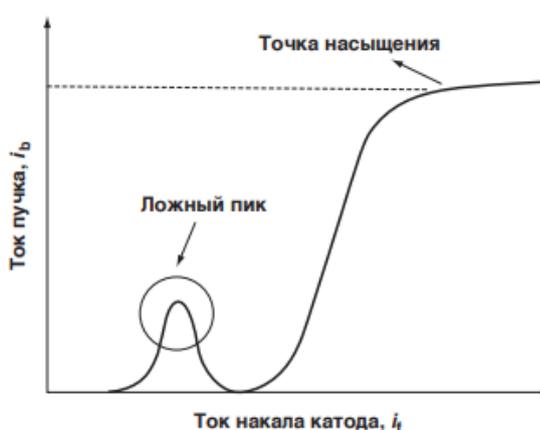


Рисунок 1.8. Ток насыщения электронной пушки с вольфрамовым V-образным катодом: в точке насыщения большинство электронов эмитируется с острия катода, при этом под влиянием ускоряющего напряжения формируется плотный электронный пучок.

Термоэлектронные источники электронов являются недорогими и для их работы не требуется высокого вакуума, но они имеют короткий срок службы, низкую яркость и большой энергетический разброс электронов в пучке. Для современных электронных микроскопов предпочтительно использовать пушки с автоэлектронной, или полевой, эмиссией электронов. В них в качестве источника электронов используется острый катод – монокристаллическая вольфрамовая проволока с очень острым концом, обычно приготовленным методом электролитического травления. На рисунке 1.9 а) показана микрофотография типичного автоэмиссионного острейного катода и схематический чертеж полевой электронной пушки (рисунок 1.9 б). При этом электроны эмитируются с поверхности острейного катода очень сильным приповерхностным электрическим полем, например, в системе, представленной на рисунке 1.9б) используются два анода: напряжение  $V_0$  в несколько киловольт между острием и первым анодом используется для эмиссии электронов из острия, а напряжение  $V_1$  является ускоряющим напряжением.

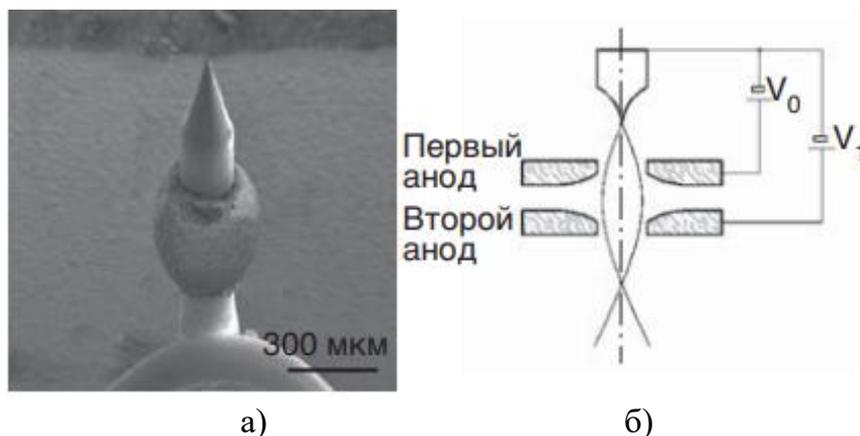


Рисунок 1.9. Источник электронов с полевой эмиссией с острым полевым катодом (а); принципиальная электрическая схема подключения ПЭК (б).

Имеется три типа полевых электронных катодов (ПЭК), применяемых в системах СЭМ: 1) холодный полевой – эмиссия электронов происходит при комнатной температуре и из ПЭК зависит только от электрического поля, приложенного между анодами и катодом, ток эмитированного электронного пучка очень мал, но получается высокая яркость благодаря малому диаметру электронного зонда и малой площади области эмиссии; 2) термополевой – эмиссия электронов при высокой температуре, которая снижает абсорбцию молекул газа и стабилизирует ток эмиссии электронного пучка даже при ухудшении вакуумных условий; 3) Шоттки [83]. ПЭК и катод Шоттки более предпочтительны, т.к. они имеют больше яркости, малый размер пятна и большой срок службы. Но катоды Шоттки лучше, чем ПЭК вследствие более высокой стабильности и простоты управления. Поскольку область эмиссии источника с катодом Шоттки примерно в 100 раз больше, чем область эмиссии источника с ПЭК, первые могут давать примерно в 50 раз более высокий ток по сравнению со вторым при одинаковом энергетическом разбросе электронов в пучке.

В сравнении с термоэмиссионными источниками, пушки с ПЭК дают более высокую яркость пучка (примерно в 100 раз больше). ПЭК также обладает очень низким энергетическим разбросом электронов ( $\sim 0,3$  эВ), что существенно снижает хроматические aberrации и позволяет формировать электронный зонд с диаметром менее 2 нм и получать намного более высокое разрешение изображения в СЭМ. Но полевые эмиттеры работают в условиях сверхвысокого вакуума (менее  $10^{-9}$  Торр) для стабилизации электронной эмиссии и для предотвращения загрязнения поверхности полевого эмиттера.

### *Электронные линзы*

Электронные пучки — заряженные частицы могут фокусироваться электростатическими или магнитными линзами. В системах СЭМ применяются только электромагнитные линзы, т.к. электронный пучок, управляемый магнитным полем, обладает меньшими aberrациями. Управление траекториями электронов осуществляется магнитными полями, создаваемыми проволочными катушками («электромагниты»), по которым пропускаются токи. Электронные линзы используются и для увеличения, и для уменьшения диаметра электронного пучка, поскольку их преломляющая сила является переменной, что приводит к получению различной длины фокуса. В микроскопе электронные линзы применяются всегда только для получения острого зонда.

### *Конденсорные линзы*

После прохождения от эмиттера через отверстие в анодной пластине электронный пучок расходится. С помощью конденсорной линзы (магнитной линзы) электронный луч собирается и коллимируется в виде относительно параллельного пучка. Магнитная линза обычно состоит из двух железных полюсных наконечников, обладающих симметрией вращения, внутри которых размещается обмотка из медного провода, создающая магнитное поле. В центре полюсных наконечников имеется отверстие, через которое может проходить электронный пучок. Эти два наконечника разделены магнитным зазором, в котором магнитное поле оказывает воздействие (фокусирующее) на электронный пучок. Положением точки фокуса можно управлять, регулируя ток через конденсорную линзу. Обычно у конденсорной линзы имеется апертурная диафрагма, и точка фокуса электронного пучка расположена выше этой конденсорной диафрагмы (рисунок 1.10). Изменяя размер конденсорной диафрагмы, можно уменьшить влияние неоднородностей пучка и рассеянных электронов. В современных СЭМ часто используют вторую конденсорную линзу — дополнительное средство управления параметрами электронного пучка.

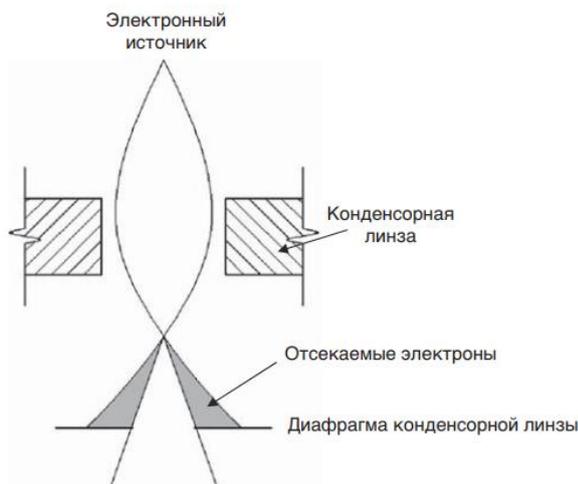


Рисунок 1.10. Прохождение электронов через конденсорную линзу и конденсорную диафрагму.

### Объективные линзы

Электронный пучок расходится ниже конденсорной апертуры. Объективные линзы используются для фокусировки электронного пучка в точечный зонд на поверхности образца, для обеспечения дальнейшего уменьшения диаметра зонда, т.е. повышению разрешения изображения. На рисунке 1.11 [83] показаны три конструкции объективных линз.

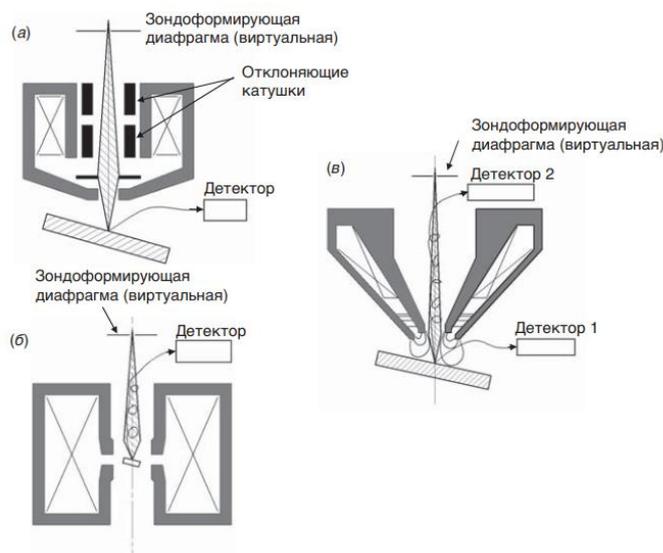


Рисунок 1.11. Конструкция различных типов объективных линз: асимметричная линза с точечным отверстием (а); симметричная иммерсионная линза (б); полуиммерсионная линза с магнитным полем.

### Параметры колонны

Кроме размера пятна и угла сходимости пучка  $\alpha$  на разрешение и глубину фокуса изображения в СЭМ, т.е. на качество изображения, также влияют взаимозависимые

параметры: энергия электронного пучка, ток линзы, диаметр апертурной диафрагмы, рабочее расстояние  $WD$  (*working distance*) электронных линз.

В электронно-оптической колонне могут использоваться одна или несколько диафрагм двух типов, которые необходимы для отсечки рассеянных электронов и используются для контроля aberrаций последней из линз: 1) реальная апертурная диафрагма, которая устанавливается в основании последней линзы и влияет на форму пучка и резкость его краев; 2) виртуальная апертура, которая вводится в электронный пучок в точке над последней линзой и ограничивает электронный пучок, оказывает аналогичный эффект.

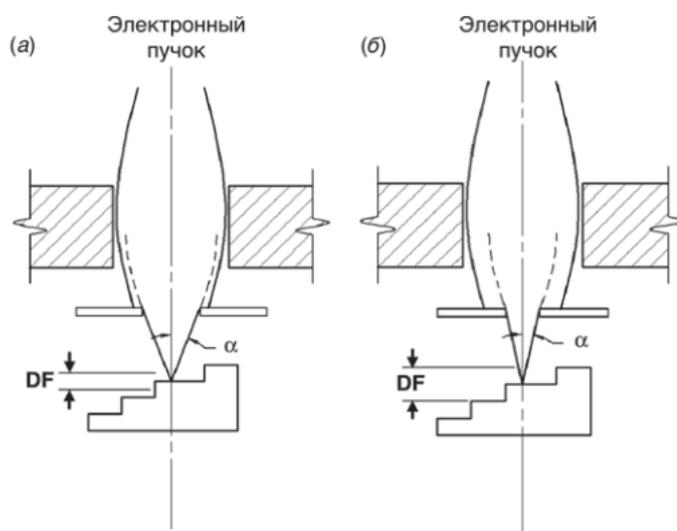


Рисунок 1.12. Апертурные диафрагмы малого размера (б) и большего размера (а).

От размера апертурной диафрагмы зависит угол сходимости пучка  $\alpha$  (обуславливающей изменение глубины фокуса  $DF$  и тока в электронном зонде на образце) при одинаковом рабочем расстоянии  $WD$  (Рисунок 1.12).

#### *Коррекция астигматизма*

Дефекты линз (ошибки механической обработки и асимметрия обмоток линз) и контаминация апертурной диафрагмы, либо колонны изменяют формы профиля поперечного сечения электронного пучка: вместо круглого сечения получается эллиптическое. Т.е. изображение будет растягиваться вдоль различных направлений в условиях недофокусировки или перефокусировки. Это называется астигматизмом, коррекцию которого производят с помощью нескольких электромагнитных катушек вокруг электронного пучка «стигматор».

### Глубина резкости

Часть изображения, которая приемлемо сфокусирована, называется «глубиной поля», или глубиной резкости DF [84].

Чем меньше угол сходимости электронного пучка, тем больше глубина поля (более острому электронному лучу соответствует меньшее изменение размеров пятна в направлении луча). Глубина резкости DF зависит от размеров апертурной диафрагмы, величины рабочего расстояния WD (Рисунок 1.13). При уменьшении WD сканирующий конус электронов будет более широким: изображение будет с меньшей глубиной резкости. Но более длинные WD не всегда приводят к хорошему разрешению: глубина поля важна для исследования образцов с большими вариациями рельефа (топографии).

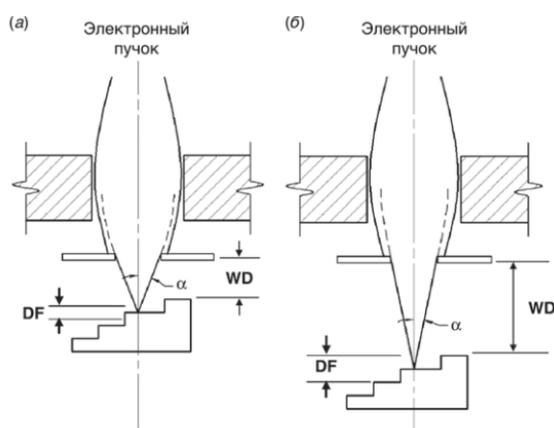


Рисунок 1.13. Зависимость глубины поля (DF) при увеличении рабочего расстояния (WD): короткое рабочее расстояние (а) и длинное рабочее расстояние (б).

Для образцов с плоскими топографиями лучше работать в режиме малых рабочих расстояний WD: можно будет достичь более высокого разрешения.

### Формирование изображения

При попадании электронного пучка на поверхность образца происходят сложные взаимодействия, возбуждающие различные сигналы, представленные выше. Детектирование этих сигналов позволяет получить СЭМ-изображения.

### Генерация сигнала

Взаимодействие электронного пучка с образцом происходит в пределах объема возбуждения, глубина которого зависит от состава образца, энергии падающего электронного пучка и угла его падения. Одним из видов взаимодействия является процесс рассеяния: упругого, при котором образуются обратнорассеянные, или отраженные электроны (ОЭ), и неупругого, при котором образуются вторичные электроны (ВЭ). ОЭ возвращаются назад к поверхности образца и выходят из нее в вакуум, сохранив свою

энергию. ВЭ – это низкоэнергетические электроны, имеющие энергии ниже 50 эВ при выходе из образца в вакуум. ВЭ возбуждаются по всему объему взаимодействия, но в вакуум могут выходить только те из них, которые находятся вблизи поверхности образца. Кроме ОЭ и ВЭ генерируется рентгеновское излучение, которое используется для изучения элементного состава образца. Также генерируются и другие виды сигналов, которые могут быть использованы для получения изображений или анализа свойств образца: Оже-электроны, катодолуминесценция, прошедшие электроны, поглощенный и наведенный в образце ток.

#### *Катушки отклоняющей системы*

Как отмечалось в предыдущих разделах, электронный пучок фокусируется в пятно зонда на поверхности образца и возбуждает различные сигналы, наблюдаемые в СЭМ. Производится регистрация величин этих сигналов подходящими детекторами, что позволяет получить информацию о свойствах образца: топографии и элементном составе. Для получения изображения пятно зонда должно перемещаться от точки к точке с помощью системы развертки. Система формирования изображения в СЭМ показана на рисунке 1.14. Чтобы сканировать поверхность образца вдоль осей X и Y, используются катушки отклоняющей системы.

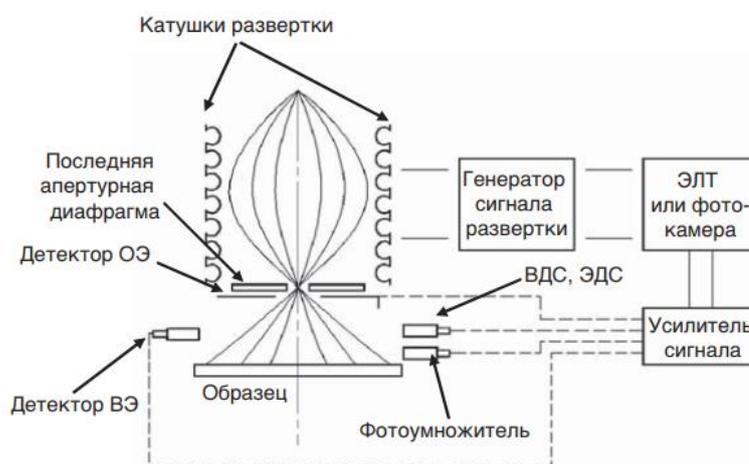


Рисунок 1.14. Формирование изображения в обычном СЭМ.

Для детектирования различных сигналов используется несколько детекторов: твердотельные детекторы ОЭ для получения изображения в режиме ОЭ, детектор Эверхарта–Торнли (ЭТ-детектор) для детектирования ВЭ и ОЭ, энергодисперсионный и волнодисперсионные рентгеновские спектрометры (ЭДС и ВДС) для регистрации характеристического рентгеновского излучения, а также фотоумножитель для регистрации катодолуминесценции. Далее детектируемый сигнал обрабатывается и

поступает в электронно-лучевую трубку (ЭЛТ) или фотокамеру, в которых осуществляется синхронизация с разверткой электронного луча на образце через генератор развертки, в результате чего на экране монитора точка за точкой формируется растровое изображение области сканирования пучка на образце.

#### *Детекторы вторичных электронов*

Изначально СЭМ разрабатывался для получения изображений и элементного анализа с помощью ВЭ, т.к. ВЭ, которые обладают низкой энергией и приходят только из поверхности образца под электронным зондом. Но эта методика получения информации о топографии и химическом составе образца имеет проблему, связанной с разработкой устройства детектирования ВЭ: детектирования очень малого тока порядка  $\sim 10^{-12}$  А низкоэнергетических ВЭ при достаточно большом быстродействии для обеспечения быстрого сканирования. На практике единственное такое устройство – это электронный умножитель: ВЭ от образца ускоряются к катоду, на котором они генерируют дополнительные ВЭ, которые далее ускоряются в направлении второго катода, где происходит дальнейшее умножение сигнала. И этот процесс повторяется от 10 до 20 раз, чтобы входной сигнал усилился для формирования изображения на экране дисплея. Эверхарт и Торнли разработали детектор для серийного выпуска СЭМ [85]. Это устройство состоит из сцинтиллятора, который преобразует электронный сигнал в свет, световода для переноса световой энергии и фото-умножителя, преобразующего световой сигнал обратно в электронный. Количество света, генерируемого сцинтиллятором, зависит от материала сцинтиллятора и энергии ударяющих в него электронов. К сцинтиллятору прикладывают напряжение 10 кВ для ускорения электронов до определённой и получения заметной вспышки света при их соударении с сцинтиллятором. Далее свет проходит вдоль световода из кварца или органического стекла, по направлению к ФЭУ, который устанавливается вне колонны и вакуума. Все устройство обладает высокой эффективностью и быстродействием и может видоизменяться для разных применений.

Схема ЭТ-детектора показана на рисунке 1.15, а, где образец помещен между объективной линзой СЭМ, а ЭТ-детектор установлен с одной стороны. Поскольку к передней поверхности сцинтиллятора прикладывается напряжение смещения +10 кВ, около него создается электрическое поле напряженностью несколько сотен вольт на миллиметр, которое притягивает ВЭ от образца и направляет их в направлении детектора.

Необходимо отметить, что при низких энергиях первичного пучка поле такой величины отклоняет первичный пучок от его оси, поэтому обычно сцинтиллятор окружают экраном Фарадея: широко растянутой металлической сеткой для экранизации первичного пучка. На экран Фарадея подается напряжение от +250 до +300 В, которое притягивает большую часть ВЭ, но недостаточно для отклонения электронного пучка. Вторичная электронная эмиссия от горизонтального образца является изотропной относительно нормали к поверхности, в направлении которой наблюдается максимальная интенсивность эмиссии. В работе [86] показано, что этот вид ЭТ-детектора обычно собирает 15–30 % всего сигнала ВЭ (низкая чувствительность), т.к. большая часть ВЭ проходит через отверстие в объективной линзе и идет назад вдоль колонны. Кроме того, асимметричное расположение данного детектора позволяет собрать только половину от всех испущенных ВЭ, т.е. электронов направленных в сторону детектора. Но этого достаточно благодаря способу, с помощью которого получается изображение, обусловленное детектированием вторичных электронов [83]. Основной недостаток конструкции (рисунок 1.15) – это то, что в детектор попадают кроме нужных ВЭ (ВЭ-I, II) и отраженные от образца, и третичные электроны (ВЭ-III), образующиеся в результате попадания отраженных электронов (ОЭ) в объективную линзу и на стенки камеры образцов. В обычных СЭМ рабочее расстояние WD обычно устанавливается в интервале 12–20 мм, так что ЭТ-детектор может быть легко размещен близко к образцу в точке над ним. В микроскопах высоко высокого разрешения рабочее расстояние WD зачастую устанавливается намного меньшим для того, чтобы повысить разрешение изображения. В таких СЭМ часто используется униполярная («шноркельная» (snorkel)) линза, которая создает большое магнитное поле на поверхности образца, который позволяет захватывать большую часть эмитируемых ВЭ и направляет их обратно через отверстие в линзе вверх вдоль колонны (Рисунок 1.15б). В данной модели имеется стандартный ЭТ-детектор, используемый при больших рабочих расстояниях WD, либо в случае наблюдения наклонных образцов.

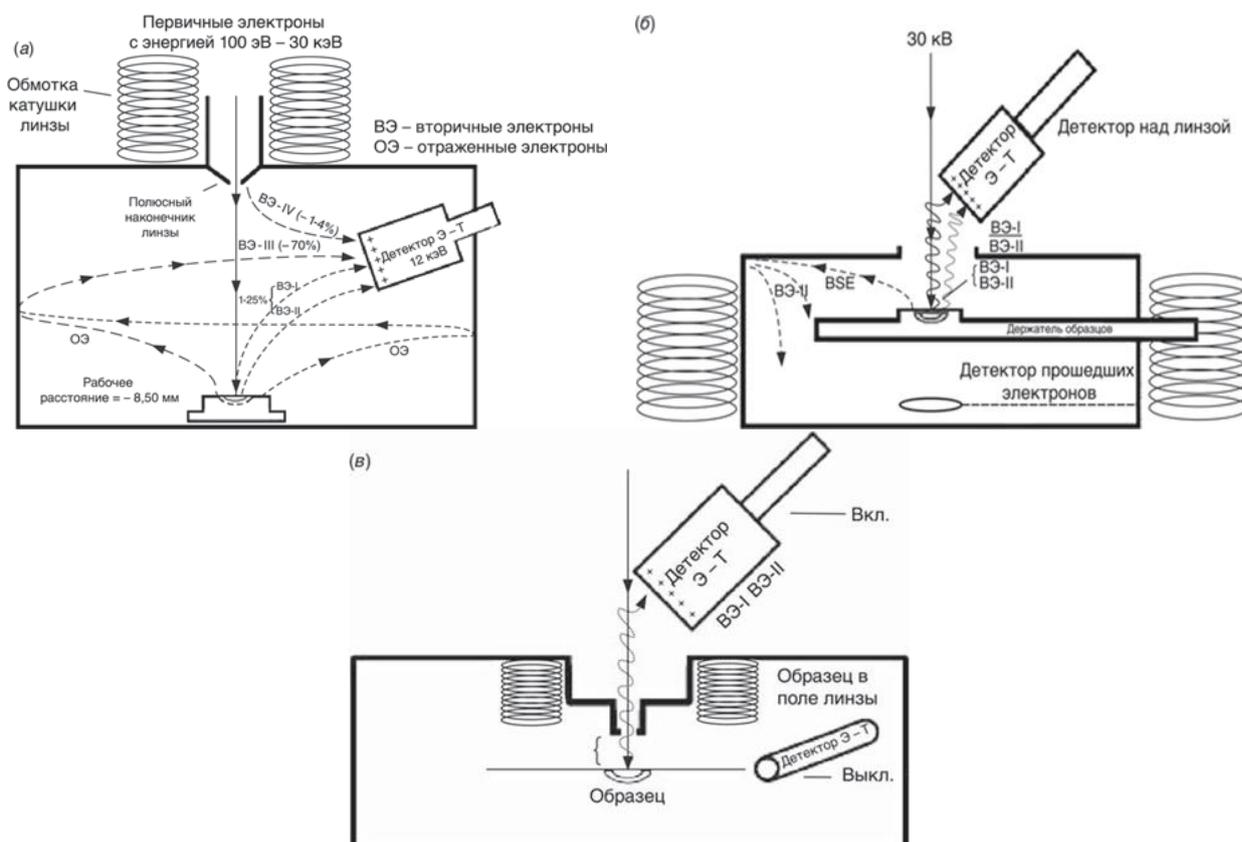


Рисунок 1.15. Три типа детекторов: обычный СЭМ (образец ниже объективной линзы) с ЭТ- детектором, расположенным под объективной линзой (а); СЭМ (образец внутри линзы типа конденсор/ объектив) с ЭТ-детектором, расположенным над линзой (б); высокоразрешающий (образец вблизи линзы) СЭМ с ЭТ-детектором, расположенным над линзой (в).

Над линзой имеется второй детектор для того, чтобы использовать сигнал ВЭ, захватываемый полем линзы [87], который устанавливается сбоку на расстоянии 10–15 мм от оси первичного пучка. В настоящее время некоторые фирмы-производители СЭМ устанавливают фильтр Вина прямо над линзой, который имеет магнитное поле ( $\vec{B}$ ), направленное под углом  $90^\circ$  к направлению электрического поля ( $\vec{E}$ ) от детектора. Электрическое и магнитное поля настраиваются так, чтобы падающий луч оставался точно на оси, проходящей через линзу. Однако возвращающиеся ВЭ отклоняются в скрещенных электрическом и магнитном полях. Если установить между областью этих скрещенных полей и детектором электроды, то оператор может направлять на сцинтиллятор электроны различных энергий таким образом, что один детектор может эффективно собирать ВЭ, ОЭ и другие электроны с промежуточными (между ОЭ и ВЭ) значениями энергии. Верхний детектор обычно собирает от 70 до 80 % от сигнала ВЭ, выходящих из образца [85]. Электроны ВЭ-III генерируются далеко от оптической оси

линзы, не собираются полем линзы и не достигают верхнего детектора. Таким образом, сигнал верхнего детектора имеет более высокий контраст и информативность, чем сигнал от нижнего детектора. Но верхний детектор чувствителен к эффектам электростатической зарядки образца, к влиянию выходных эффектов — коэффициента электронной эмиссии (который зависит, например, от химического состава, электронных свойств и зарядки образца) и менее чувствителен к топографии. Нижний детектор обладает противоположными свойствами.

В СЭМ самого высокого разрешения (также просвечивающие электронные микроскопы) образец физически находится внутри линзы и полностью погружен в магнитное поле этой линзы, поэтому единственным способом получения сигнала ВЭ является сбор ВЭ с помощью магнитного поля самой линзы [86] (Рисунок 1.15в). Свойства этого детектора такие же как у вышеописанного верхнего детектора, но в подобной конфигурации нет возможности установить ЭТ-детектор на одном уровне с образцом. Тот факт, что сигнал от детектора почти полностью состоит из вторичных электронов (электроны ВЭ-I и ВЭ-II), позволяет получать высококонтрастные изображения с высоким отношением сигнала к шуму, что оптимально для изображений с высоким разрешением. В микроскопах этого типа также обычно применяется фильтр Вина со скрещенными электрическим и магнитным полями.

#### *Химический состав образца*

Количество ВЭ и ОЭ зависит от атомного номера образца, что позволяет получать информацию о составе образца.

Яркие пятна на изображении соответствуют образцу с высоким атомным номером, что обусловлено более сильной эмиссией электронов [88].

#### *Топография образца*

Количество детектированных электронов в режиме детектирования ВЭ зависит от топографии исследуемого образца, а контраст изображения зависит также и от положения детектора. Эмиссия ВЭ будет высокой на гребнях поверхностного рельефа. На рисунке 1.16 а) показана эффективная область эмиссии ВЭ с различных участков поверхности образца. На рисунке 1.16 б) представлена изображение наноиголок ZnO, полученное при детектировании ВЭ. На остриях наноиголок наблюдается повышенная эмиссия ВЭ.

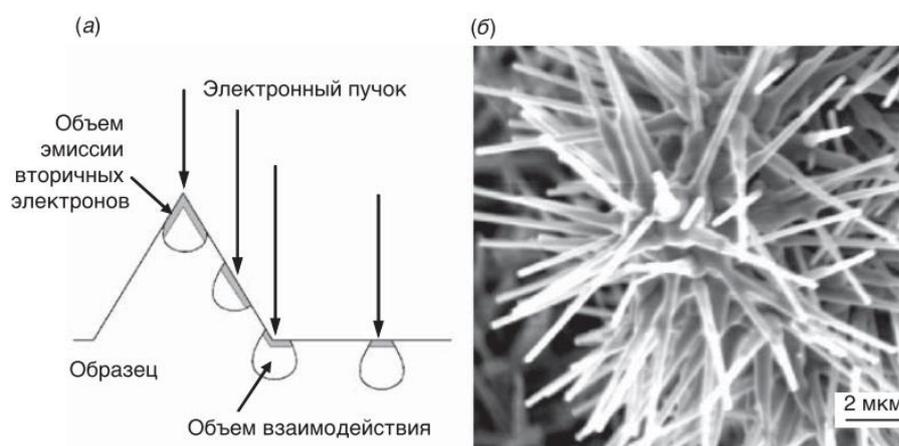


Рисунок 1.16. Усиление эмиссии вторичных электронов на острых иголках: схематическое изображение эффекта усиления эмиссии на вершине поверхностного пика (а); СЭМ изображения наноиголок ZnO — эмиссия усиливается на остриях наноиголок (б).

### *Коэффициент увеличения образца*

Коэффициент увеличения («увеличение») задается отношением линейной амплитуды развертки изображения на экране монитора к соответствующей длине линии сканирования на образце. Изменение размера области сканирования, которая контролируется катушками развертки пучка, будет приводить к изменению увеличения. Рабочее расстояние и ускоряющее напряжение электронного пучка будут также влиять на область сканирования.

### *Вакуумная система*

Для того чтобы избежать рассеяния электронного пучка и загрязнения электронных пушек и других компонентов СЭМ, требуется применение сверхвысоковакуумной системы. Для достижения требуемого вакуума применяется несколько типов вакуумных насосов. Как правило, для откачки камеры образцов, начиная от атмосферного давления, используется механический форвакуумный насос и диффузионный вакуумный насос.

Механические насосы позволяют достигать более высокого вакуума, чем  $5 \times 10^{-5}$  Торр ( $666,6 \cdot 10^{-5}$  Па). Для давлений ниже  $1 \times 10^{-2}$  Торр ( $133,32 \cdot 10^{-2}$ ) используются диффузионные вакуумные насосы.

## **1.2.2 Пробоподготовка биологических образцов**

### *Фиксация образцов и методы сушки*

Для получения необходимых характеристик электронного пучка в колонне СЭМ, пушке и камере образцов должен поддерживаться вакуум порядка  $10^{-6}$  Торр ( $133,32 \cdot$

$10^{-6}$ ). Образцы должны быть в твердом состоянии, т.е. должны подвергнуться процедуре осушения. Во время осушения на поверхность образца действуют силы поверхностного натяжения, из-за чего происходит усыхание и сжатие структур в интервале размеров от  $10^{-3}$  до  $10^{-6}$  м. Поэтому СЭМ-исследование структур с размерами 1–10 нм становится невозможным. При использовании СЭМ в биомедицинских исследованиях электронная микроскопия в основном отвечает за регистрацию топографических особенностей поверхности обработанного образца. Изучение молекулярных компонентов и структурных особенностей организмов, органов, тканей, клеток и биомолекул обычно требует химической фиксации в твердом состоянии с использованием "сшивающих" соединений для сшивания биологических макромолекул с последующей обработкой солями тяжелых металлов для увеличения удельного веса компонентов. Биологические образцы сначала "фиксируют" с помощью глутаральдегида - диальдегида, содержащего пять атомов углерода. Затем биологический образец "фиксируют" с помощью тетроксид осмия ( $OsO_4$ ), который содержит самые тяжелые элементы и, таким образом, служит для увеличения электронной плотности и улучшения рассеивающих свойств биологической пленки  $OsO_4$  также является красителем, который взаимодействует с самим собой и другими красителями. Использование красителей в сканирующей электронной микроскопии высокого разрешения не рекомендуется. Это связано с тем, что краситель связывает с мембраной еще один элемент, в результате чего наблюдаемые структуры искусственно утолщаются и их размер не может быть измерен с достаточной точностью при морфологическом разрешении 1-10 нм. При наблюдении клеточных органелл при умеренном увеличении метод окрашивания работает блестяще [89].

После фиксации водная фракция образца заменяется промежуточной жидкостью, обычно органическим растворителем, таким как этанол или ацетон, перед высушиванием. Многие растворители, такие как гексаметилдисилазан (HMDS, или ХМДС), фреон 113, тетраметилсилан (TMS, или ТМС) и PELDRI II, иногда используются для сушки на воздухе, поскольку они уменьшают величину поверхностного натяжения, вызывающего сжатие/контракцию клеток и детализацию морфологии поверхности.

Эффективным методом обезвоживания является линейно-градиентное обезвоживание. Этот метод требует переменного устройства для медленного увеличения концентрации промежуточной жидкости [90, 91] и служит для уменьшения осмотического шока и изменения формы образца.

Примерами методов подготовки образцов являются методы криосушки. Для визуализации биологически важных морфологических деталей размером 1-10 нм с помощью HREM [92] использовались методы сублимационной криосушки (СКС, или FD — freeze drying) и сушки в критической точке (СКТ, или CPD — critical point drying), которые позволяли сохранить детали биологических структур при морфологических исследованиях биологических образцов с помощью СЭМ. При фиксации образцов методом СКТ обычно используют криопротекторы (сахарозу или DMSO) для уменьшения образования кристаллов льда, которые также могут взаимодействовать с образцом. В методе СКС в качестве криопротектора лучше всего использовать этанол, который сублимируется в вакууме вместе с образовавшимся льдом.

Метод СКТ — наиболее надежный и часто используемый метод высушивания биологических образцов [93]. В этом процессе образец, подвергнутый химической фиксации и замене воды на промежуточную жидкость, заменяется переходной жидкостью, такой как жидкий диоксид углерода ( $\text{CO}_2$ ), который претерпевает фазовый переход в газообразное состояние в камере под высоким давлением. Контролируя скорость потока газа и температуру переходной жидкости, можно минимизировать линейную усадку и сжатие образца; имеет смысл использовать метод СКТ в качестве метода пробоподготовки для всех исследований гигантских образцов в ВРСЭМ, но метод СКС может быть более эффективным для молекулярных изолятов.

#### *Нанесение металлических покрытий*

Биологические образцы в основном состоят из элементов с низким атомным весом и, естественно, имеют низкие коэффициенты вторичной и отраженной электронной эмиссии при возбуждении электронным пучком. Кроме того, образцы на основе углеводов являются диэлектриками и часто заряжаются при облучении пучком электронов. С самого начала проведения СЭМ-исследований биологических образцов использовался метод вакуумного испарения драгоценных металлов на образцы для придания им электропроводности. Такие металлы делают образец проводящим, но тепло, излучаемое при напылении, приводит к тому, что горячий металл впечатывается в поверхность образца.

Магнетронное осаждение таких металлов (золото, серебро, золото/палладий, платина) в атмосфере аргона уменьшает повреждение поверхности биоорганических образцов, но все равно украшает структуру крупными зернами металлической пленки

неоднородной толщины. Наличие крупных зерен благородных металлов увеличивает эффект рассеяния первичных электронов, что приводит к увеличению коэффициента эмиссии вторичных электронов и появлению вторичных электронов типа ВЭ-II и ВЭ-III.

В отличие от эффектов декорированных металлических пленок, очень мелкозернистые металлы (Cr, Ti, Ta, Ir, W) имеют очень низкую подвижность, а размер зерен пленок является моноатомным [94]. Эти металлы даже образуют "покрытия", а не "декоры", поскольку атомарные зерна остаются вблизи осаждаемой области и образуют ультратонкие сплошные пленки с малой "критической" толщиной, часто  $\leq 1$  нм [95]. Мелкая зернистость этих металлов значительно увеличивает коэффициент эмиссии вторичных электронов первого типа ВЭ-I, что обеспечивает высокое разрешение, поскольку рассеяние первичных электронов в металлической пленке ограничено. Поскольку пленка образует равномерное покрытие толщиной 1-2 нм по всему контуру образца, полученные изображения демонстрируют отличное морфологическое разрешение с высокой точностью до нескольких нанометров [95,96].

Высокоразрешающая визуализация ВЭ-I типа диафрагмальных фенестр ("окон") из кровеносных капилляров была проведена с использованием процедур фиксации и тщательной сушки в критической точке (СКТ) для сравнения данных, полученных с помощью просвечивающей растровой электронной микроскопии (ПРСЭМ) при низком напряжении (*LV - low voltage*) 25 кВ [97]. Фенестры — это "окна" в капиллярах шириной 50-60 нм, окаймленные тонкими нитевидными отверстиями и сгруппированные (как пластинчатые сита) в тонкой, сокращенной цитоплазме эндотелиальных клеток капилляров [98].

Объект с размером 0,5 мкм на изображении соответствует структурной детали образца размером 10 нм и находится в пределах разрешения, обеспечиваемого сигналом вторичных электронов типа I ВЭ-I (рисунок 1.17). На рисунке заметно точное отображение многочисленных диафрагмированных фенестров размерами 50–60 нм. Массивные образцы надпочечников, установленные в объектив автоэмиссионного СЭМ, дают изображения с различным соотношением ВЭ-I и ВЭ-II, в зависимости от природы осажденной металлической пленки [90, 96, 99]. При большом увеличении изображения, содержащие детали морфологии поверхности размером 1-10 нм, равномерно покрытой пленками Cr, сохраняют контраст с преобладанием ВЭ-I; изображения, полученные методом ВРСЭМ (рисунок 1.18), показывают, что после напыления металлической

пленки Au/Pd (60%/40%) толщиной 3 нм в ней появляются оградopodobные показывает протоковые клетки, расположенные в поверхностном просвете аденокортикальных эндотелиальных клеток. Рельеф поверхности пленки влияет на приводят к неточности передачи формы фенестральных окон и общей потери контраста частиц размерами 1–10 нм. На таких изображениях невозможно различить морфологические детали с характерными размерами 1-10 нм из-за отсутствия информации высокого разрешения от электронов ВЭ-I и того, что частицы пленки размером 3 нм вызывают значительное рассеяние электронов, что приводит к появлению большого сигнала вторичных электронов второго типа ВЭ-II.

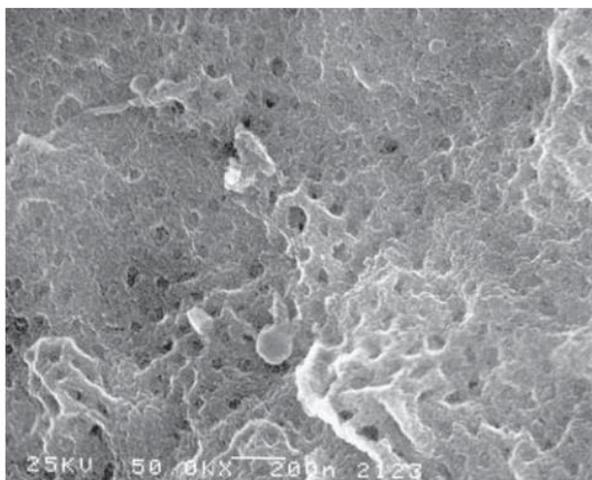


Рисунок 1.17. Изображение капиллярной поверхности люминальных клеток, покрытой пленкой хрома толщиной 2 нм при среднем увеличении (25 кВ).

Образцы аденокортикальных капилляров в виде тонких срезов при просмотре в режиме низковольтной просвечивающей сканирующей электронной микроскопии ПСЭМ (рисунок 1.19) демонстрируют тонкие нитевидные поперечные фенестрированные отверстия размером примерно 50-60 нм, аналогичные тем, которые наблюдаются на изображениях, полученных с помощью обычной просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). На рисунке отмечается недостаточный топографический контраст или недостатки в изображении деталей поверхностных частиц, однако в этом случае при интерпретации трехмерных контуров фенестрированной стенки наблюдается незначительный топографический контраст.

СЭМ изображения платиновых реплик, полученных с крио-слайдов, при фотографическом увеличении позволяют предположить, что контуры ограждающей стенки имеют симметрию восьмого порядка, однако попытки сфотографировать

непосредственно форму самой ограждающей стенки не увенчались успехом, и ценность полученных СЭМ изображений ограничена [98, 99].

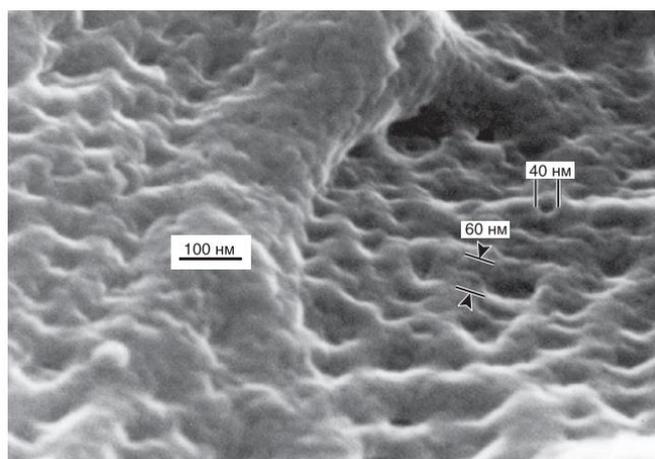


Рисунок 1.18. Изображение люминальной капиллярной поверхности, декорированной пленкой Au/Pd толщиной 3 нм (25 кВ) с большим увеличением.

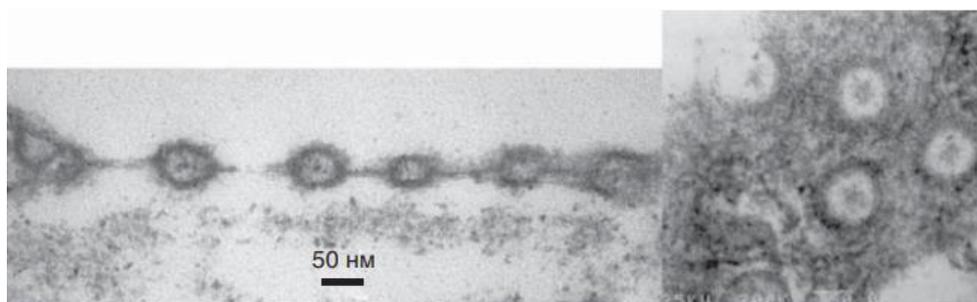


Рисунок 1.19. Изображение поперечного и продольного срезов фенестр, полученное в низковольтном (25 кВ) ПСЭМ.

На рисунке 1.20 представлено изображение образца (200 000x), покрытого пленкой Cr толщиной 2 нм, на котором непосредственно видно пластинчатое сито, содержащее цветочные фенестрированные отверстия размером ~50 нм; четко видны сферические поверхностные структуры с характерными размерами в пределах 5 нм. Этот образец был получен методом сублимационной сушки объемного образца и напыления пленки хрома. видны разнообразные формы фенестральных проемов, напоминающих соцветия, расположенные на диафрагме и центральной плотности; контраст во вторичных электронах типа ВЭ-1 дает возможность непосредственного наблюдения макромолекулярных морфологических деталей размерами 1–10 нм; эти структуры частиц, возможно, представляют эктодомены мембраны, которые сжимаются на атомном уровне вследствие удаления гидратной оболочки в процессе высушивания образца в критической точке.

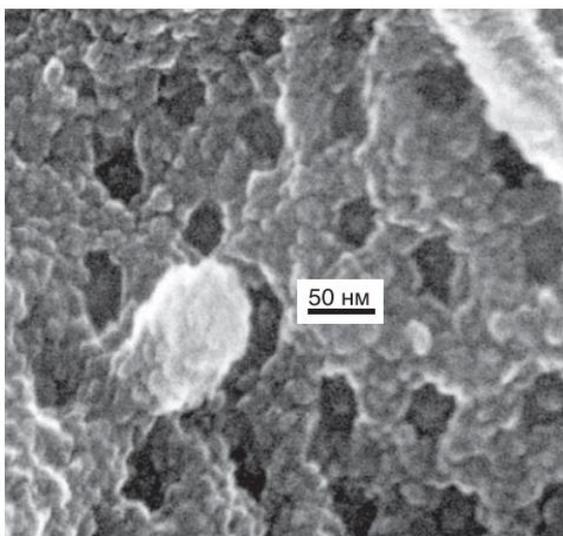


Рисунок 1.20. Изображение фенестральной поверхности клеток эндотелия, покрытой пленкой хрома толщиной 2 нм (25 кВ).

### 1.2.3 Низкокиловольтная сканирующая электронная микроскопия

Напряжения, характерные для низкокиловольтной СЭМ, находятся в диапазоне ниже 5 кВ. Нижний порог — это минимальное значение напряжения, при котором можно получить удовлетворительное изображение. Благодаря появлению конструкций колонн с предлинзовыми детекторами ВЭ и использованию электростатических линз нижний порог стал равным 100 В. В последнее время используется новая разработка — система Gentle Beam, которая позволяет использовать тормозящее поле для уменьшения энергии падающих на образец первичных электронов. В такой системе прилагается отрицательный потенциал ( $V_b$ ) к образцу и при этом получается замедляющее поле между образцом и заземленным электродом над ним. Тогда энергия падающих на образец электронов  $E_L$  равняется:

$$E_L = E_0 - eV_b,$$

где  $E_0$  — энергия первичных электронов пучка.

Природа взаимодействий электронов с образцом определяется энергией падающих электронов  $E_L$ . Предельное разрешение сверхнизковольтного СЭМ определяется свойствами зондо-формирующих линз и катодных линз [100]. Самое высокое разрешение изображения получают, когда используют предлинзовые детекторы электронов в качестве детекторов ВЭ, в которых прикладывается сильное магнитное поле, выходящее в камеру образцов, либо умеренное электростатическое поле. Это поле используют для сбора ВЭ низких энергий, которые обеспечивают получение изображения высокого разрешения. В наиболее совершенных конструкциях микроскопов предлинзовый

детектор может быть настроен на режим сбора исключительно, например, сигнала ВЭ [83]. В работах (Boyes, 1994, 1998) по микроскопии и микроанализу отмечается, что «использование низких напряжений для получения рентгеновских данных для элементного химического микроанализа значительно улучшает относительную чувствительность для поверхностных слоев, микрочастиц и легких элементов». Слабая генерация рентгеновского сигнала может быть частично скомпенсировано улучшением геометрии системы. Необходимо достигнуть превышение на 20-40 % критической энергии возбуждения (либо достигалась величина «перенапряжения»  $U$  в диапазоне  $1,2 \text{ кВ} < U < 1,4 \text{ кВ}$ ). Но это является ограничением для анализа неизвестных элементов величиной ускоряющего напряжения, равной примерно 6 кВ. Например, ускоряющее напряжение в 5 кВ недостаточно для исследования I, Cs и Ba. Основные легкие элементы (В – F) могут анализироваться при ускоряющих напряжениях 1,5 кВ [101].

#### *Генерация электронов и ускоряющее напряжение*

В СЭМ с использованием низкокиловольтного режима работы, т.е. при низком ускоряющем напряжении, но с требованием получать изображения с высоким разрешением (в случае современных серийных моделей СЭМ высокое разрешение должно быть лучше 2 нм), электронный пучок формируется следующими двумя способами полевой эмиссии: термополевая и холодная полевая эмиссия. Источником электронов для полевой эмиссии является острый катод из кусочка вольфрама, имеющий радиус закругления острия менее 100 нм. При этом падение напряжения будет сосредоточено на этом малом остри, что приводит к возникновению большой напряженности электрического поля.

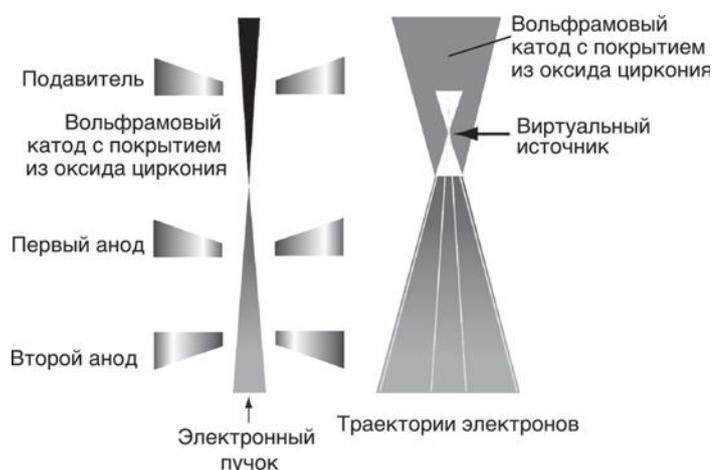


Рисунок 1.21. Электронная пушка с полевым катодом Шоттки (из литературы фирмы «Карл Цейсс SMT»).

Если к острию приложить отрицательный потенциал 3–5 кВ относительно первого анода, то электрическое поле  $E$  на острие будет высоким ( $E > 10^7$  В/см): потенциальный барьер для выхода электронов из катода уменьшается в результате эффекта Шоттки (рисунок 1.21). Это приводит к тому, что электроны покидают катод без его нагревания. Полевой эмиттер может обеспечить получение очень высокой плотности тока катода ( $10^5$  А/см<sup>2</sup>) (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение источников электронов (из литературы фирмы «Карл Цейсс»)

Сравнение рабочих характеристик источников электронов				
Тип эмиттера	Термо-электронный катод	Термо-электронный катод	Полевой катод (холодная полевая эмиссия)	Термополевой катод (катод Шоттки)
Материал катода	W	LaB <sub>6</sub>	W (310)	ZrO/W (100)
Рабочая температура (К)	2 800	1 900	300	1 800
Радиус катода (нм)	60 000	10 000	≤100	≤1 000
Эффективный радиус источника (нм)	15 000	5 000	2,5*	15*
Плотность тока эмиссии (А/см <sup>2</sup> )	3	30	17 000	5 300
Полный ток эмиссии (мкА)	200	80	5	200
Нормированная яркость (А/(см <sup>2</sup> · ср · кВ))	1×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>
Максимальный ток пучка (нА)	1 000	1 000	0,2	10
Разброс энергии на катоде (эВ)	0,59	0,4	0,26	0,31
Разброс энергии на выходе из пушки (эВ)	1,5–2,5	1,3–2,5	0,3–0,7	0,35–0,7
Шум пучка (%)	1	1	10	1
Дрейф тока эмиссии (%/ч)	0,1	0,2	5	<0,2
Минимальное рабочее давление (ГПа)	≤1×10 <sup>5</sup>	≤1×10 <sup>6</sup>	≤1×10 <sup>10</sup>	≤1×10 <sup>8</sup>
Срок службы катода (ч)	200	1 000	> >2 000	> >2 000
Регенерация катода	Не требуется	Не требуется	Каждые 6–8 ч	Не требуется
Чувствительность к внешним воздействиям	Минимальная	Минимальная	Высокая	Низкая

\* виртуальный источник.

В полевом эмиттере электроны испускаются из очень малого «виртуального источника» ( $\sim 10$  нм) при большом половинном угле (почти  $20^\circ$  или около  $0,3$  рад), который позволяет получить высокий ток на единицу телесного угла, высокой яркости [83]. Второй анод используется для ускорения электронов.

#### Применение низких ускоряющих напряжений

Первой и наиболее важной причиной применения низкокиловольтного режима является уменьшение полученного образцом наведенной электронным пучком заряда. Обычно производится напыление проводящего покрытия на образцы, которые не проводят электрический ток. Если заряд на образце становится достаточно большим, то в результате может происходить даже отражение первичного электронного пучка от заряженного образца. Это происходит, когда заряд образца превышает заряд первичного пучка (например, если ускоряющее напряжение первичного пучка равно  $2,5$  кВ, а заряд на образце дает  $20$  кВ). Использование низких ускоряющих напряжений уменьшает объем взаимодействия пучка. Джой и Ньюбери [102] заметили, что по мере снижения энергии ( $E_0$ ) первичного пучка длина свободного пробега электронов ( $R$ ) существенно падает ( $R \sim k \cdot E_0^{1,66}$ ). Такое уменьшение объема взаимодействия приводит к тому, что сигнал ВЭ получают из более близких к поверхности слоев образца. Получение сигнала из приповерхностных областей позволяет извлекать больше информации от самой поверхности. Работа в режиме низких ускоряющих напряжений улучшает качество изображения образцов с низким атомным номером (с низким  $Z$ ). При низких ускоряющих напряжениях глубина проникновения электронов в материал с низким  $Z$  намного меньше, чем при высоких ускоряющих напряжениях. Т.к. объем взаимодействия становится ближе к самой поверхности, ВЭ (т. е. все эмитируемые из образца электроны с энергией ниже  $50$  эВ) имеют большую вероятность выхода из образца по сравнению с вероятностью поглотиться самим образцом. Электроны ВЭП дают изображение с несколько более низким разрешением по сравнению с тем разрешением, которое получают при использовании большего числа электронов ВЭИ [83]. Глубина генерации сигналов от ВЭ и ОЭ становится одинаковой: разрешение изображения будут сближаться друг с другом. Сигнал ВЭ будет расти соответственно с сигналом ОЭ и начнет превышать его, и при некоторой критической энергии заряд перестанет рассеиваться в образце. Когда в области энергий примерно от  $150$  до  $700$  эВ глубина пробега первичных электронов достигнет глубины выхода ВЭ, краевой эффект

исчезнет вместе с усилением сигналов на наклонных гранях. Соответственно, изображения станут более гладкими: понижается объемность изображения. Топографический контраст станет более чувствительным к поверхности, и детали рельефа с размерами, сравнимыми с половиной диаметра области взаимодействия, будут выглядеть более светлыми. Поверхностные пленки толщиной около половины объема взаимодействия (либо более тонкие пленки) начнут выглядеть прозрачными, включая островки примесей в них [103].

Реальная практика применения пониженных ускоряющих напряжений не сильно отличается от случая использования высоких ускоряющих напряжений. Но необходимо принять во внимание несколько вопросов: подготовка образца и подготовка микроскопа.

Если сам образец непроводящий, то его пробоподготовка заключается в выборе: будет наноситься на образец проводящее покрытие, либо нет. Пользователю также следует рассмотреть, какой тип анализа будет выполняться либо какой тип изображения он будет получать на данной системе. Часто пользователям приходится делать выбор типа крепления того образца, который они хотят исследовать. Следует решить, будет ли дальнейшее исследование образца после его изучения в СЭМ проводиться другими методами либо это будет разрушающий анализ? Является ли целью исследования получение изображения со сверхвысоким разрешением либо для данного проекта подойдет получение изображения со средним разрешением? Зачастую ответы на все эти вопросы будут зависеть от того, какой способ крепления и подготовки образца выбрал данный пользователь.

Для того чтобы закрепить образец, может быть предложено несколько способов. Для получения изображения с высоким разрешением пользователю необходимо выбрать механически устойчивую конструкцию крепления и не использовать клейкие ленты и пьедесталы с газовыделением в вакууме. Хорошими креплениями образцов является углеродный клей или серебряная паста, но они требуют больше времени для крепления образцов. Существуют различные механические держатели образцов, например, тисочки и держатели с пружинным прижимом для массивных типов образцов.

Вопрос напыления на образец покрытия является дискуссионным и связанным с вопросами: произвести ли напыление; какое покрытие следует напылить, что зависит часто от типа напылителя. Есть проблема, связанная с неопределенностью толщины слоя покрытия, которая может привести к затенению деталей поверхности образца, которые

можно было бы увидеть на низких ускоряющих напряжениях. Для получения изображений при низких ускоряющих напряжениях и низких токах зонда необходимо провести некоторые операции с электронно-оптической колонной микроскопа: юстировка электронной пушки, фокусировка, коррекция астигматизма и настройка апертурной диафрагмы; юстировка конденсорной линзы, апертурной диафрагмы, установление напряжения смещения на образце, а также выполнение других настроек, которые могут повлиять на величину энергии электронов, попадающих на образец. Для того чтобы пользоваться микроскопом в режиме низких ускоряющих напряжений и получать при этом изображения наилучшего качества с высоким разрешением, важно хорошо знать органы управления системой, а также параметры, которые необходимо контролировать для получения требуемого типа изображения, позволяющего поведать нам историю данного образца. Часто наилучшим вариантом перед началом работы является запрос необходимой информации у фирмы-изготовителя.

При исследовании неизвестного образца, такого, которого пользователь раньше никогда не исследовал, хорошей идеей является выбор некоторой стартовой точки. Зачастую это либо установка набора рабочих условий, аналогичных тем, которые оператор использовал, исследуя аналогичный образец, либо выбор такой конфигурации, с которой пользователю удобней всего работать при данных рабочих характеристиках своего микроскопа. Для работы с автоэмиссионным СЭМ при низких ускоряющих напряжениях хорошо выбрать ускоряющее напряжения порядка 1 кВ. Если пользователь знает, что ему потребуется выполнить рентгеновский микроанализ, то такой уровень «низкого ускоряющего напряжения» может быть нежелателен. Всегда хорошо задаваться вопросом, является ли образец проводящим или нет? Является ли он радиационно-чувствительным либо чувствительным к электростатической зарядке? Такого типа вопросы также влияют на начальные параметры настройки микроскопа. Если образец является чувствительным к электростатической зарядке либо чувствителен к облучению пучком электронов высокой энергии, то часто пользователю приходится снижать ток зонда. В большинстве систем это делается путем изменения тока возбуждения конденсорной линзы. В микроскопах определенной конструкции изменения тока возбуждения конденсорной линзы не производится, и зачастую все, что для этого требуется, это введение диафрагмы с меньшим диаметром отверстия. Как только будет установлена точка отсчета для начальных настроек, а образец будет приготовлен и

установлен в микроскопе, пользователь может начинать поиск наилучших условий для получения изображения данного образца. Это относительно неблагодарный процесс, заключающийся в большом количестве проб и ошибок. Если изображение выглядит не совсем хорошо, то с самого начала необходимо принять решение, следует ли повышать либо понижать ускоряющее напряжение. Как только это решение будет принято, оператор может начинать экспериментировать с настройками высокого напряжения до тех пор, пока не будет достигнуто равновесное состояние. Эксперимент заключается в изменении величины высокого напряжения и наблюдении, как при этом будет изменяться изображение образца. Если в результате повышения либо понижения ускоряющего напряжения зарядка образца увеличилась, оператор должен изменить направление своих поисков и найти точку, которая лежит посередине между начальной и конечной точками настройки. Если настройки, выполняемые оператором, не привели к получению лучшего результата, то он может решить, двигаться ли ему к точке, которая находится выше либо ниже начальной точки на величину изменения настройки высокого напряжения (например, 1; 0,5; 0,75 и 1,5 кВ). Если окажется, что изменение настроек привело к отрицательному заряду, то потребуются просто повысить ускоряющее напряжение, а если заряд оказался положительным, то ответным действием будет понижение ускоряющего напряжения. Часто небольшое различие в ускоряющем напряжении может привести к достижению баланса электрического заряда. Хороший пример иллюстрируется на рисунках 1.22 и 1.23. На этих изображениях показаны ненапыленные латексные сферы. Различие в ускоряющем напряжении составляло всего 390 В. Эта точка зарядового равновесия была найдена путем ступенчатого изменения ускоряющего напряжения шагами по 10 В до полного исчезновения зарядки образца. Часто этот метод проб и ошибок является циклическим процессом, который в конечном счете приводит к установлению зарядового равновесия в образце. Иногда для достижения зарядового равновесия также может потребоваться уменьшение тока пучка. Если эту точку равновесия трудно найти, то ответ на вопрос, как получить изображение образца, может заключаться в нанесении на него, при возможности, проводящего покрытия. На рисунках 1.24 и 1.25 показано, как небольшой слой напыления может существенно улучшить изображение, не оказывая влияния на сам образец. Другим параметром, который часто влияет на зарядовый баланс образца и который следует учитывать, является время задержки пучка на образце. Время задержки зачастую

будет оказывать влияние на зарядовый баланс на образце. Чем короче время задержки, тем лучше это для образца, который является непроводящим, либо имеет очень низкую проводимость. Недостатком использования более короткого времени задержки является снижение уровня сигнала, производимого в результате взаимодействия пучка с образцом. Когда дальнейшее сокращение времени задержки приводит к получению изображения, которое будет оцениваться как непригодное для иллюстрирования характеристик данного образца, пользователю потребуется найти соответствующий способ улучшения получаемого изображения. Как правило, это потребует учета функциональных особенностей конкретного используемого микроскопа. Многие системы имеют возможность снижения шумов. Это происходит, когда изображение фильтруется посредством усреднения по многим кадрам развертки для снижения шумов, появляющихся в результате низкого уровня сигнала изображения.

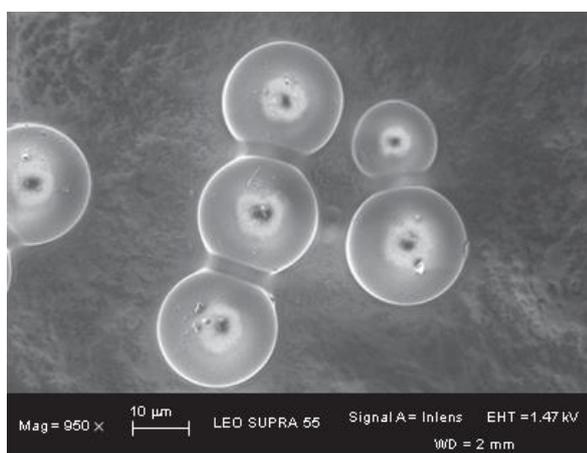


Рисунок 1.22. Латексные сферы без напыления при ускоряющем напряжении 1,47 кВ.

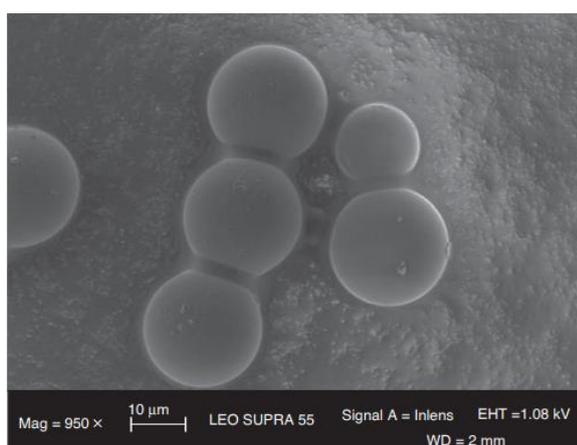


Рисунок 1.23. Латексные сферы без напыления при ускоряющем напряжении 1,08 кВ.

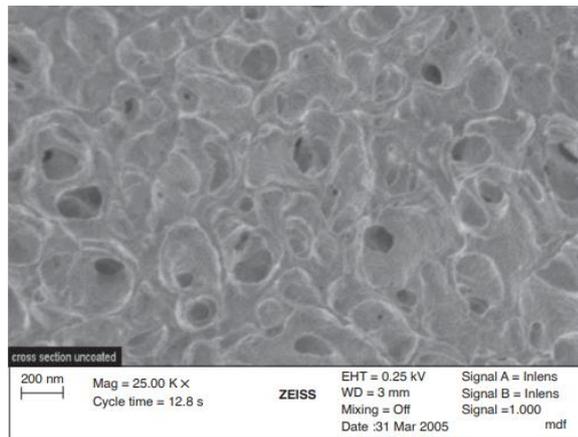


Рисунок 1.24. Изображение ненапыленного образца фильтра с ускоряющим напряжением 0,25 кВ.

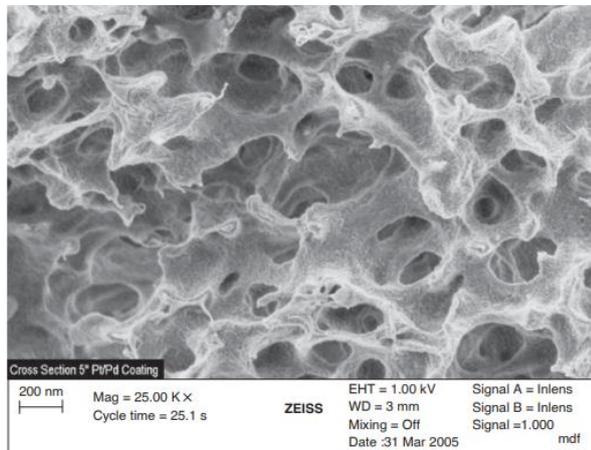


Рисунок 1.25. Изображение образца фильтра, подготовленного путем напыления слоя Pt/Pd в течение 5 с при ускоряющем напряжении 1 кВ.

Использование СЭМ при низких ускоряющих напряжениях является рабочим режимом, с которым пользователи боятся работать. Этот режим позволит выявить новые интересные особенности и поможет пользователям открыть новые свойства своих наноматериалов, скрытые ранее в результате использования слишком высоких ускоряющих напряжений, слишком большой глубины проникновения пучка и применения СЭМ высокого разрешения. Доктор Оливер Уэллс в выпуске журнала «Микроскопия сегодня» за май/июнь 2002 г. написал о принципе Джека Рамси (Jack Ramsey): «Не существует лучшего пути сделать что-либо» [104]. Это очень справедливое утверждение, и будет прав тот, кому придет в голову идея проведения исследований методом СЭМ при пониженных ускоряющих напряжениях. Низкое ускоряющее напряжение не всегда является правильным решением при попытке получения изображения наилучшего качества для любого образца. Образцы зачастую дают пользователю ключ к пониманию того, в каком направлении следует двигаться для

получения изображения наилучшего качества и наилучших условий для проведения анализа. Исследователи должны быть внимательными при поиске путеводной нити к выбору режимов исследований, уделять исследованию данного образца определенное время, и хорошо знать органы управления и рабочие характеристики своих моделей СЭМ. Такое хорошее знание своего оборудования позволит им использовать взаимосвязи в электронной микроскопии с тем, чтобы получать такие результаты, которые лучше всего могут рассказать об истории их образцов и методах их исследований. И в конце концов, следует отметить, что СЭМ — это инструмент, который невидимое делает видимым. Без опыта и понимания взаимосвязей полученные результаты не помогут выявить весь тот мир, который был скрыт в образце.

### **1.3. Моделирование эмиссионных характеристик катодов в электронно-оптических системах**

Для решения задач увеличения разрешающей способности электронных микроскопов необходимо проводить большое количество дорогостоящих и затратных по времени и другим ресурсам экспериментальных работ по модификации электронно-оптических систем микроскопов (ЭОСМ). Для оптимизации ресурсов есть возможность применения методов математического моделирования процессов, происходящих в ЭОСМ. А для решения модельных задач возможно использовать численные методы и доступные программные обеспечения.

Впервые математическая модель автоэлектронной эмиссии была построена Фаулером и Нордгеймом в 1928–29 гг. Полевая электронная эмиссия (ПЭЭ) — это эмиссия электронов с поверхности металла при низких температурах под воздействием внешнего электрического поля. Данное явление было объяснено благодаря появлению теории квантово-механического туннельного эффекта [105–107].

Математическое описание реальных явлений невозможно без упрощающих предположений. Модель Фаулера-Нордгейма (ФН) основывается на следующих предположениях: 1) задача ставится одномерная, т.е. поверхность раздела металл-вакуум считается плоскостью. Потенциал зависит только от расстояния от поверхности металла  $x$ :  $U = U(x)$ , т.е. внешнее поле считается однородным; 2) внутри металла —  $U(x) = -const$ , вне металла —  $U = -\frac{e^2}{4x}$ ; 3) прозрачность барьера вычисляется с помощью метода Вентцеля, Крамерса, Бриллюэна. 4) в качестве модели металла выбирается

зоммерфельдовская модель свободных электронов в потенциальном ящике, образующих вырожденный газ, подчиненный распределению Ферми-Дирака; 5) температура  $T = 0\text{K}$ .

Зависимость плотности тока пучка в зависимости от напряженности внешнего электрического поля  $E$  в теории ФН имеет вид:

$$j = aE^2 \exp\left(-\frac{d}{E}\right), \quad (1.1)$$

где  $a$  и  $b$  константы. Из уравнения следует, что "заметная" полевая электронная эмиссия может иметь место только при электрических полях с напряженностью не менее  $E = 10^9 \text{ В/м}$ , когда можно ожидать плотности тока  $j = 10^{10} \text{ А/м}^2$ .

В 1937 году Мюллер изобрел электронный микроскоп — проектор. Основным элементом микроскопа является источник электронного пучка — полевой электронный катод. Мюллер предложил форму катода сделать в виде очень тонкого острия с радиусом кривизны при вершине 1 мкм. Придание катоду формы острия дала возможность получить интенсивную эмиссию при небольших напряжениях порядка 1–10 кВ, под воздействием теоретически предсказанного электрического поля с напряженностью  $10^9 \text{ В/м}$ . Дальнейшее развитие исследований острийных катодов привели к реализации на их основе ионных источников и применение этих структур как приемников (детекторы, датчики) электромагнитного излучения и заряженных частиц [107–110].

Теория ПЭЭ ФН весьма удовлетворительно описывает реальное явление — эмиссию электронов с поверхности металла под воздействием сильного внешнего электрического поля. Экспериментальные данные показали, что вольт-амперные зависимости являются линейными. Таким образом, наблюдается соответствие экспериментальных результатов с теоретическими выводами Фаулера и Нордгейма. Но эти работы были проведены для относительно небольших величин эмиссионных токов и электрических полей ( $\ll (4 - 5) \cdot 10^9 \text{ В/м}$ ).

Исследования ПЭЭ в области больших плотностей тока и сильных электрических полей впервые были начаты группой Дайка [111–113]. В импульсном режиме на вольфрамовых катодах были достигнуты плотности тока  $10^{10} \text{ А/м}^2$  и несколько позднее в стационарном до  $10^{11} \text{ А/м}^2$ . А значение электрического поля имело диапазон  $(5 - 8) \cdot 10^9 \text{ В/м}$ .

В этой области группа Дайка обнаружила заметное отклонение от линейной зависимости  $\ln\left(\frac{j}{U^2}\right)$  и  $\frac{1}{U}$  ФН в сторону меньших токов. Дайк и Тролан объяснили

нарушение линейности влиянием пространственного заряда электронов пучка, электрическая напряженность поля которых ослабляла напряженность внешнего электрического поля вблизи поверхности катода. Вслед за исследованиями группы Дайка появилась первая теоретическая работа [114], посвященная влиянию пространственного заряда на автоэлектронную эмиссию. Задача была решена на основе плоского диода; построена модель, включающая в себя уравнения Пуассона, ФН. Получено выражение для плотности тока, соответствующее закону Богуславского-Ленгмюра. При анализе полученных теоретических результатов выяснилось, что теоретическая кривая при увеличении напряжения начинает отклоняться в сторону меньших токов и приближается к закону Богуславского-Ленгмюра.

В работе [115] отклонение от линейности вольт-амперной зависимости в области больших токов интерпретировали иначе: существованием отличия истинного потенциального барьера от потенциала сил изображения, которое становится заметным в сильных электрических полях. Авторы установили, что прозрачность потенциального барьера уменьшается из-за ослабления сил изображения на расстоянии от поверхности металла  $\sim 3 \text{ \AA}$ . При больших полях различие проявляется сильнее.

Существуют аналитические решения задачи об электрическом поле вблизи острия, когда поверхности катодов аппроксимируются сферой [116] для случая острейного катода или цилиндром для лезвийных катодов. Также построены аналитические решения для катодов, смоделированных параболоидом и гиперболоидом вращения [117–119], сильно вытянутыми эллипсоидами вращения, конусом с проводящей сферой на вершине [120].

В настоящее время исследования проводятся и для электронных пучков полевых электронных катодов (ПЭК) с электронами с релятивистской скоростью. Так в работе [121] разработан и использован метод определения структуры релятивистских электронных пучков и с его помощью выявлены изменения структуры, происходящие с изменением удерживающего релятивистский электронный пучок магнитного поля. Исследованы амплитудно-частотные характеристики колебаний пространственного заряда релятивистского электронного пучка в широком интервале частот и дано объяснение их природы с учетом коллективного движения электронов в азимутальном и аксиальном движении. В работе [121] структуру релятивистского электронного пучка связывают с колебаниями пространственного заряда.

При расчете эмиссионных характеристик ПЭК обычно возникают трудности при решении уравнений движения и уравнений для электрического поля. Также представляют сложности трудоемкие вычисления. В работе [121] разработана программа и различные алгоритмы нахождения плотности пространственного заряда и методы быстрого расчета для разрешения этих трудностей.

В последние годы модифицируются и сами полевые катоды. Появились матричные полевые эмиттеры, состоящие из многоострийных систем инжекции [122,123]; полевые катоды с формой усеченного конуса с торцом в виде кратера со сглаженной кромкой и плоским дном, полученные с помощью ионной микрообработки [124]. При такой конфигурации увеличивается яркость.

В [125] исследуется влияние пространственного заряда на вольт-амперные характеристики (ВАХ) матриц полевых электронов. Матрица представлена в виде плоской сетки с регулярными круглыми отверстиями, соосными острийным катодам, кончики которых лежат в плоскости сетки. Строилось аналитическое решение задачи исследования пространственного заряда, которую разделили на две части: 1) область между сеткой и анодом; 2) вблизи эмиттирующего острия каждой ячейки матрицы. Первая проявляется через соответствие ВАХ закону Чайлда, вторая — ослаблением поля на поверхности острия и подавлении эмиссии, и расхождение ВАХ от закономерности ФН объясняется уменьшением поля на кончике острия и отражением электронов от виртуального катода.

ПЭК обычно моделируют плоским диодом. Например, как было указано выше, теория ФН была разработана на основе приближенного решения уравнения Шредингера в однородном электрическом поле, когда поверхность раздела металл-вакуум считалась плоскостью. Также аппроксимирование плоским диодом на основе ПЭК используется при расчетах основных эмиссионных характеристик плотноупакованных матричных полевых эмиттеров, которые в последнее время получили широкое применение в различных областях техники.

Теоретические исследования движения электрона в поперечном магнитном поле плоского диода были проведены еще С.Я. Брауде [126, 127]. В работах Брауде исследовались такие характеристики плоского диода, находящегося под воздействием внешнего магнитного поля, как распределение потенциала, распределение плотности заряда, длина волны пролетных колебаний и другие характеристики диода при различных

режимах работы плоского диода. Величины, характеризующие плоский диод, были получены как результаты применения математической модели, состоящей из системы уравнений: уравнение движения, уравнение Пуассона и уравнение непрерывности. В результате расчетов, проведенных в работе [128], получена ВАХ плоского диода, помещенного во внешнее магнитное поле, которая имеет S-образную форму. А S-образную форму ВАХ, как известно, имеют электронные приборы с отрицательным дифференциальным сопротивлением. Такая форма показывает, что при одном и том же приложенном напряжении  $U$  диод может находиться в трех состояниях, которые характеризуются различными величинами диодного тока.

Во многих экспериментах [129–131] наблюдаются неустойчивости тока диода в магнитном поле. В теоретических работах С.Я. Брауде [126, 127] и других теоретических исследованиях некоторых авторов по моделированию тока диода в магнитном поле полученную неустойчивость тока объясняют особенностями траектории электронов, распределением плотности заряда и запаздыванием потенциала [132–135].

Влияние пинч-эффекта на пучок электронов полевых электронных диодов (ПЭД) рассматривалось в работах [136–140]. В экспериментальных и теоретических исследованиях было показано, что собственное магнитное поле пучка компенсирует кулоновские силы объемного заряда. В работах [141, 142] оценивается влияние собственного магнитного поля, создаваемого электронами пучка, на траекторию электронов в этих пучках. В одномерных аксиально-симметричных системах, т.е. когда направление внешнего магнитного поля выбирается таким же, как и ось симметрии диода, собственное магнитное поле имеет фокусирующее значение, т.е. сужает пучок. Этот фокусирующий эффект тем более значителен, чем больше токи и чем больше протяженности распространения потока электронов. В многолучевых системах кроме фокусировки каждого пучка собственным магнитным полем наблюдается отклонение его в результате воздействия суммарного поля остальных пучков. Расчет магнитных полей пучков аналогичен расчету поля проводников с током. Также в этих работах смоделированы и рассчитаны отклонения крайних пучков. Показано, что на крайние пучки собственное магнитное поле многолучевой системы имеет более значительное влияние, чем на остальные пучки.

Одной из первых работ, посвященной влиянию магнитного поля на полевую эмиссию является работа Ф. Блатта [143]. В этой работе однородное магнитное поле

исследуется в декартовой системе координат. Направление магнитного поля выбирается таким же, как и направление оси  $z$ , поверхность эмиссии электронов рассматривается в плоскости  $(x, y)$ . Магнитное поле изменяет спектр электронов проводимости. В магнитном поле он принимает вид:

$$\varepsilon = \varepsilon_l(k_2) = \varepsilon_l + \varepsilon_z = \hbar\omega \left( l + \frac{1}{2} \right) + \frac{\hbar^2 k_z^2}{2m^*}, \quad (1.2)$$

где  $\omega = \frac{e_0 H}{m^* c}$  — циклотронная частота;  $m^*$  — эффективная масса,  $H$  — напряжённость магнитного поля. В случае паразитических энергетических зон число состояний в интервале энергий от  $\varepsilon$  до  $\varepsilon + d\varepsilon$  для уровня Ландау с номером  $l$  равно [143]:

$$N_l(\varepsilon) d\varepsilon = \frac{2e_0 H}{h^2 c} (2m^*)^{1/2} (\varepsilon - \varepsilon_l)^{1/2} d\varepsilon. \quad (1.3)$$

Плотность тока, соответствующая эмиссии электронов с уровня Ландау с номером  $l$  равна [143]

$$j_l = \int_{\varepsilon_l}^{\infty} \frac{2e_0 H}{h^2 c} f(\varepsilon) D_l(\varepsilon) d\varepsilon, \quad (1.4)$$

где  $f(\varepsilon)$  — плотность распределения Ферми-Дирака,  $D_l(\varepsilon) = D_l(\varepsilon_z, F)$  — вероятность туннелирования для электронов с энергиями, соответствующими уровню Ландау с номером  $l$ , которая полагается независимой от магнитного поля.  $D_l(\varepsilon_z, F)$  принимается равной прозрачности барьера, полученной в работе Р.Гуда и Е. Миллера [144] в виде:

$$D_l(\varepsilon_z, F) = \exp \left[ -g - \frac{\eta - \varepsilon_z}{d} \right] = \exp \left[ -g - \frac{\eta - \varepsilon + \hbar\omega(l+1/2)}{d} \right], \quad (1.5)$$

где  $\eta$  — энергия Ферми,  $g = g(\phi, F)$ ,  $d = d\left(\frac{m^*}{m}\phi, F\right)$ , так как в дальнейшем они фигурируют как параметры, мы их здесь не приводим. Полная плотность тока является суммой по всем уровням Ландау. Используя (1.4) и (1.5), получаем [143]

$$j_l = A \sum_l B_l \int_{\varepsilon_l}^{\infty} f(\varepsilon) \exp\left(\frac{\varepsilon}{d}\right) d\varepsilon, \quad (1.6)$$

где  $A = \frac{2e_0 H}{h^2 c} \exp\left(-g - \eta/d\right).$  (1.7)

Ряд (1.6) вычисляется в приближении  $T \rightarrow 0$  с помощью формулы Пуассона. Суммирование дает [143]:

$$j_l = Ad \left[ \frac{d \exp(\eta/d - 1) - \eta}{\hbar\omega} + \sum_{p=0}^{\infty} \left\{ \left[ \frac{2}{4\pi^2 p^2 + (\hbar\omega/d)^2} \times \left[ 2\pi p \sin\left(\frac{2\pi p \eta}{\hbar\omega} - \frac{\hbar\omega}{d}\right) \cos\left(\frac{2\pi p \eta}{\hbar\omega} - \exp\frac{n}{d}\right) \right] - \frac{1}{\pi p} \sin\frac{2\pi p \eta}{\hbar\omega} \right] \right\} \right]. \quad (1.8)$$

Анализ выражения (1.8) показывает, что плотность тока является осциллирующей функцией  $H$ , с периодом  $1/H$ . Также в работе анализируются два предельных случая: во-

первых, перекрытие зон таково, что электроны обладают малой эффективной массой, тогда как дырки валентной зоны имеет большую эффективную массу; во-вторых, когда нет перекрытия зон. Первый случай можно применить для полуметаллов, таким как  $\text{Bi}$ , для которого эффект де Гааза-ван Альфена наиболее легко наблюдать. Вторым случаем применим к полупроводникам  $n$ -типа —  $\text{InSb}$ . Более детально рассмотрим первый случай. В данном варианте плотность состояния валентной зоны велика. Это условие дает возможность рассматривать уровень Ферми фиксированным при изменении магнитного поля. Во втором случае число электронов фиксировано. В следствии этого энергия Ферми зависит от напряженности магнитного поля.

Энергия Ферми в магнитном поле при  $T \rightarrow 0$  может быть представлена в виде [143, 145]:

$$\eta(H) = \eta_0 \left\{ 1 + \frac{1}{48} \left( \frac{\hbar\omega}{\eta} \right)^2 - \frac{1}{(8\pi^2)^{1/2}} \left( \frac{\hbar\omega}{\eta_0} \right)^{3/2} \sum_{g=1}^{\infty} \frac{(-1)^g}{\sqrt{g}} \sin \lambda \right\}, \quad (1.9)$$

где  $\eta_0$  — энергия Ферми при  $T = 0\text{K}$ ,  $H = 0$ ;

$$\lambda = \frac{2\pi g \eta}{\hbar\omega} - \frac{\pi}{4}. \quad (1.10)$$

Анализ выражения (1.9) показывает, что  $\eta(H) \sim H^2$  и осциллирующие слагаемые достаточно малы. Однако, вкладом осциллирующих слагаемых, в общем случае, пренебречь нельзя, так как в первом слагаемом выражения (1.8)  $\eta(H)$  находится в экспоненте. Далее, выражение (1.8) анализируется для  $\text{Bi}$ , имеющего малую эффективную массу  $m^* = 0.0105m_0$ ,  $\phi_{\text{Bi}} = 4.25$  эВ. Согласно оценкам [146], для  $\text{Bi}$  в магнитном поле  $H = 10$  кЭ и  $F = 3 \cdot 10$  В/см осцилляция тока должны составлять  $\sim 10\%$  от среднего значений.

Таким образом, в работе Блатта теоретически предсказывается осцилляция эмиссионного тока с периодом  $1/H$  (как и в эффекте де Гааза-ван Альфена) при одновременном уменьшении эмиссионного тока  $\sim H^2$ . Кроме этого, дополнительные осцилляции могут иметь место для случая  $n = \text{const}$ , вследствие осциллирующей зависимости энергии Ферми от  $H$  (1.9).

В работе [147] рассматривается автоэлектронная эмиссия с учетом магнитного поля. В ней используется метод приближения свободных электронов для вычисления плотности автоэмиссионного тока в магнитном поле. Потенциальный барьер на границе твердое тело-вакуум задается в виде треугольника, т.е. не учитывается силы изображения. Потенциальный барьер  $V(z)$  задается в виде:

$$V(z) = \begin{cases} W, & \text{внутри металла,} \\ e_0 F z, & \text{вне металла.} \end{cases} \quad (1.11)$$

Авторы [146] получили следующее выражение для плотности тока  $j$ :

$$j = \frac{1}{2} \sum_{\sigma} j_0 (\eta + \sigma \mu_0 H) + j_1^{\text{осц}} + j', \quad (1.12)$$

где  $\eta$  — химический потенциал металла в магнитном поле, содержащий малую осциллирующую добавку;  $\sigma = \pm 1/2$  — проекция спина электрона;  $j_1^{\text{осц}}$  — осциллирующий член;  $j'$  — член, монотонно зависящий от  $H$  и обращающийся в нуль при  $H < 0$ . Как следует из (1.12), осцилляции тока объясняются следующим образом: во-первых, наличием осциллирующей зависимости числа состояний электронов (член  $j_1^{\text{осц}}$ ); это обычные осцилляции типа эффекта де Гааза-ван Альфена; во-вторых, наличием осцилляций химического потенциала (первый член выражения (1.7)); этот эффект обусловлен изменением минимальной величины барьера, а, следовательно, вероятности туннелирования. Также получены аналитические выражения для осциллирующих членов суммы (1.10). Эти выражения принципиально не отличаются от выражений (1.8), (1.9), приведенных в работе Блатта [146].

Согласно оценкам авторов, для эмиттеров с эффективной массой  $m = 10^{-3} \div 10^{-2} m_0$  отношение  $j^{\text{осц}}/j \approx 10^2$ , где  $j_0$  — эмиссионный ток в отсутствии магнитного поля. Условие наблюдения осцилляций  $\lambda \leq 1$ , где  $\lambda = 2\pi kT/\mu_B H$  ( $\mu_B$  — магнетон Бора,  $k$  — постоянная Больцмана).

Теоретическая работа [147] также посвящена проблемам задачи исследования автоэлектронной эмиссии (АЭЭ). Результаты этих расчетов принципиально не отличаются от выводов ранее обсужденных работ [146, 148].

В 1970 году опубликована работа Бурибаева и Шишкина [149] об автоэлектронной эмиссии из  $W$  в магнитном поле до 15 кЭ при температурах 78 К и 300 К. Давление остаточных газов в приборе было порядка  $\approx 10^{-9}$  торр. Очистка поверхности эмиттера производилась нагревом острия до  $\approx 2000\text{К}$ . Результаты экспериментов приведены на рисунках 1.26, 1.27. Как следует из анализа полученных зависимостей, при комнатной температуре наблюдается монотонное уменьшение тока эмиссии по мере увеличения магнитного поля  $\approx (10\%)$ . При  $T = 78\text{К}$  возникают осцилляции тока порядка единиц процентов при одновременном уменьшении тока. На вольтамперных характеристиках (рисунок 1.27.) наблюдаются изломы.

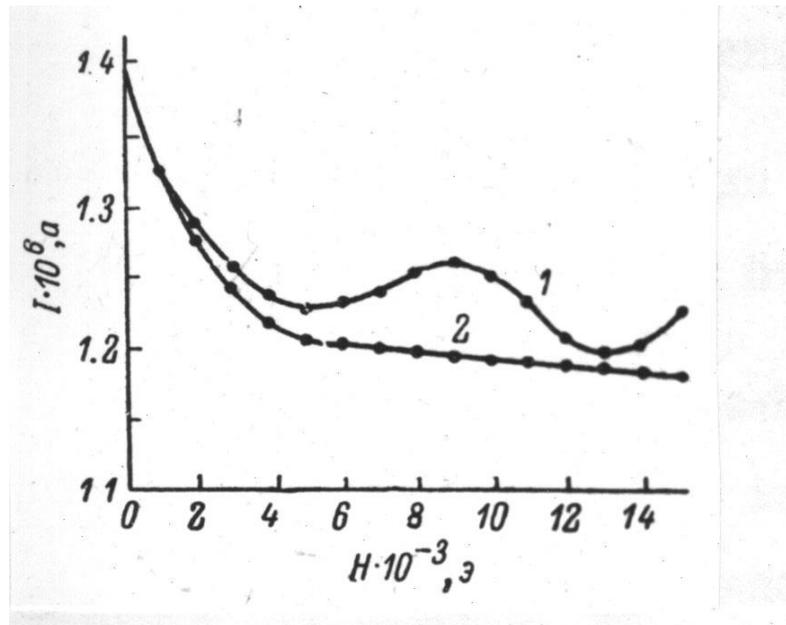


Рисунок 1.26. Зависимость тока полевой эмиссии от магнитного поля.  
 $T$  (К): 1 — 78, 2 — 300.

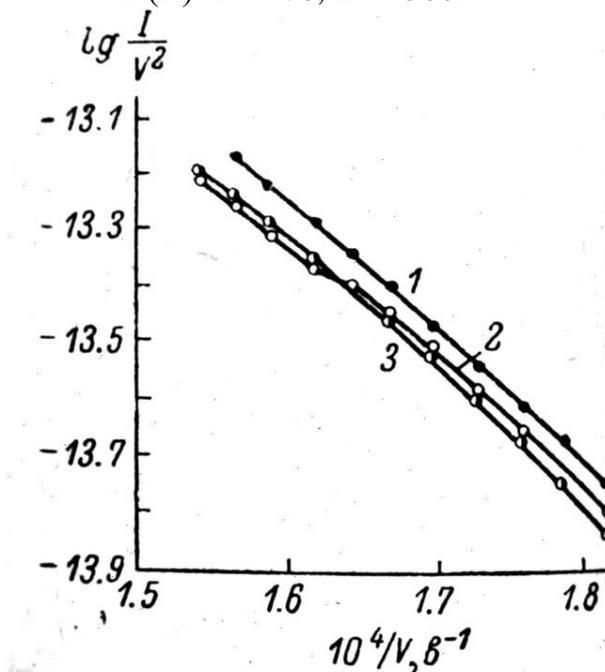


Рисунок 1.27. Прямые Фаулера-Нордгейма при фиксированных значениях магнитного поля.  $H$ , кЭ: 1 — 0; 2 — 10; 3 — 15.

Одной из последних экспериментальных работ, посвященных исследованию автоэлектронной эмиссии в магнитном поле, является работа Кеннеди и Мура [150]. Эксперименты проводились при гелиевых температурах  $T \approx (4.3 \div 13)$  К в магнитном поле до 20 кЭ, в сверхвысоком вакууме ( $10^{10}$  торр). Эмиттеры изготавливались из  $W$  поликристаллических проволок электролитическим травлением. Полученные результаты приведены на рисунке 1.26.

Эти зависимости частично соответствуют выводам, сделанным в ранее описанных работах [146, 147]. Результаты экспериментов имели некоторое количественное расхождение для разных эмиттеров (при качественном сходстве). Тогда как для одного и того же эмиттера (рисунок 1.28) наблюдалась хорошая воспроизводимость результатов. Диапазон автоэмиссионных токов, в котором велись измерения, составлял  $10^{-10} \div 10^{-5}$  А. Наблюдаемые расхождения результатов с теорией авторы объясняют, что реальная трехмерная система моделировалась плоским эмиттером.

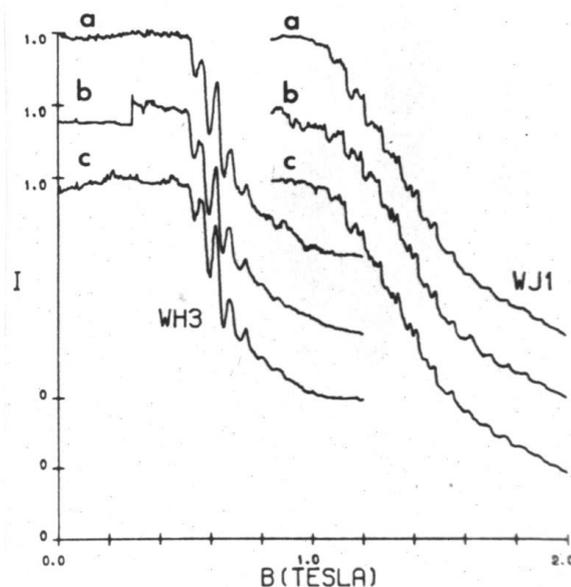


Рисунок 1.28. Зависимость эмиссионного тока от магнитного поля.

- a — возрастающее магнитное поле,
- b — уменьшение магнитного поля (сразу после кривой a),
- c — возрастающее магнитное поле (после кривой b).

В работе приводятся следующие объяснения полученных результатов: 1) магнитное поле приводит к уменьшению потока электронов через границу металл-вакуум; 2) магнитное поле может изменять как энергию Ферми, так и плотность состояний в магнитном поле и 3) наблюдаемые эффекты могут являться результатом "размерных" гальваномагнитных эффектов. Авторы [150] отдают предпочтение первому возможному объяснению расхождения теории с экспериментом.

Наиболее детальное исследование влияния магнитного поля на эмиссионные свойства полевого электронного катода были проведены в работах [151, 142]. Авторы данных работ пришли к следующему выводу, что воздействие внешнего магнитного поля приводит к инерционному росту эмиссионной способности полевых электронных эмиттеров при плотностях эмиссионного тока от  $10^6$  А/м<sup>2</sup> до  $10^{11}$  А/м<sup>2</sup>.

Показано, что аномалии процесса ПЭЭ в магнитном поле не являются следствием адсорбции на поверхности эмиттера остаточных газов или ионной бомбардировки эмиттера.

Установлено, что процесс релаксации, наведенной при полевой эмиссии в магнитном поле повышенной эмиссионной способности, обладает значительной инерционностью, при этом время релаксации существенно зависит от температуры эмиттера и в зависимости от температуры эмиттера может изменяться от секунд до десятков минут.

Изучено влияние на процесс ПЭЭ величины магнитного поля, начальной температуры эмиттера, начальной плотности тока  $j_0$ , материала и угла конуса эмиттера. В результате исследований получены следующие зависимости: а) зависимость  $j_0/j = f(H)$  имеет немонотонный характер; б) начальная температура эмиттера оказывает существенное влияние только в том случае, если она не превышает некоторой характерной для данного материала температуры  $T_k$ , которая близка к дебаевской температуре (в случае  $W$  эмиттеров); в) зависимость  $j_0/j = f(j_0)$  имеет максимум при плотностях тока  $j \approx 10^9 \text{ A/m}^2$ ; г) при прочих равных условиях, чем больше угол конуса эмиттера, тем при больших начальных плотностях тока  $j_0$  начинают проявляться магнитные эффекты, однако характер этих эффектов от угла конуса не зависит; д) от ориентации вектора  $H$  относительно оси острия зависит результирующее изменение эмиссионной способности полевого эмиттера; е) при начальных плотностях тока  $j_0 \sim 10^9 \div 10^{10} \text{ A/m}^2$  процесс полевой эмиссии в магнитном поле может иметь неустойчивый характер; в этих условиях наблюдаются осцилляции и прекращение эмиссионного тока; ж) в процессе полевой эмиссии в магнитном поле происходят деформации вершины эмиттера, в результате которых происходит смещение центров граней на эмиссионных изображениях [140,152].

В работах [153-155] было проведено теоретическое исследование эмиссионных характеристик ПЭК, аппроксимированного сферой, с применением метода задания условия на границе пучок-вакуум. В этих работах получены хорошо согласующиеся с экспериментальными данными результаты ВАХ для ПЭК, находящегося под воздействием внешнего магнитного поля и с учетом влияния пространственного заряда.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все 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.

**1. 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 20 детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии, проходивших терапию в РБ №1 — НМЦ медицины РС (Я), взятой натошак с помощью вакуумных систем забора крови. Максимальный диаметр образцов составлял 20 мм. Толщина исследуемых мазков равняется примерно толщине эритроцитов крови – от 2 до 2.5 микрон. Размеры образцов составляли около 20x20 мм;
- мазки мочи, для приготовления которых 2,50 мл мочи центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин. После этого две капли осадка помещали на предметное стекло, оставляли в горизонтальном положении, и осадок распределяли по стеклу;
- сухие мазки капиллярной крови детей в возрасте от 8 до 18 лет, проходивших лечение в нефрологическом отделении Центра охраны материнства и детства Республиканской больницы №1, нанесенные на предметное стекло, и контрольной группы (студенты первого курса СВФУ имени М.К. Аммосова и школьников г. Якутска без заболевания почек). Всего было исследовано 44 образца;
- мазки крови и мочи 5 пациентов с различными вариантами обструкции мочеточников, с диагнозом нефроптоз с формированием гидронефроза;

- мазки венозной крови, забранной в вакуумные пробирки с ЭДТА путем венепункции, приготовленные на предметных стеклах и высушенные на воздухе при температуре 20–22 °С 50 пациентов с диагнозом рак шейки матки. Возраст пациентов - от 45 до 55 лет;
- сухие мазки венозной крови 4 пациентов с раком молочной железы;
- мазки крови из трупного материала восьми умерших от различных причин, подготовленные в «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения РС(Я);
- синовиальной жидкости, полученные при пункции коленного сустава 101 пациентов
- специальным образом подготовленные образцы венозной крови 5 пациентов с диагнозом РШМ для исследования методом ПЦР-РВ;
- специальным образом подготовленные образцы венозной крови специальным образом подготовленные образцы венозной крови 18 пациентов с диагнозом РШМ и 9 пациентов с диагнозом РМЖ для исследования методом иммунофлуоресцентного анализа.

Для проведения *исследования морфологии эритроцитов крови пациентов с диагнозом рак шейки матки во время лучевой терапии* методом сканирующей электронной микроскопии использовали мазки венозной крови, содержащие КЗ-ЭДТА, от 12 больных РШМ и от 3 больных контрольной группы в возрасте от 45 до 55 лет. У 4 пациентов из 12 анализы получали на каждом этапе полного курса лечения, а у остальных 8 пациентов сразу после первого этапа. Тонкий ровный слой крови наносился на чистое обезжиренное предметное стекло и высушивался.

В Якутском республиканском онкологическом диспансере больным проводилось *лучевое лечение*, состоящее из двух этапов: сначала дистанционная лучевая терапия с использованием ускорителя Elekta Synergy (Великобритания, дистанционная лучевая терапия, 6-18 МэВ), а затем брахитерапия с использованием аппарата MultiSource HDR (Германия, брахитерапия источником Кобальт-60). На первом этапе терапия проводилась на линейном ускорителе в режиме работы с фотонами с энергией 6 МэВ.

ЛТ проводилась поэтапно следующим образом: трижды по 5 дней ежедневно с перерывом в два дня, т.е. на первом этапе проводилось всего 15 фракций по 2 Гр. Далее, без перерыва между первым и вторым этапом, проводилась контактная лучевая терапия в дозе 5 Гр с чередованием дистанционной лучевой терапии в дозе 2 Гр по 5 фракций каждого вида лучевой терапии. Образцы крови собирали в начале, середине и конце дистанционной терапии, затем в середине и в конце контактной лучевой терапии. В ходе

терапии применялось несколько методов (3D CRT, IMRT, VMAT), чтобы обеспечить доставку высоких доз в опухоль и низких доз в здоровые ткани.

Для проведения элементного анализа НРС на поверхности эритроцитов и на плазме использовали дополнительный модуль СЭМ — систему энергодисперсионного микроанализа Oxford INCA Energy 350.

При проведении *KP- спектроскопии образцов крови* пациентов с диагнозом РШМ во время лучевой терапии объектом исследования служили 6 образцов венозной крови пациентов с РШМ (сухие мазки), полученные в радиотерапевтическом отделении Якутского республиканского онкологического диспансера, и 3 образца крови здоровых доноров (доноров подбирали соответствующего пола и возраста), которые наносились на сухое, обезжиренное предметное стекло.

В серии экспериментов по *исследованию воздействия ионизирующего излучения (ИИ) на параметры крови обезьян* (макака-резус, самцы) методом КР спектроскопии объектом исследования служила гепаринизированная (капля гепарина на 1 мл крови) кровь из вены обезьяны вида макака-резус (*Macaca mulatta*), самцы, 3,2-3.6 кг, возраст 2.5-3 года, около 40 особей). В работе проводили облучение обезьян (суммарная доза, 50 сЗв). Облучение проводилось на установке УПГД 2М с источником излучения цезий Cs<sup>137</sup>. Активность источника  $7,4 \times 10^{12}$  Бк или 200 Кюри. В ходе эксперимента были проведены несколько сеансов острого облучения, но не по 15 сЗв, как в установленном для космонавтов нормативе, а по 50 сЗв. В эксперименте животных облучали либо 1/10 суммарной дозы в течение 10 дней с перерывом в два дня (группа 1), либо 1/2 суммарной дозы в течение двух дней (группа 2). Далее исследовали кинетику восстановления параметров крови после 36-85 дней (группа 1) и 22-178 дней (группа 2).

Для обнаружения *специфических фрагментов циркулирующей ДНК* ВПЧ в крови пациентов детекцию фрагментов ДНК осуществляли во фракциях крови, практически не содержащих клеточных ядер, в частности, в плазме и эритроцитарной фракции. Плазма как компонент крови была выбрана из-за своего высочайшего содержания циркулирующей ДНК и минимальной вероятности загрязнения клеточными остатками, что делает её идеальным объектом для молекулярно-генетических исследований.

Материалом для данного исследования явилась венозная кровь 5 пациенток в возрасте от 45 до 55 лет (жителей Якутии) с впервые выявленным РШМ. На момент взятия крови пациенткам не проводилось никакого лечения РШМ. Венозная кровь

отбирали путем венепункции в вакуумные контейнеры для забора крови с КЗ-EDTA. Из каждой крови были подготовлены 3 вида биоматериала – образцы плазмы P1 (1), суспензии эритроцитов RBCsus (2) и суспензии, обработанной трипсином RBCsus-Try (3). Третий вид биоматериала служил контролем присутствия искомым фрагментов ДНК на поверхности эритроцитов, а также контролем чистоты суспензии эритроцитов. Если после обработки трипсином в суспензии эритроцитов будут обнаружены фрагменты ДНК  $\beta$ -глобина генома человека, то это не будет исключать наличия в ней ядерных клеток, например нейтрофилов.

Для *разделения крови на фракции* кровь сначала центрифугировали при 1600 об/мин в течение 10 минут. На этом этапе были получены образцы плазмы (P1) и эритроцитарная фракция. Затем эритроцитарную фракцию объемом 1 мл трижды отмыли фосфатным буфером для получения образца эритроцитарной взвеси. Образец эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, получили следующим образом: в половину объема образца эритроцитарной взвеси, приготовленной способом, который описан выше, добавили 0,25%-ный раствор трипсина в соотношении 1:1 и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 минут, после инкубации центрифугировали для получения осадка; затем нижнюю часть осадка трижды отмыли фосфатным буфером, и этот биоматериал был включен в исследование как образец эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином. Все образцы до выделения ДНК и проведения ПЦР-РВ хранились в морозильнике при температуре –20°C.

Для *характеристики химического состава НРС* на поверхности эритроцитов методом МФА был разработан специальный протокол пробоподготовки суспензии эритроцитов крови пациентов с диагнозами РШМ и РМЖ.

*Пробоподготовка.* В ходе исследования были разработаны два вида протокола пробоподготовки (№1 и №2) в целях сохранности адсорбированных НРС на поверхности эритроцитов во время выделения из крови суспензии эритроцитов.

*Протокол №1.* Образцы крови, собранные в пробирки, содержащие ЭДТА, центрифугировали в течение 5 минут при 600g, затем сливали супернатант, а осадок помещали в 15 мл центрифужную пробирку для дальнейшей промывки фосфатным буфером (PBS). Отбирали центральную часть осадка, не касаясь верхней границы фаз и дна пробирки, где концентрируются различные ядродержащие клетки и другие элементы крови. После переноса суспензии эритроцитов общий объем суспензии

доводился до 10 мл при помощи PBS, после чего образцы центрифугировали в течение 5 минут при 600g. Процедуру промывки фосфатным буфером повторяли 3-4 раза.

Клетки фиксировали 1% раствором параформальдегида (PFA) в PBS. Для этого к отмытому осадку добавляли фиксирующий раствор, доводя общий объем до 10 мл и далее аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки несколько раз и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре.

Фиксирующий раствор удаляли центрифугированием при тех же условиях, а осадок промывали 2 раза раствором FACS (2% телячьей сыворотки в PBS). На этом этапе образцы были готовы к иммунофлуоресцентному анализу.

В нашем исследовании суспензия фиксированного образца была разбавлена при помощи FACS раствора в соотношении 1:3 (250:750 мкл соответственно). 100 мкл разбавленного образца переносили в пробирку типа эппендорф и аккуратно добавляли 1 мкл первичных антител с последующей инкубации в течение ночи при +4°C. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела против белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 MAB837 (Sigma-Aldrich). После инкубации образец центрифугировали в течение 5 минут при 800g, сливали супернатант и промывали 3 раза раствором FACS, после промывки к образцу, растворенному в 500 мкл раствора FACS добавляли 2 мкл вторичных антител, которые были представлены козьими поликлональными антителами против Н и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированными с флуоресцеином (FITC) (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI).

## *2. 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. Исследования биологических образцов – сухих мазков крови на стеклянных подложках производились при низких киловольтных ускоряющих напряжениях (1-3 кВ) с помощью СЭМ JEOL JSM 7800F фирмы высокого разрешения с термополевым катодом Шоттки и супергибридной объективной линзой с разрешающей способностью 1,2 нм (при 1 кВ) с использованием и без проводящих покрытий.*

*Микроскоп JEOL JSM 7800F позволяет исследовать широкий спектр материалов с высоким разрешением благодаря тому, что в электронно-оптической колонне реализована технология Shottky In-Lens FEG заключающаяся в том, что катод находится*

внутри конденсорной линзы и это позволяет более эффективно, по сравнению с обычным размещением катода, собирать эмитируемые с катода электроны и фокусировать их. Супергибридная объективная линза позволяет значительно уменьшить хроматические и сферические аберрации, что позволяет существенно улучшить разрешение, особенно при малых ускоряющих напряжениях.

*Напыление проводящего слоя* проводилось с применением универсальной вакуумной напылительной установки JEOL JEE-420. Применение проводящего покрытия ограничивало возможность исследования нанообъектов, т. к. толщина наносимого слоя покрытия было соразмерно с размерами малых вирусов (20-30 нм). Образцы закреплялись с помощью проводящего двухстороннего углеродного скотча для предупреждения накопления электрического заряда на поверхности биологического образца.

*Для пробоподготовки биологических образцов* с применением нанотехнологий, а именно для формирования *наноструктурированной подложки* из композита оксида графена с наночастицами серебра суспензию оксида графена (ОГ), окисление графита проводили по модифицированному методу Хаммерса. Для этого готовили раствор из 0,1 г графитового порошка, 0,05 г нитрата натрия и 7 мл концентрированной серной кислоты с добавлением 0,3 г перманганата калия. Раствор перемешивали в течение 4 недель. После разбавления деионизированной водой до 25 мл к смеси добавляли раствор перекиси водорода (5%). Полученную суспензию фильтровали с образованием гелеобразной массы. Затем раствор разбавляли 50 мл воды и обрабатывали ультразвуком мощностью 750 Вт в течение 5 минут. Не расслоившиеся листы оксида графита удаляли центрифугированием при 14500 об/мин в течение 5 минут. В результате была получена гомогенная суспензия оксида графена. Для приготовления суспензии с наночастицами серебра к 1,25 мл воды при постоянном перемешивании при комнатной температуре последовательно добавляли водные растворы цитрата натрия (1 мл) и нитрата серебра (0,25 мл). Через 5 мин инкубации и добавления кипятка цвет раствора меняется от бесцветного до мутно-коричневого. Полученный раствор дополнительно кипятили в течение 1 часа при непрерывном перемешивании. Далее растворы с наночастицами серебра и ОГ смешивали в объемном соотношении 1:1. Приготовленную суспензию наносили на кремниевую подложку и сушили при комнатной температуре в течение 24 часов. Диэлектрические подложки предварительно промывались в ацетоне и спирте в

ультразвуковой ванне и для придания гидрофильных свойств обрабатывались водным раствором перекиси водорода и аммиака.

Толщина нанокомпозитных пленок составляет от нескольких единиц до десятков нанометров. Полученные образцы были частично восстановлены обработкой при температуре 250° С в течение 30 минут в аргоне с целью снижения содержания функциональных групп кислорода в ОГ.

*Исследование морфологии эритроцитов* крови кроме СЭМ проводили *методом атомно-силовой микроскопии*. С помощью АСМ — сканирующего зондового микроскопа Solver Next фирмы NT-MDT проводили сканирование в полуконтактном режиме со следующими характеристиками работы АСМ: области сканирования 50x50 мкм (512 точек), 5x5 мкм (512 точек); скорость сканирования 0,5 Гц, 0,25 Гц, значения которых были выбраны из-за неоднородностей рельефа; при всех измерениях использовался кантилевер NSG 10 с радиусом кривизны не больше 10 нм. АСМ изображение регистрировали при помощи программных обеспечений Nova и ImageAnalysis фирмы NT-MDT. Для оценки неровностей рельефа эритроцитов и толщины была использована линейка S1.

*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 (НПВО).

В Якутском республиканском онкологическом диспансере больным проводилась *лучевая терапия (ЛТ, облучение)*, состоящее из двух этапов: сначала дистанционная лучевая терапия с использованием ускорителя Elekta Synergy (Великобритания, дистанционная лучевая терапия, 6-18 МэВ), а затем брахитерапия с использованием аппарата MultiSource HDR (Германия, брахитерапия источником Кобальт-60). На первом этапе терапия проводилась на линейном ускорителе в режиме работы с фотонами с энергией 6 МэВ.

ЛТ проводилась поэтапно следующим образом: трижды по 5 дней ежедневно с перерывом в два дня, т.е. на первом этапе проводилось всего 15 фракций по 2 Гр. Далее, без перерыва между первым и вторым этапом, проводилась контактная лучевая терапия в дозе 5 Гр с чередованием дистанционной лучевой терапии в дозе 2 Гр по 5 фракций каждого вида лучевой терапии. Образцы крови собирали в начале, середине и конце дистанционной терапии, затем в середине и в конце контактной лучевой терапии. В ходе терапии

применялось несколько методов (3D CRT, IMRT, VMAT), чтобы обеспечить доставку высоких доз в опухоль и низких доз в здоровые ткани.

Линейные размеры эритроцитов и НРС 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.

Исследование сухих мазков крови проводилось *методом ИК спектроскопии*. Исследование проводилось на ИК спектрометре с Фурье преобразователем Varian 7000 методом нарушенного полного внутреннего отражения. Исследования проводились в диапазоне от 4000 до 400 см<sup>-1</sup> в режиме пропускания.

*Метод КР спектроскопии* образцов крови пациентов использовали для исследования состояния гема гемоглобина эритроцитов крови. Эксперименты проводились на установке NTEGRA Spectra с конфокальной КР/флуоресцентной микроскопией и спектроскопией, длина волны источника излучения 532 нм при температуре помещения 23°C. Полученные КР спектры обрабатывались при помощи программного обеспечения OriginPro 2018 (сглаживание, нормировка, вычитание базовой линии проводилось по 15 точкам).

Величину *гематокрита* (общий объем эритроцитов) контролировали при помощи микрогематокритной центрифуги Adams Readacrit CT-3400, осаждение эритроцитов проводили в течение 5 мин при 7200 об./мин.(4750g), значения гематокрита определяли по калибровочной линейке, прилагаемой к прибору.

Определение *содержания Гб* в крови проводилось спектрофотометрическим методом. Эритроциты подвергали гемолизу, выделяя, таким образом, гемоглобин, а затем по спектрам поглощения определялась концентрацию гемоглобина. Эритроциты макак-резусов подвергали гемолизу путем 50-кратного разведения в дистиллированной воде. Полученный гемолизат разводили в 50 раз 0.06% раствором SDS (додецилсульфата натрия, Panreac) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Specol 11 (Zeiss) при длине волны 540 нм. Концентрацию гемоглобина оценивали по формуле:

$$c = (E \cdot \text{разведение} \cdot M) / (d \cdot \varepsilon) \text{ (г/л)},$$

где  $E$  — измеренное значение оптической плотности, разведение — кратность разбавления исходной крови в измеряемом образце,  $M$  — молекулярная масса мономера гемоглобина,  $d$  — длина оптического пути ячейки,  $\epsilon$  — коэффициент молярной экстинкции.

Для оценки состояния молекул  $\beta$ -каротина в липидах или белках плазмы крови использовали *спектроскопию резонансного комбинационного рассеяния (КР)*. Источником возбуждающего света служил аргоновый лазер, генерирующий излучение с длиной волны 473 нм, что близко к максимуму спектра поглощения  $\beta$ -каротина (450 нм). Луч лазера фокусировали на верхней части капилляра, заполненного плазмой крови макак-резусов. Мощность лазерного излучения, попадающего на образец, составляла 18-20 мВт. Рассеянное излучение собиралось системой линз на фоточувствительную матрицу. Для записи спектров и оценки параметров КР-спектра использовали программу “МОРС”. Время регистрации одного КР-спектра составляло 60 с. При обработке спектров КР производили вычитание базовой линии, используя программу, разработанную в лаборатории биофизики клетки биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, а также пакет программ Matlab 7.5.

С помощью *спектроскопии комбинационного рассеяния (КР)* контролировали изменения конформации гема гемоглобина, свидетельствующие о доле комплексов оксигемоглобина (о-Гб), а также O<sub>2</sub>-связывающие свойства Гб эритроцитов крови обезьян после ИИ. Источником возбуждающего света служил аргоновый лазер, генерирующий излучение с длиной волны 473 нм и мощностью 17 мВт. Луч лазера фокусировали на верхней части капилляра, заполненного кровью макак-резусов. Рассеянное излучение собиралось системой линз на фоточувствительную матрицу. Для записи спектров и установления параметров использовали программу “МОРС” (г. Троицк, РФ). Время регистрации одного спектра составляло 100с. При обработке спектров КР производили вычитание базовой линии, а также определение интенсивностей основных пиков спектров КР при помощи 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. Для детекции ДНК в крови пациентки с РШМ использовались праймеры, предназначенные для амплификации фрагмента ДНК,

кодирующего участок белка L1 ВПЧ. Также в крови той же пациентки была выполнена детекция фрагмента ДНК, кодирующего участок  $\beta$ -глобина генома человека, что служит контролем для подтверждения корректности процесса извлечения и амплификации ДНК.

*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  $\beta$ -глобин генома человека, использовались праймеры MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'/5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') и PC03/04 (5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'/5'-СААСТТСАТССАСГТТСАСС-3') соответственно. Длину ампликонов определяли методом электрофореза в агарозном геле.

Для характеристики химического состава НРС на поверхности эритроцитов использовали метод МФА.

Для проведения эксперимента были использованы следующие растворы и антитела: 1) растворы: раствор 10xPBS (фосфатно-солевой буфер, который используется для промывки и диспергирования клеток, а также для поддержания рН и осмотического давления при проведении биологических экспериментов) по заданному протоколу: в 800 мл дистиллированной воде добавляли 80 г NaCl, 2 г KCl, 2,4 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 14,4 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1xPBS от ранее приготовленного 10xPBS соотношением 1:9; раствор FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting буфер — это раствор, используемый для обработки и анализа клеток при использовании методов цитофлуориметрии и сортировки клеток по флуоресценции) : на 245 мл 1xPBS добавляли 5 мл 2% FBS; раствор параформальдегида (PFA 1%) (фиксирует клетки крови, вызывая ковалентные поперечные связи между молекулами, эффективно склеивая их в нерастворимую сетку) : порошок параформальдегида растворяли в 1xPBS и нагревали до температуры 60°C, чтобы он полностью растворился, затем добавили немного NaOH и нейтрализовали его с помощью HCl до 7,0 рН, далее фильтровали; глутаровый эльдирид для фиксации клеток крови; 2) антитела: первичные антитела – Ms Anti-Papilloma virus antibodies — это моноклональные или поликлональные антитела, специфически направленные против папилломавирусов белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 MAB837 (Sigma-Aldrich), а); первичные антитела ARG56108 ARIGO— это продукт, содержащий 50 микрограмм антитела против белка HPV16 L1 с идентификатором CamVir-1; вторичные антитела Goat Anti-Mouse IgG Antibody

представлены козьими поликлональными антителами против H и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированными с флуоресцеином (FITC) (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI)

Сухие мазки крови были подготовлены после часовой инкубации образцов с антителами и 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.

### **ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР НА ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

**В третьей главе** рассматриваются режимы работы СЭМ в исследованиях биологических образцов, а также задачи исследований патологий с применением СЭМ. Проводится анализ подбора режима работы СЭМ в исследованиях биологических образцов: эритроцитов крови в норме и патологии для формирования новых подходов в методах изучения и диагностики заболеваний.

В настоящее время, при исследованиях крови мазки 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 может существенно ограничить возможности СЭМ при исследовании объектов с размерами меньше 1 мкм. Для выбора режима работы СЭМ при исследовании биологических образцов в качестве образцов использовали мазки крови детей с гематурией, содержащие наноразмерные объекты (30-40 нм). Такие объекты могут быть наиболее информативными при исследовании влияния подложек на качество изображения, полученных с помощью СЭМ. Таким образом, существует необходимость изучения зависимости качества СЭМ изображений от вида подложек (изолирующих и проводящих) при исследовании биологических образцов. В данной работе рассматривается пример исследования сухих мазков крови детей с синдромом гематурии. Были использованы подложки из стекла (предметное стекло), кристаллов кремния (КДБ5-15), с нанесением восстановленного оксида графена (ВОГ), ВОГ с наночастицами серебра (СНЧ) и из стекла, покрытого титаном.

В ходе исследования использовали СЭМ в изучении морфологии эритроцитов образцов крови при различных патологиях: заболеваниях почек у детей с синдромом гематурии, в том числе заболевание Берже (IgA нефропатия), и взрослых, включая РШМ, рак молочной железы (РМЖ), холодовые травмы, болезни суставов.

В ходе исследований были выявлены особенности дисморфии эритроцитов при рассмотренных патологиях, а также наличия на поверхности эритроцитов нанообъектов, размеры которых были сопоставимы с размерами вирусов и везикул. Контроль за

состояниями эритроцитов в мазке крови проводили при ускоряющих напряжениях 1 и 2 кВ с подачей напряжения на исследуемый объект 8–10 В.

Для подтверждения результатов СЭМ исследований наличия НРС на поверхности эритроцитов был использован метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). С помощью АСМ исследований тех же сухих мазков на предметном стекле были подтверждены характерная дисморфия эритроцитов при различных патологиях и наличие НРС на поверхности эритроцитов.

### **3.1. Режим работы и пробоподготовка в исследованиях биологических образцов**

#### **3.1.1. Характеристики и выбор оптимальных режимов работы сканирующего электронного микроскопа в исследовании биообъектов**

Исследования биологических образцов – сухих мазков крови на стеклянных подложках производились при низких киловольтных ускоряющих напряжениях (1-3 кВ) СЭМ JEOL JSM 7800F с разрешающей способностью 1,2 нм (при 1 кВ) без проводящих покрытий. Применение проводящего покрытия ограничивало бы возможность исследования нанообъектов, т. к. толщина слоя наносимого покрытия было соразмерно с размерами малых вирусов. При данном исследовании [156, 157] 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 для снятия накопления электрического заряда на поверхности образцов (для диэлектриков). Для улучшения качества изображения менялись параметры работы микроскопа, в том числе так называемое рабочее расстояние (фокусное расстояние, WD).

Для данной модификации СЭМ при проведении экспериментов с образцами крови в виде сухих мазков на предметном стекле необходимо работать при низком ускоряющем напряжении от 1 до 2 кВ без напыления проводящего слоя на образец с использованием нижнего детектора вторичных электронов с выбором рабочего расстояния WD=3.9 мм.

В настоящее время является актуальной проблема дифференциальной диагностики гломерулонефритов, в том числе сопровождающихся гематурией, для установления клинико-морфологической формы которых применяется почечная биопсия, сопровождающаяся высокими рисками для пациента. Ранее были опубликованы работы, связанные с исследованием образцов крови детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии, например, такими как IgA нефропатия, хронический гломерулонефрит, гемморагический васкулит [158, 159]. В результате исследования были сделаны выводы о том, что несмотря на то, что на морфологию эритроцитов крови влияет очень большое количество факторов, существует некоторая связь их форм и размеров с диагнозом заболевания. Обнаружена также взаимосвязь диагноза с количественными и качественными характеристиками НРС на поверхности эритроцитов, которые имеют размеры, сопоставимые с размерами вирусов и экзосом [158, 159]. В ходе изучения образцов крови пациентов проводилась экспериментальная работа по выявлению условий проведения исследования, связанной с подготовкой биообразцов и режима работы электронного микроскопа. Очевидно, что при правильном выборе условий проведения экспериментов могли быть получены наиболее качественные изображения, которые позволяли бы проводить анализ морфологии эритроцитов крови в нанометровом диапазоне, а также использовать алгоритмы машинного обучения для их анализа. Такой подход к исследованию особенностей морфологии эритроцитов крови в патологии позволит сформировать новые методы диагностики заболеваний. Учитывая необходимость обработки при этом большого количества данных и связанные с этим проблемы их оптимального использования существует необходимость разработки метода машинного обучения в исследованиях форм и размеров эритроцитов и НРС. Автоматизация распознавания образов эритроцитов и НРС существенно облегчит анализ морфологических данных образцов крови и будет способствовать формированию подходов в разработке методов дифференциальной диагностики заболеваний почек. Для машинного анализа морфологических данных образцов крови необходимо проводить подготовительные работы по оконтуриванию эритроцитов (рисунок 3.1). Оконтуривание, в свою очередь, зависит от качества СЭМ изображений.

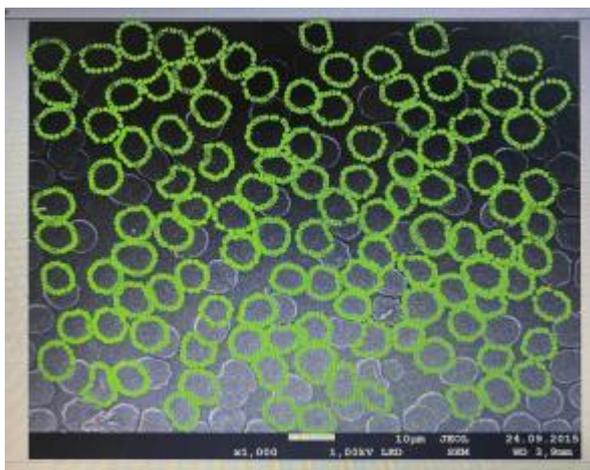


Рисунок 3.1. Оконтуривание эритроцитов, увеличенных в 1000 раз, с помощью программы Anaconda prompt (Anaconda 3).

Исследовались сухие мазки крови пациента с хроническим мезангиопролиферативным гломерулонефритом (ХМПГН) и добровольца без признаков иммунного поражения почек [160].

На рисунке 3.2 представлены изображения эритроцитов пациента с диагнозом ХМПГН при различных увеличениях. При 10.000x увеличении визуализируются особенности рельефа поверхности мембраны выбранного эритроцита (рисунок 3.2. а). Установлено, что поверхность эритроцита неровная, имеются включения в виде ямок, впадин. На поверхности эритроцитов наблюдается большое количество НРС (рисунок 3.2. б и в). Размеры НРС на поверхности эритроцитов варьируются от 30 нм до 100 нм. На основе рисунка 3.2 г) было выявлено, что наибольшее количество НРЧ имеет размер 50–70 нм. Данные результаты были получены при следующем режиме работы СЭМ: 1) ускоряющее напряжение равнялось 1,00 кВ; 2) рабочее расстояние — WD равнялось 4,0 мм.

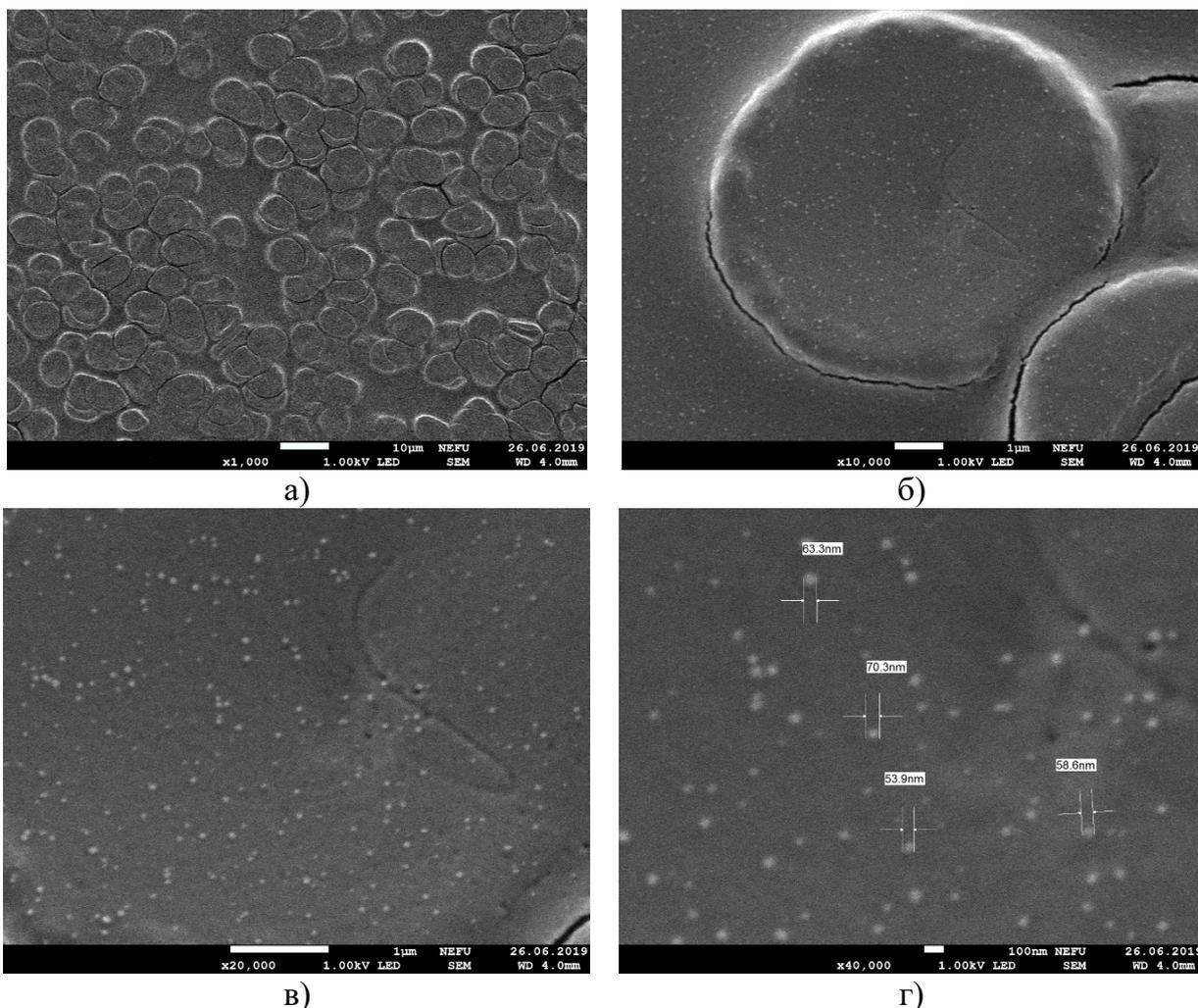


Рисунок 3.2. СЭМ-изображения капиллярной крови пациента с ХМПГН: 1) эритроцитов — а) и б) при увеличениях 1000х и 10 000х соответственно; 2) НРС — в) и г) при увеличениях 20 000х и 40 000х соответственно.

На рисунке 3.3 представлены эритроциты и НРС на их поверхности образца крови пациентки с ХМПГН. Эти результаты были получены при следующем режиме работы СЭМ: 1) ускоряющее напряжение равнялось 1 кВ; 2) рабочее расстояние (фокусное расстояние) — WD составляло 3,9 мм. Изменение WD позволило получить снимок при увеличении 80 000 раз, что было невозможно при WD равном 4,00 мм.

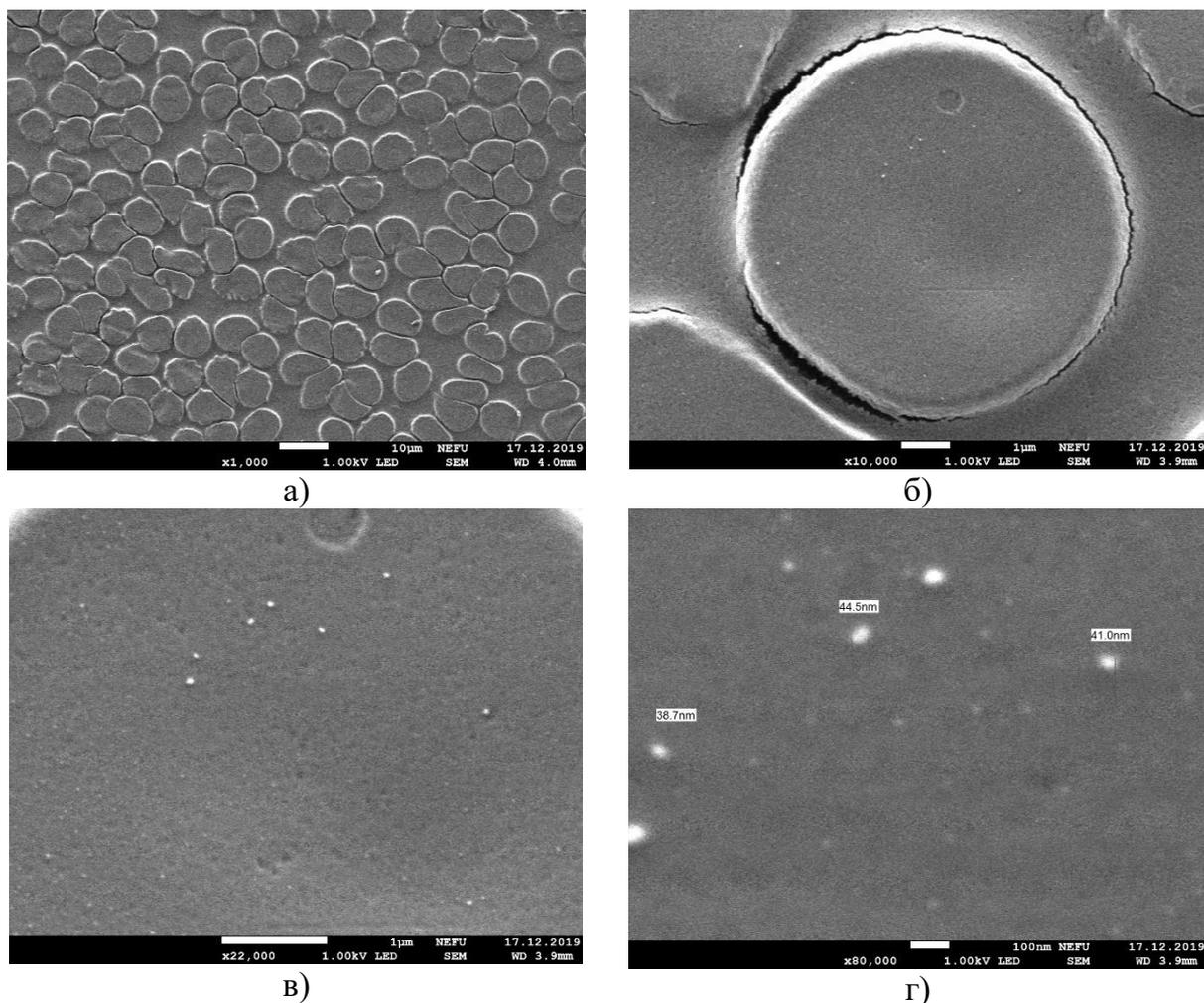


Рисунок 3.3. СЭМ-изображения капиллярной крови пациента с ХМПГН: 1) эритроцитов — а) и б) при увеличениях 1000х и 10 000х соответственно; 2) НРС — в) и г) при увеличениях 22 000х и 80 000х соответственно.

Из рисунка 3.4 следует, что существуют отличия в морфологии эритроцитов крови контрольного образца от морфологии эритроцитов образца крови пациента с ХМПГН. Снимки были получены при условиях: 1) ускоряющее напряжение равнялось 1,00 кВ; 2) рабочее расстояние — WD равнялось 3,7 мм. В отличие от обнаруженных ранее круглые формы НРС пациента с ХМПГН в данном случае НРС имеют «хлопьеобразную форму». Такие НРС наблюдались на поверхности эритроцитов крови больных РШМ после того, как образцы крови с эритроцитами с НРС подвергали шоковой заморозке путем охлаждения их до температуры жидкого азота [161].

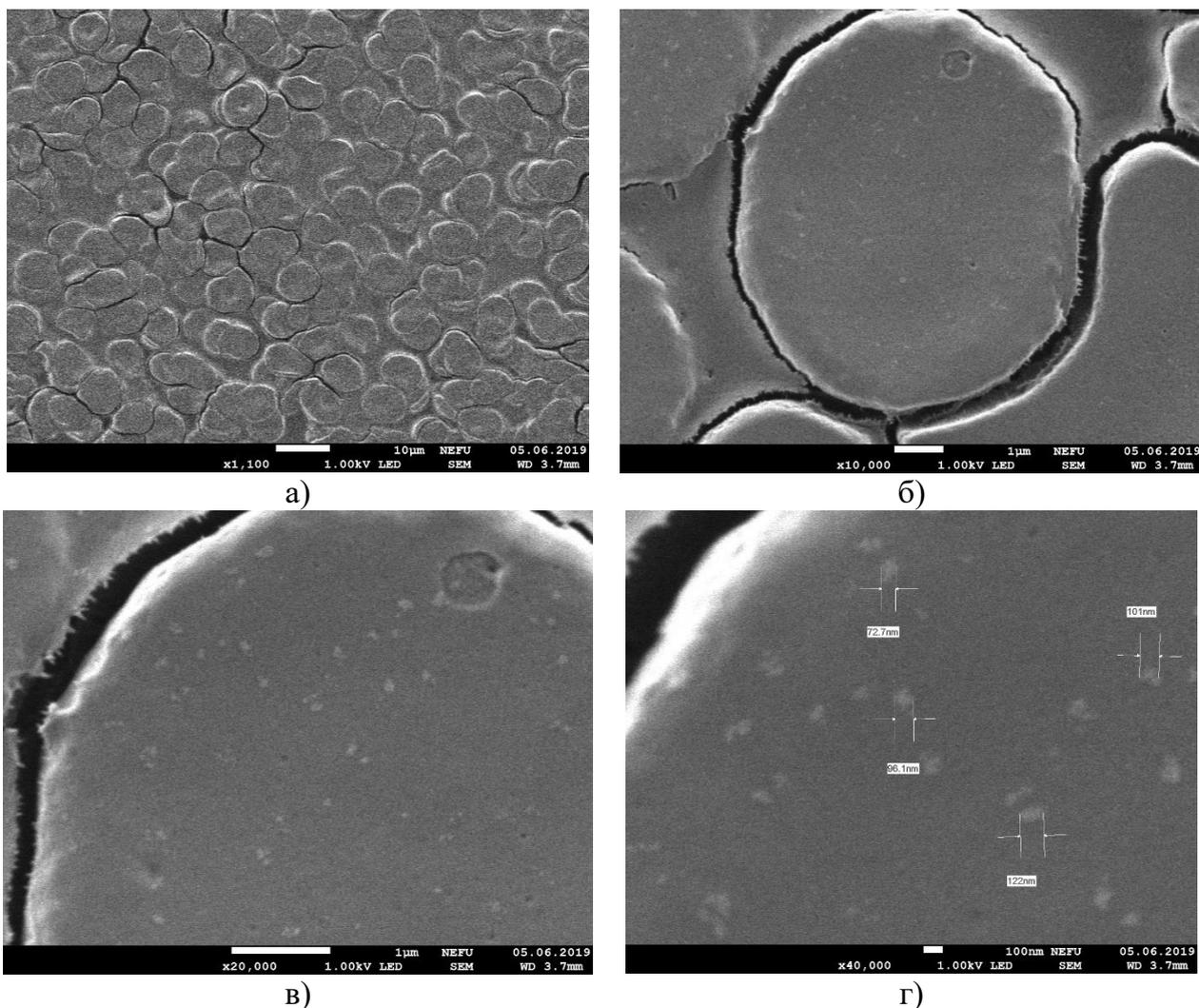


Рисунок 3.4. СЭМ изображения контрольного образца капиллярной крови: 1) эритроцитов — а) и б) при увеличениях 1000х и 10 000х соответственно; 2) НРС — в) и г) при увеличениях 20 000х и 40 000х соответственно.

На рисунке 3.5 показаны изображения эритроцитов при аналогичном увеличении и ускоряющем напряжении, но при различных значениях фокусного расстояния.

Отметим, что сравнение СЭМ изображений при разных значениях рабочего расстояния  $WD$  показывает, что качество изображений поверхности эритроцитов заметно отличается. Даже небольшое отклонение в 0,1 нм  $WD$  приводит к заметному изменению качества изображений. Например, на рисунке 3.4 в) и г) доказано, что при  $WD = 3.7$  нм изображения НРС размываются. А наиболее оптимальным значением рабочего расстояния при низком ускоряющем напряжении является  $WD = 3.9$  нм (рисунок 3.5 б). Еще раз необходимо отметить, что при условии  $WD = 3.9$  нм есть возможность получить изображения НРС при увеличении в 80 000 раз. И в то же время из рисунка 3.5 г) следует, что при  $WD = 4.1$  нм поверхность эритроцита уже в 1 000х увеличении кажется идеально гладкой, ровной и на них НРС не наблюдаются.

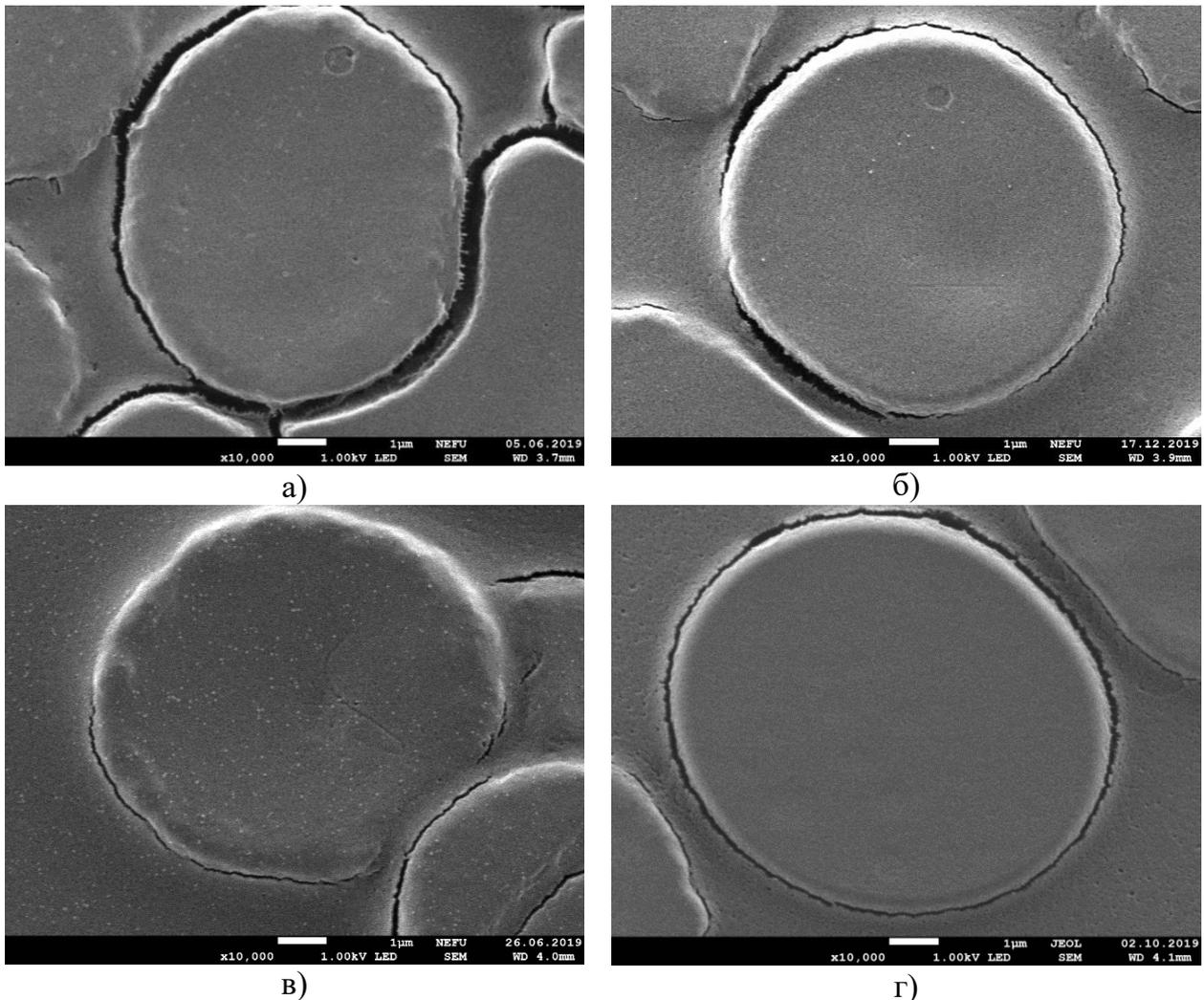
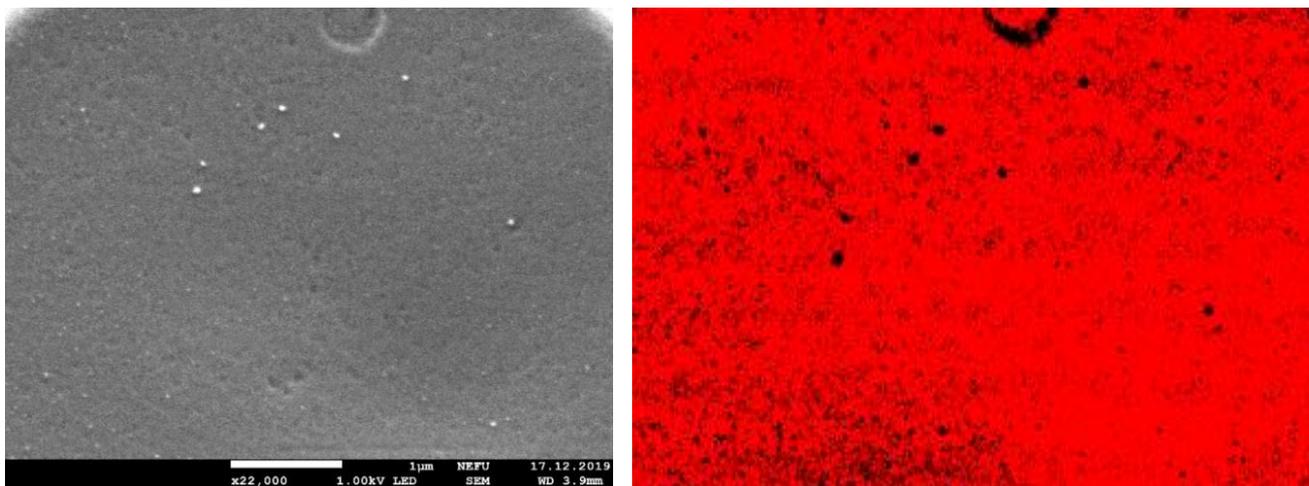


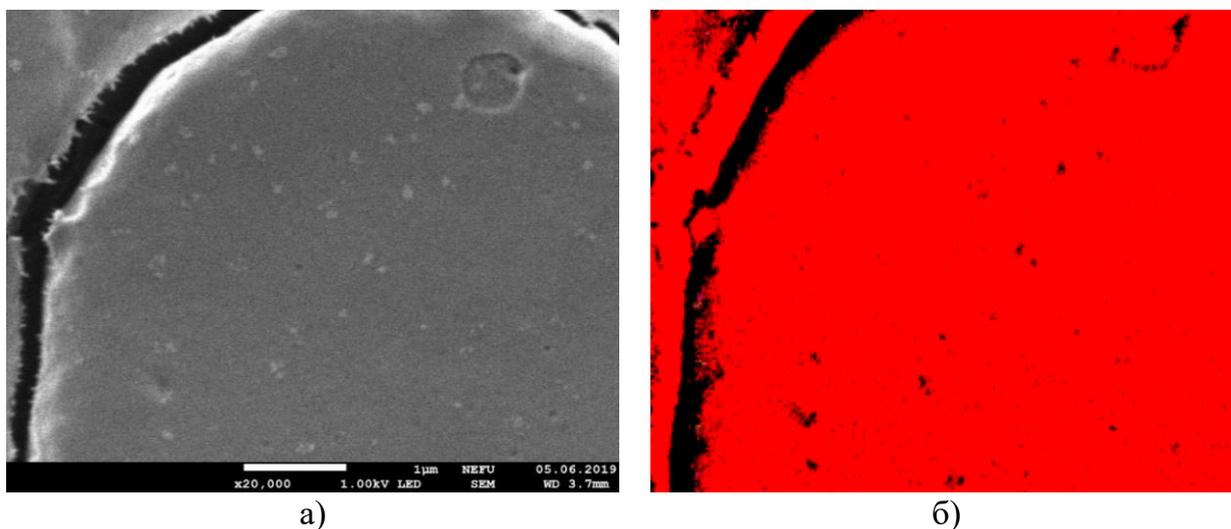
Рисунок 3.5. СЭМ-изображения капиллярной крови пациента с ХМПГН: 1) эритроцитов – а), б), в), г) при увеличениях 10 000х и  $WD = 3.7$  нм,  $WD = 3.9$  нм,  $WD = 4.0$  нм  $WD = 4.1$  нм соответственно.

Полученные с помощью СЭМ изображения возможно обработать с помощью методов машинного зрения. Например, такие методы имеются в программном обеспечении LabView2013 фирмы National Instruments [162]. При обработке изображений из-за не оптимально подобранных параметров СЭМ возникает проблема с оконтуриванием, выделением эритроцитов и НРС. Оконтуривание эритроцитов проводится при увеличении в 1000 раз. Благодаря использованию программы возможно точно и быстро посчитать количество дисморфных эритроцитов и НРС. На рисунке 3.6 представлена обработка изображения (рисунок 3.3 в). Установлено, что после предложенной обработки можно четко выявить контуры НРС черным цветом относительно всего фона. В дальнейшем возможно произвести фильтрацию для удаления мелких шумовых объектов. Благодаря выделению НРС в дальнейшем можно произвести подсчет их количества и их сортировку по размерам.



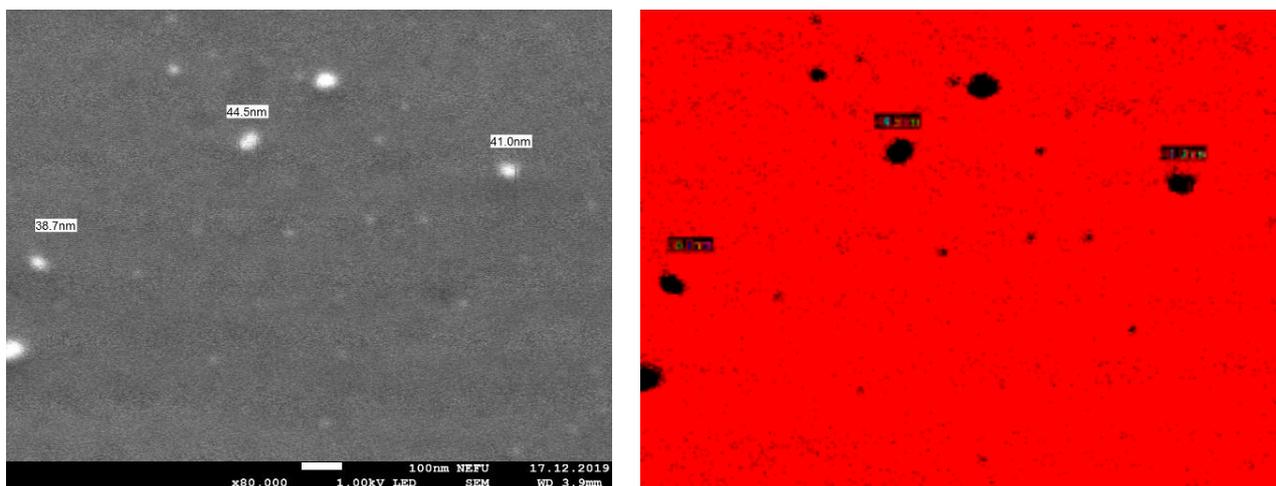
а) б)  
Рисунок 3.6. Снимки до обработки а) и после обработки б) СЭМ изображения при  $WD=3,9$  мм.

На рисунке 3.7 представлена обработка изображения, представленного на рисунке 3.4 в). Изначально, на снимке имеются НРС, характеризующиеся хлопьевидной формой на поверхности эритроцита. Но при обработке из-за плохого качества снимка некоторые объекты не выделяются программой (рисунок 3.7. б). Особенно этот эффект заметен по краям эритроцита. Недостатком данной методики является то, что объекты, которые не являются НРС, такие как выемки и сквозные отверстия в мембране, программа может обозначить как НРС.



а) б)  
Рисунок 3.7. Снимки до обработки а) и после обработки б) СЭМ изображения при  $WD=3,7$  мм.

На рисунке 3.8 представлена обработка изображения при увеличении в 80 000 раз. Видно, что при таком изображении намного четче выделяются НРС и шумы изображений почти исчезают из-за больших отличий в размерах.



а) б)  
Рисунок 3.8. Снимки до обработки а) и после обработки б) СЭМ изображения при  $WD=3,9$  мм и увеличении 80 000х.

На основании произведенных обработок СЭМ изображений наглядно показано, что подбор оптимальных параметров при измерении мазков крови позволяют получить более обширную и достоверную информацию.

В работах [156, 163] обсуждения результатов и выводы основывались на определении размеров НРС на поверхности эритроцитов. Очевидно, что определение размера этих структур является основной и важной частью исследования. Соответственно, улучшение качества изображения является необходимым условием для максимально точной идентификации размеров НРС. В будущем планируется использовать наиболее точные подходы для изучения морфологии эритроцитов и НРС на их поверхности. Один из таких подходов представлен ниже. Он реализуется путем улучшения контуров НРС на поверхности эритроцита на СЭМ изображении при увеличении в 100 000 раз. При больших увеличениях, изображения полученные на СЭМ могут быть искажены большим количеством шумов. В нашем случае при визуализации с высоким разрешением часто возникают импульсный и гауссовский шумы.

При данном увеличении, размеры наблюдаемых НРС составляют около 10-50 пикселей, в то время как без шума может составлять 3-5 пикселей. В таких условиях измерение размеров НРС с высокой точностью вызывает затруднения.

Для уменьшения влияния шума, вводятся два метода шумоподавления: медианный фильтр и метод минимизации градиента L0. Медианный фильтр полезен для уменьшения импульсного шума, тогда как метод минимизации градиента L0 демонстрирует хорошие результаты при фильтрации шумов при сохранении четких краев исследуемого объекта. Медианный фильтр очень прост. Мы рассматриваем небольшой центроид в пикселе  $k$ , а

вектор  $I_k = (I_{k,1}, I_{k,2}, I_{k,n})$  для представления значения всех пикселей в данной области. Затем, сортируем  $I_{k,1}, I_{k,2}, I_{k,n}$  в порядке возрастания и выход фильтра определяем как  $\bar{I}_k = I_{k, \lfloor n/2 \rfloor}$ , где  $\lfloor n/a \rfloor$  — наибольшее натуральное число, меньшее  $n/a$ . Задаем размер области  $w=5$ ,  $n = 5 \times 5$ . Как следует из рисунка 3.9. (в середине первого ряда), импульсный шум значительно подавлен по сравнению с исходным изображением. Далее, для более точного вычисления размеров НРС, используем метод минимизации градиента L0 для формирования более четких краев объектов. Математически этот метод основан на системе оптимизации и может сохранять основные края НРС, одновременно сглаживая небольшие локальные градиенты [164].

Как показано на рисунке 3.9 (вверху справа), контур НРС теперь очень четкий по сравнению с исходным изображением. Размер легко вычислить, посчитав количество пикселей. На рисунке 3.9 (внизу) мы также сравнили результаты в одномерном случае. Очевидно, что исходные данные (синий) имеют сильный импульсный шум, и медианный фильтр (красный) может уменьшить некоторый шум, но контуры НРС все еще остаются нечеткими, в то время как этот остаточный шум можно дополнительно уменьшить с помощью метода минимизации градиента L0 (желтый).

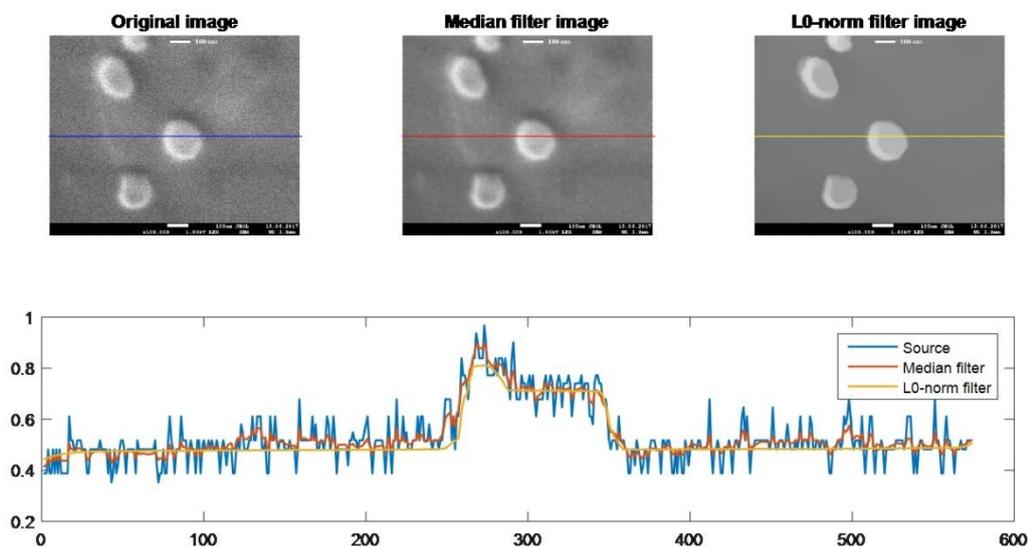


Рисунок 3.9. Результаты фильтрации изображений микроскопа.

### 3.1.2. Разработка наноструктурированных подложек для исследования наноразмерных структур на эритроцитах

При использовании электронной микроскопии в биологии для повышения контрастности изображения на поверхности клеток наносят металлы (например, Au, Pt, Ni), что обычно затрудняет изучение присутствия НРС на клетке. В настоящее время

широко используется новый класс электронных микроскопов для изучения морфологии биологических объектов при низких напряжениях и без осаждения металла на объект [165-167]. Известно, предметное стекло, которое используется в качестве подложки при исследовании сухих биообразцов и которое является диэлектриком, существенно ухудшает качество изображения из-за накопления электрического заряда. В связи с этим для исследования эритроцитов нами предложен метод формирования наноструктурированной подложки с использованием восстановленного оксида графена (ОГ). Важно, что благодаря тому, что подложки ОГ содержат кислородные группы, общая электропроводность системы увеличивается за счет их удаления и введения наночастиц серебра (Ag). С помощью электронной микроскопии можно выявить изменения морфологии эритроцитов при патологии и, вероятно, исследовать наличие биологических частиц (вирусов) на поверхности эритроцитов [165-167].

В данной серии экспериментов была поставлена задача разработки методики формирования наноструктурированной подложки из композита оксида графена с наночастицами серебра для изучения изменений для изучения изменений морфологии эритроцитов методом СЭМ при патологии [168-172].

Суспензию ОГ получали окислением графита по модифицированному методу Хаммерса [173-175]. Для исследования свойств нанокompозитов был использован СЭМ, оснащенный супергибридным объективом. Использование модификации СЭМ JSM 7800F позволяет получать изображения поверхности эритроцитов без нанесения электропроводящих покрытий. Для исследования наночастиц серебра и мазков крови использовали ускоряющее напряжение 6 кВ и 1 кВ соответственно. Вольт-амперные характеристики измерялись четырехзондовым методом Ван дер Пау (Escoria 5500 HMS).

Электронно-микроскопические изображения поверхности нанокompозита rGO-Ag (нанокompозит восстановленного оксида графена с наночастицами серебра) при различных увеличениях представлены на рисунке 3.10 а-в. Установлено, что размеры плоских наночастиц находятся в диапазоне от 20 до 200 нм. Более 60% частиц имеют размеры от 60 до 100 нм. Измерения методом ЭДС участков наночастиц, представленных на рисунках 3.10 а-в, показали наличие серебра (22,1 ат.%). Дополнительно содержатся кислород (51,5 ат.%), кремний (9,0 ат.%) и углерод (17,4 ат.%). При измерении небольших площадей методом ЭДС размер сканирования, при котором определяется элементный состав, может превышать размеры выбранной точки. Это является источником ошибки,

обусловленной содержанием элементов (C, Si и O) в прилежащих областях. Высокое содержание кислорода и кремния в полученных результатах можно объяснить влиянием элементного состава подложки SiO<sub>2</sub>.

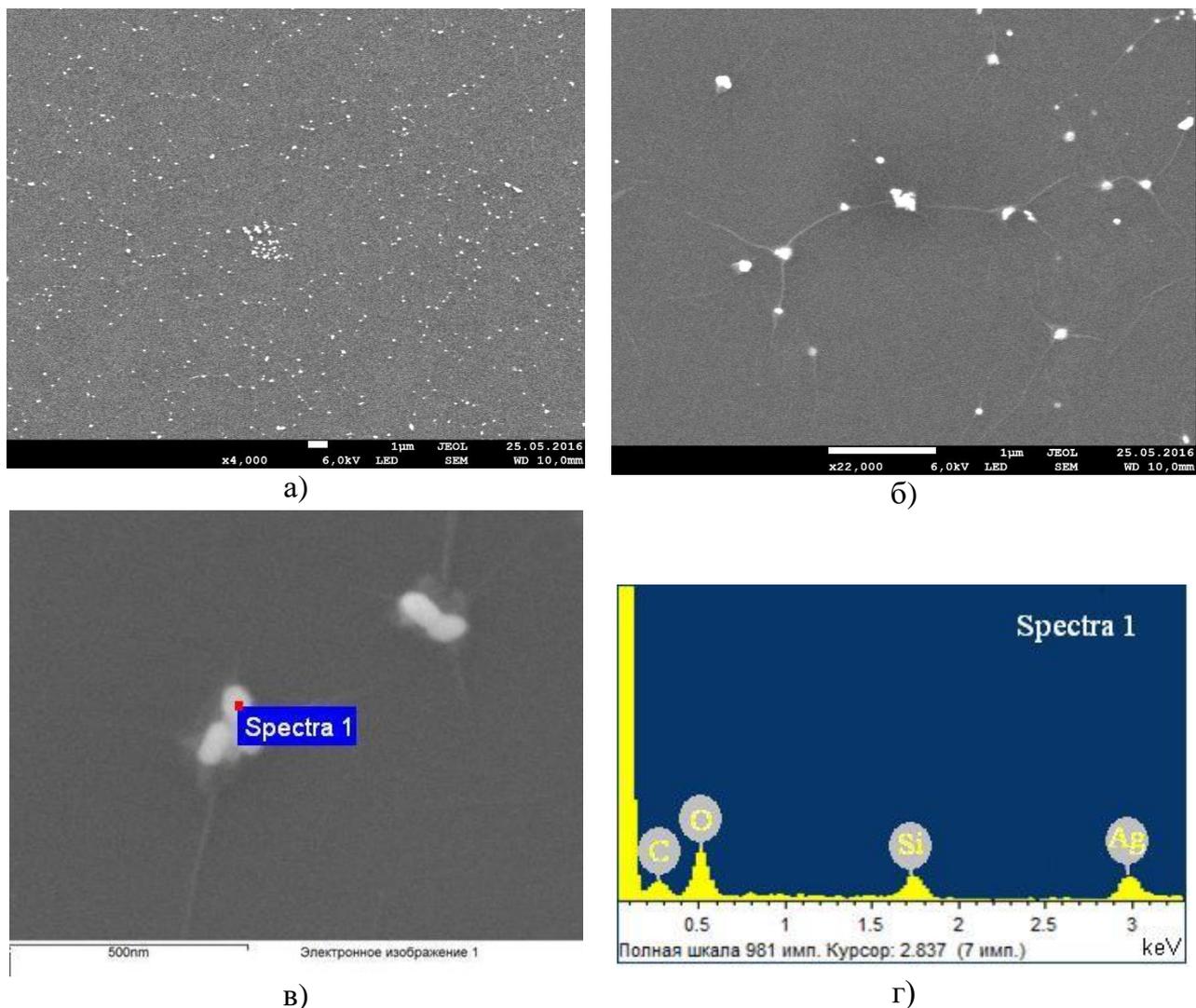


Рисунок 3.10 СЭМ изображение поверхности оксида графена с наночастицами серебра при различных увеличениях (а-б); в) выбранная точка измерения Spectra 1; г) ЭДС в точке Spectra 1.

Для определения толщины пленок нанокompозита rGO-Ag кончиком металлической иглы делались надрезы. Высоту краев сформированной ступеньки измеряли методом АСМ. Сечение края по линии, показанной на рисунке 3.11а, представлено на рисунке 3.11б. Оценки высот в разных местах показали, что толщина пленок нанокompозита rGO-Ag не превышает 10 нм. В то же время измерения как СЭМ, так и АСМ показывают, что латеральные размеры наночастиц на порядок больше.

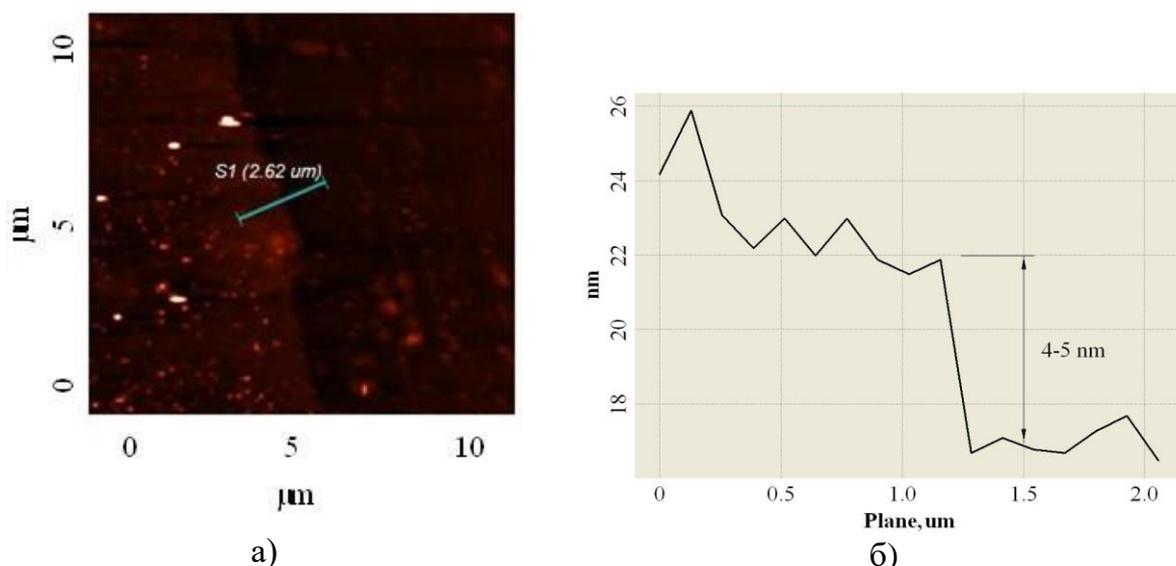


Рисунок 3.11. АСМ-изображение порога на поверхности нанокompозита rGO-Ag (а) и его разрез (б).

Спектры комбинационного рассеяния нанокompозита rGO-Ag, возбуждаемые лазерным излучением с длиной волны 532 нм, представлены на рисунке 3.12.

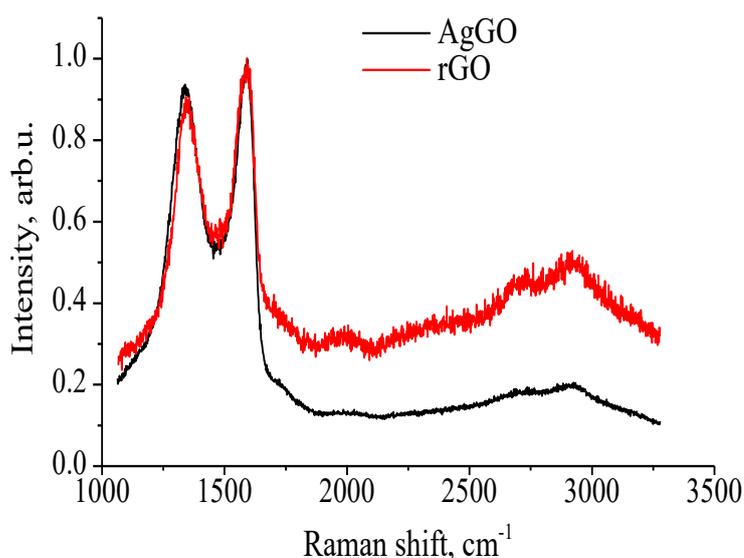


Рисунок 3.12. Спектры комбинационного рассеяния нанокompозита rGO-Ag (нанокompозит восстановленного оксида графена с наночастицами серебра).

Полосы D и G, наблюдаемые при  $\sim 1350 \text{ см}^{-1}$  и  $\sim 1600 \text{ см}^{-1}$  соответственно, являются основными модами комбинационного рассеяния света, наблюдаемыми в ОГ. Полоса G соответствует оптическим фононам E<sub>2g</sub> в центре зоны Бриллюэна [176-179]. Полоса D связана с дышащими модами шестиатомных колец углерода и требует наличия дефектов для активации [176-179].

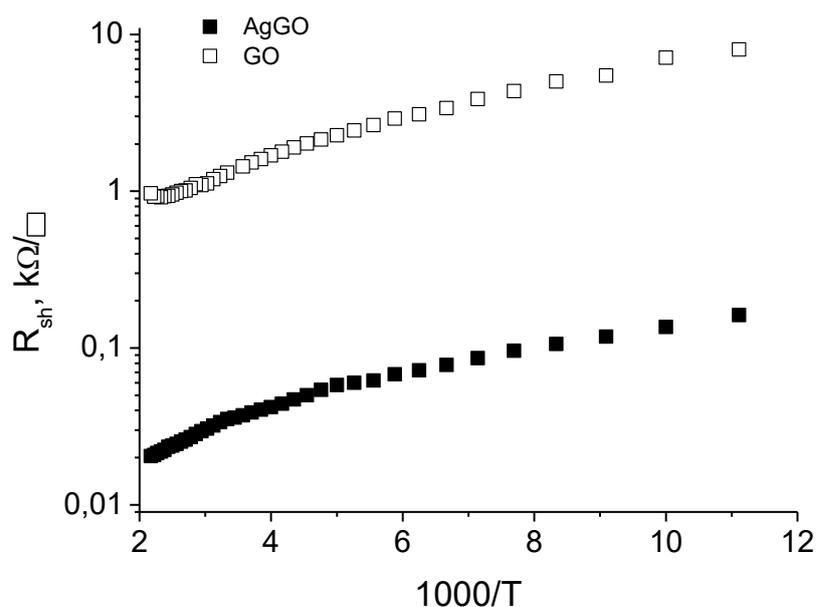


Рисунок 3.13. Поверхностное сопротивление нанокompозита rGO и rGO\_Ag в зависимости от  $1000/T$ .

Обертон D-пик (2D-пик) наблюдается при  $2700 \text{ см}^{-1}$  и обусловлен двойным резонансным переходом [176-179]. Этот пик, в отличие от полосы D, наблюдается даже при отсутствии дефектов. Полоса D + G при  $\sim 2930 \text{ см}^{-1}$  также активирована дефектами [180,181]. Соотношение интенсивностей D- и G-пигов широко используется для характеристики структуры кристалла и дефектов в материалах на основе графена [180,181]. Это соотношение составляет 0,94 и 0,90 для нанокompозита и ОГ соответственно. Из этого следует, что при формировании нанокompозита rGO-Ag происходит незначительное увеличение дефектности структуры ОГ.

На рисунке 3.13 представлены температурные зависимости поверхностного сопротивления нанокompозита rGO-Ag и восстановленного ОГ. Сопротивления определялись по вольт-амперным характеристикам, имеющим линейную форму. Как следует из рисунка, во всем диапазоне температур от 800 до 4500 К значения слоевых сопротивлений нанокompозита rGO-Ag в 40–50 раз меньше, чем для ОГ. Снижение сопротивления ОГ при введении наночастиц серебра может быть связано как с увеличением концентрации носителей заряда [182], так и с модификацией механизма транспорта носителей заряда [183, 184].

Полученный композит rGO-Ag был использован для изучения вирусного этиологического фактора нефропатий с синдромом гематурии. Присутствие таких НРС на поверхности эритроцитов наблюдалось у больных болезнью Берже и другими видами

нефропатии [166,167], а также у больных РШМ. На рисунке 3.14 представлены изображения поверхности образца эритроцитов девочки 10 лет с хроническим гломерулонефритом при увеличении 50 000 на подложке из стекла.

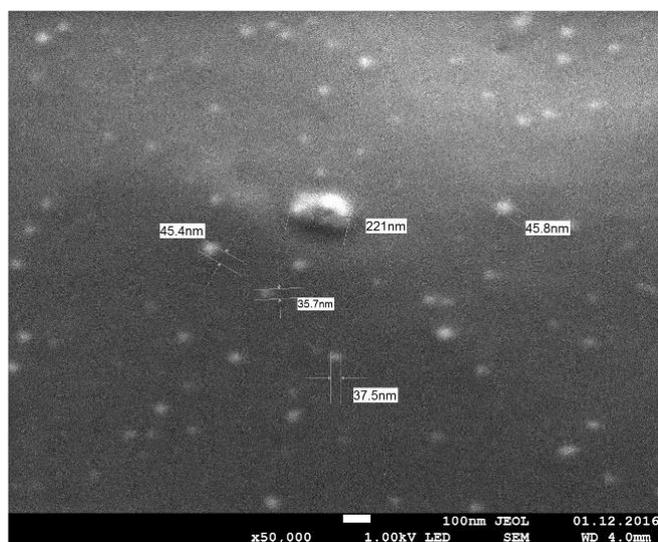


Рисунок 3.14. СЭМ-изображение НРС с их размерами на поверхности эритроцитов на сухом чистом полированном стекле при гломерулонефрите, увеличение 50 000×.

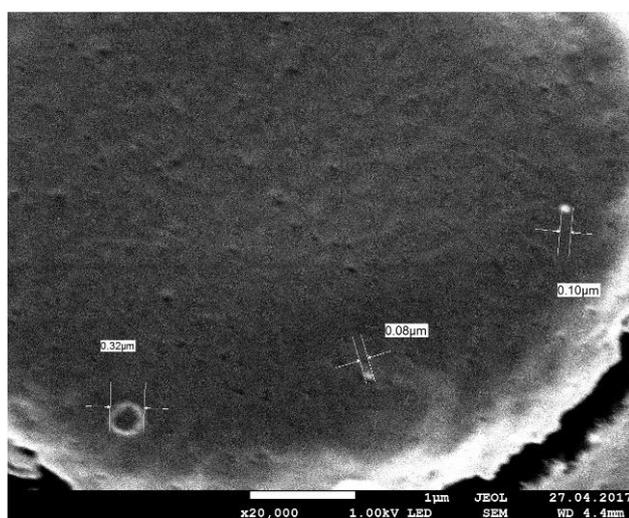
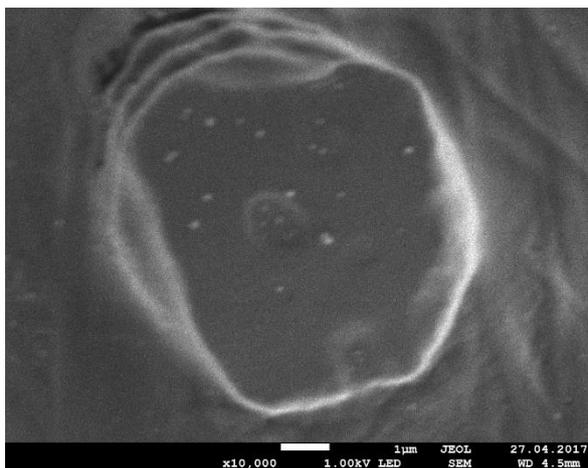


Рисунок 3.15. СЭМ-изображение поверхности эритроцитов образца крови на сухом чистом полированном стекле при раке шейки матки, увеличение 20 000×.

На стеклянной подложке получено изображение образца венозной крови пациентки 47 лет с диагнозом РШМ при увеличении в 20 000 раз (рисунок 3.15). На рисунке 3.16 представлены изображения поверхности дисморфных эритроцитов при увеличениях 10 000 и 20 000 на нанокompозитной подложке rGO-NPs. На рисунках 3.17 и 3.18 представлены изображения поверхности эритроцитов с НРС при хроническом гломерулонефрите на наноструктурированных подложках (увеличение 100 000x) и при РШМ (увеличение 30 000x).



а)



б)

Рисунок 3.16. Изображение поверхности образца эритроцитов крови с НРС на СЭМ на нанокompозите rGO-Ag, увеличение 10000× (а) и 20000× (б).

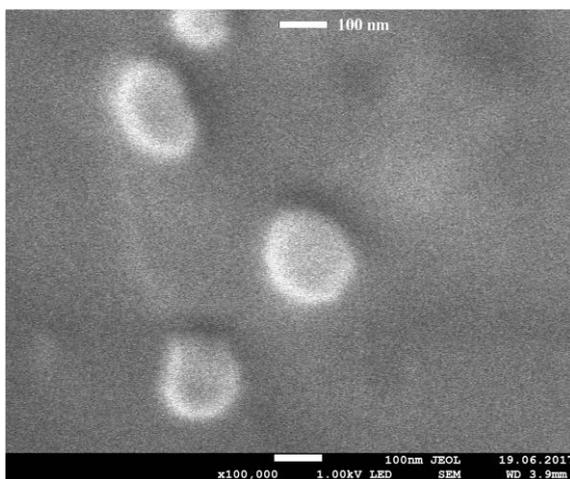


Рисунок 3.17. СЭМ-изображение поверхности эритроцитов образца крови на подложке из оксида графена с наночастицами серебра при хроническом гломерулонефрите, увеличение 100 000×.

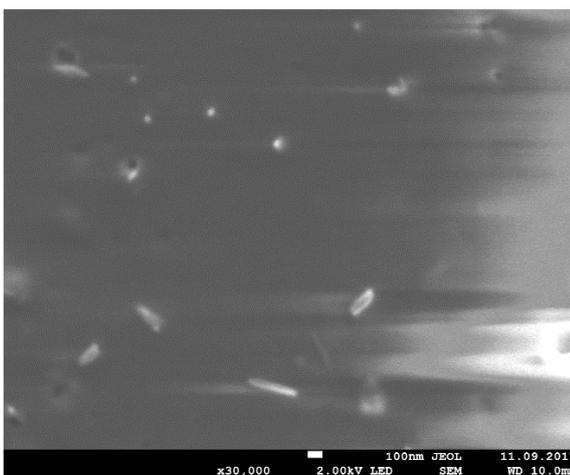


Рисунок 3.18. СЭМ изображение поверхности эритроцитов образца крови на подложке из оксида графена с наночастицами серебра при раке шейки матки, увеличение 30 000×.

Из полученных изображений следует, что НРС на поверхности эритроцитов различаются по размеру и форме при различных заболеваниях. Исследования показали, что СЭМ изображения НРС на поверхности эритроцитов на стеклянной подложке становятся нечеткими при увеличениях более 50 000х, тогда как на наноструктурированных подложках изображение НРС достаточно хорошего качества получается при увеличении 100 000х. Кроме того, при увеличении 30 000 наблюдается различие форм НРС на поверхности подложек из оксида графена, тогда как на стеклянных подложках наблюдать невозможно.

Исследования при РШМ во время лучевой терапии свидетельствуют об изменении морфологии эритроцитов, появлению на поверхности клетки НРС, число которых зависит от продолжительности терапии. В отличие от изображений, полученных в работах [165,166], на этих изображениях видны четкие, наноразмерные объекты (НРС), которые можно отнести к вирусам аналогичных размеров. Отметим, что природа этих объектов не связана с наночастицами серебра, так как для их наблюдения в электронном микроскопе требуется ускоряющее напряжение ~6 кВ, а здесь используется напряжение 1 кВ. Кроме того, из результатов элементного анализа следует, что эти НРС не содержат серебра, но содержат углерод (77,8 ат.%), кислород (19,1 ат.%), натрий (1,7 ат.%), серу (0,8 ат.%) и железо (0,6 ат.%). По химическому составу НРС ближе к органическим веществам, входящим в состав, например, вируса. Отметим, что в аналогичных в экспериментах использовались мазки крови на стеклянных подложках, при увеличениях более чем 50 000х не удалось получить четких изображений этих образований.

Итак, использование подложек из нанокompозита rGO-Ag позволило более четко выявить форму и размеры этих объектов (рисунок 3.16-3.18). Удельные сопротивления стекла, кремния, ВОГ (rGO), ВОГ с наночастицами серебра (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. Увеличение электропроводности подложек позволяет устранить накопление зарядов с поверхности исследуемых биообразцов, т.е. улучшить качество изображения объектов при электронном облучении в СЭМ.

Итак, использование нанокompозитных субстратов rGO-Ag должно повысить эффективность и качество диагностики сложно диагностируемых видов гломерулонефритов и РШМ.

Таким образом, 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 оптимального рабочего расстояния  $WD=3,9$  мм, ввиду того, что рабочее расстояние заметно влияет на качество изображения. А качество изображений, очевидно, влияет на проведение анализа морфологии эритроцитов. Представленные методы улучшения качества изображения и, основанные на них методы автоматизации обработки данных, могут способствовать разработке новых подходов метода дифференциальной диагностики видов гломерулонефритов с применением СЭМ, а также в изучении механизмов развития заболевания, особенностей его проявления на клеточном уровне.

В результате исследований электрических характеристик установлено, что синтезированный нанокompозит rGO-Ag обладает более высокими значениями электропроводности, чем исходные частично восстановленные образцы ОГ. В качестве покрытия подложки для исследования мазков крови использовали нанокompозит rGO-Ag. При исследовании мазков крови, взятых у пациентов с выявленными признаками макрогематурии, методом СЭМ были обнаружены биологические НРС. Эти объекты на поверхности эритроцитов сравнимы по размерам с вирусными частицами.

### **3.2. Использование сканирующей электронной микроскопии для исследования морфологии и НРС эритроцитов**

В данном параграфе рассматриваются возможности применения СЭМ (в установленных режимах работы, которые были определены выше) при исследовании образцов крови пациентов с различными заболеваниями для изучения морфологии эритроцитов, а также образцов синовиальной жидкости, мочи для определения их свойств в патологии.

Использование возможностей современного оборудования, такого как СЭМ, может позволить получить важную дополнительную информацию, которую можно использовать для внедрения новых методов комплексного исследования анализов крови в диагностировании почечных заболеваний с синдромом гематурии. Кроме того, применение СЭМ в исследовании РШМ на молекулярном и клеточном уровнях может позволить получить новые знания о развитии данной патологии, в том числе явления

рецидива и метастазирования. В этой серии экспериментов получены результаты исследования морфологии эритроцитов людей, умерших от различных причин смерти (ранения, переохлаждение) методом СЭМ.

Установлено, что качество СЭМ изображений при гораздо более больших увеличениях по сравнению с увеличениями оптических микроскопов и одновременной возможности проведения элементного анализа повышают достоверность диагностики заболеваний. Определено, что СЭМ является весьма информативной методикой обследования больных различными заболеваниями. Перспективность ее использования заключается в выявлении данных заболеваний на ранних стадиях и возможности более детальной оценки динамики лечения.

Таким образом, представленные в этой главе результаты свидетельствуют о широком применении СЭМ и в качестве аппарата визуализации биологических образцов нанометрового диапазона исследований при низких энергиях ускорения электронных пучков предполагает создание новых модификаций СЭМ высокого разрешения, предназначенных для исследования биологических образцов.

### **3.2.1. Исследования морфологии и НРС эритроцитов при гематурии методом сканирующей электронной микроскопии и инфракрасной спектроскопии**

Известно, что среди многочисленных нефропатий гематурия — единственный симптом заболевания почек и мочевыводящих путей [185]. При гломерулярной гематурии эритроциты, проходящие через гломерулы, меняются — становятся дисморфными, т. е. нетипичной формы с гладкой или неровной структурой и формы акантоцитов, известные также как клетки Микки-Мауса. При IgA-нефропатии (болезнь Берже) гематурия является одним из основных симптомов [186]. В настоящее время причины возникновения большинства гематурий, особенно болезни Берже, не изучены на клеточном и молекулярном уровнях. Поэтому важно внедрять новые современные методы исследования изменения морфологии эритроцитов для развития терапии и проведения реабилитационных мероприятий. Необходимость новой методики диагностики обусловлена также ростом почечной патологии не только среди детей в Республике Саха (Якутия) (РС (Я)), но и во всем мире (в США распространение заболевания варьируется в пределах 2–10 %, в Азии — до 50 %, в Японии 18–40 %) [187, 188].

В связи с этим были проведены исследования патологии путем определения изменения морфологии эритроцитов и выявления не идентифицированных НРС с помощью СЭМ высокого разрешения JSM-7800F (JEOL, Япония) [189].

Использование возможностей СЭМ позволит получить важную дополнительную информацию, которую можно использовать для внедрения новых подходов в методах комплексного исследования анализов крови для исследования и диагностирования заболеваний почки с синдромом гематурии [160, 186].

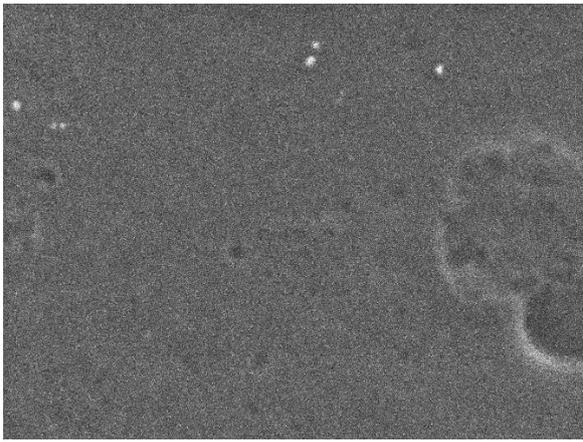
Объектами исследования были сухие мазки крови 20 детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии, проходивших терапию в РБ №1 — НМЦ медицины РС (Я), взятой натошак с помощью вакуумных систем забора крови. Для получения сухих мазков каплю крови из пробирки наносили микропипеткой на обезжиренное предметное стекло, расположенное горизонтально. С помощью сухого чистого шлифованного стекла получали мазок. Максимальный диаметр образцов составлял 20 мм. Исследования проводили при ускоряющих напряжениях 1 и 2 кВ.

Для приготовления мазков мочи 2,50 мл мочи центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин. После этого две капли осадка помещали на предметное стекло, оставляли в горизонтальном положении, и осадок распределяли по стеклу.

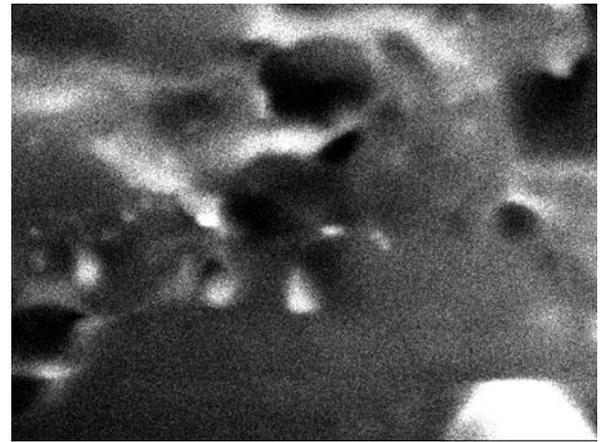
В результате проведенной работы [167] были получены СЭМ изображения, на котором кроме дисморфных эритроцитов в исследуемых объектах присутствуют НРС, сопоставимые с размерами вирусов. Существование НРС органического происхождения на поверхности эритроцитов является еще одним подтверждением предположения о возможном вирусном этиологическом факторе возникновения гематурии у пациентов [190].

Результаты исследования морфологии эритроцитов в неокрашенных сухих мазках крови для случая IgA нефропатии представлены на рисунке 3.19, *а*.

При проведении исследований выявлены такие изменения поверхности клетки, как существование ямок с плоским дном и НРС. Отметим, что в образцах мочи были обнаружены эритроциты (рисунок 3.19, *б*) и было установлено, что на поверхности клетки локализованы частицы размером 48–58 нм.



а)



б)

Рисунок 3.19. СЭМ изображения эритроцита при IgA нефропатии: увеличение в 65 000 раз при 1,5 кВ (а); увеличение в 100 000 раз при 2 кВ (б).

При нефротическом синдроме в образцах мочи поверхность эритроцита имеет сложный рельеф, эритроцит окружен множеством мелких вытянутых зернообразных структур длиной 1,5 мкм и шириной 0,3 мкм, между которыми локализованы структуры шириной 50 нм (рисунок 3.20).

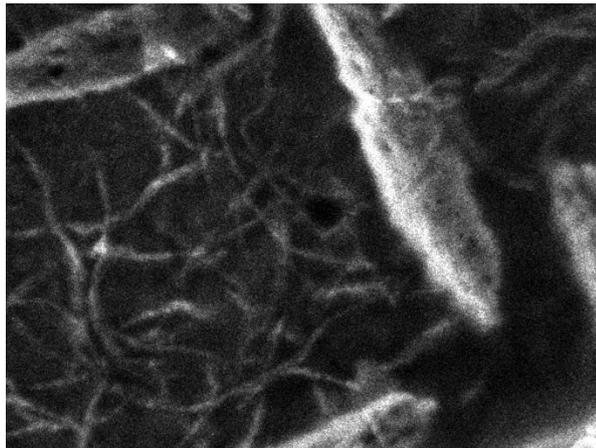


Рисунок 3.20. СЭМ изображение внешней среды эритроцита при нефротическом синдроме, увеличение в 100 000 раз при 2 кВ.

Кроме того, в моче обнаружены не только эритроциты, но и кристаллы, на которых обнаружены светящиеся точки различной формы и размеров (рисунок 3.21). Размеры кристаллов варьируются от размеров близких к размерам эритроцитов до размеров намного превышающих их. На поверхности кристаллов наблюдались нанометровые объекты двух видов. Некоторые НРС имели размеры от 130-250 нм, а другие были похожи на НРС, наблюдающиеся при IgA нефропатии.

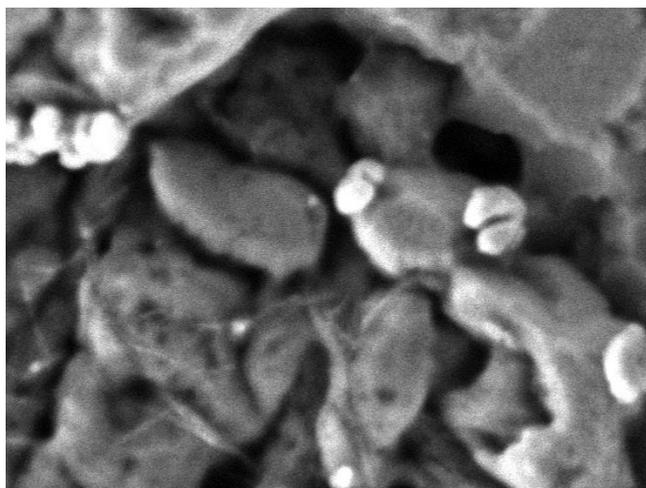
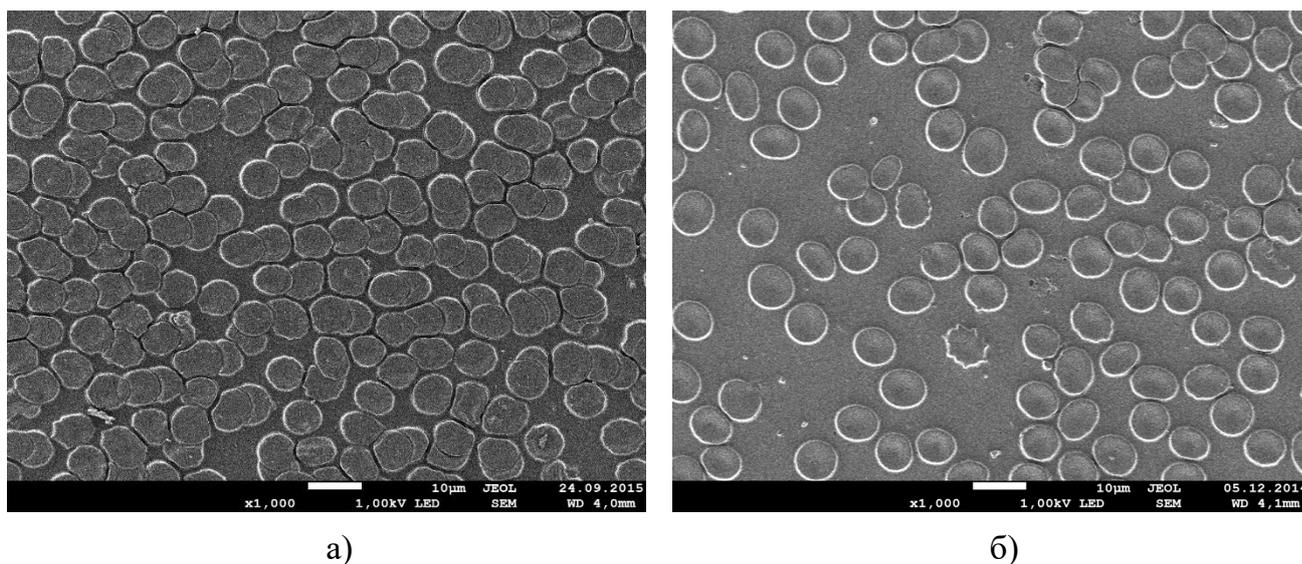


Рисунок 3.21. СЭМ изображение поверхности кристалла при нефротическом синдроме, увеличение в 50 000 раз при 2 кВ.

При сравнении морфологии эритроцитов мазков крови детей с синдромом гематурии и контрольной группы с помощью СЭМ были выявлены некоторые изменения (рисунок 3.22) [166].



а)

б)

Рисунок 3.22. СЭМ изображения эритроцитов крови детей: а) контрольной группы; б) с синдромом гематурии.

На основе эмпирических данных, полученных методом СЭМ, были проведены обработка и анализ результатов методами математической статистики. Результаты считали достоверно различающимися при  $p < 0.05$ . Например, при проведении измерения диаметров каждого эритроцита на рисунке 3.22а и 3.22б, представленных выше, статистическая выборка составила 113 и 94 эритроцитов соответственно. Для построения распределения размеров эритроцитов интервалы значений для линейных размеров эритроцита составляли от 5 до 10 мкм с шагом 0,5 мкм. На рисунках 3.23 и 3.24 представлены гистограмма распределения линейных размеров эритроцитов крови детей

контрольной группы и больных с синдромом гематурии и график сравнения средних значений линейных размеров эритроцитов детей контрольной группы и детей с синдромом гематурии (IgA нефропатия, геморрагический васкулит).

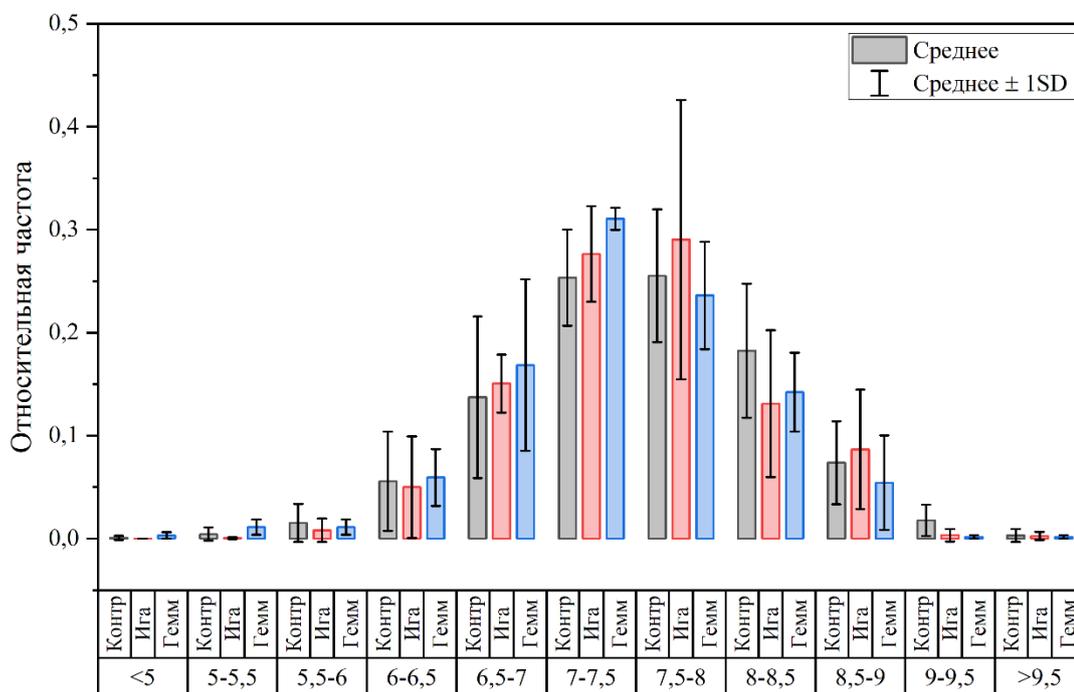


Рисунок 3.23. Гистограмма распределения линейных размеров эритроцитов крови детей контрольной группы (серый цвет) и детей с синдромом гематурии (IgA нефропатия – красный цвет; геморрагический васкулит – синий цвет).

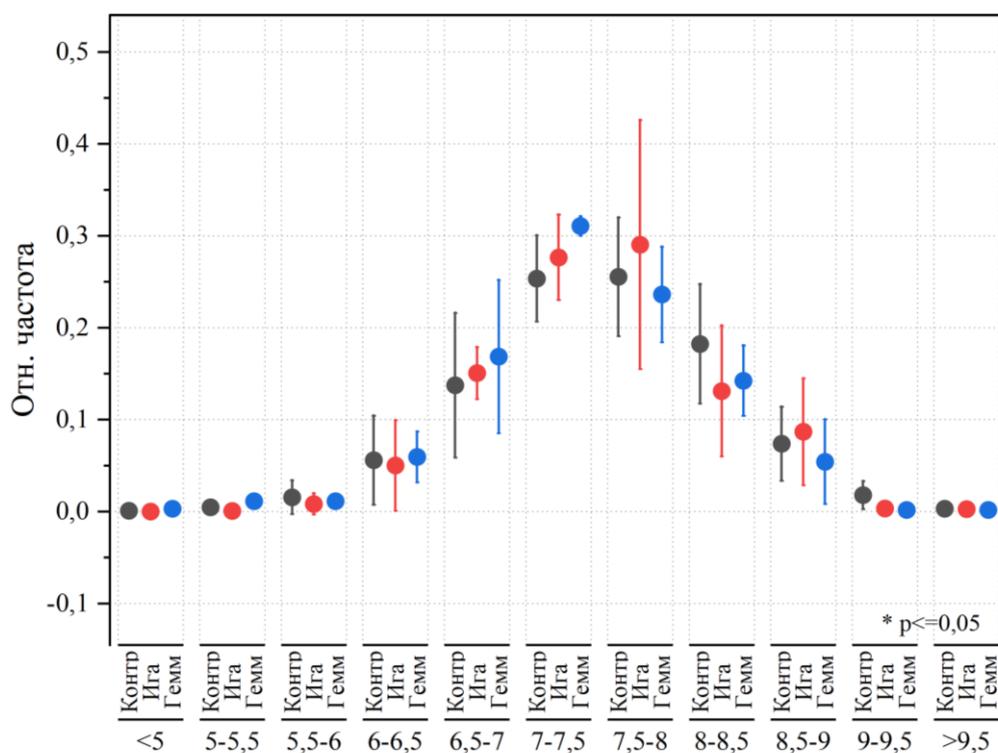


Рисунок 3.24. График сравнения средних значений линейных размеров эритроцитов крови детей контрольной группы (серый цвет) и детей с синдромом гематурии (IgA нефропатия – красный цвет; геморрагический васкулит – синий цвет).

В обоих случаях распределения размеров эритроцитов имеют экстремальный характер и подчиняется закону нормального распределения. Вычислены основные статистические характеристики и по этим данным построены графики функций плотности распределения размеров эритроцитов в крови (рисунок 3.25).

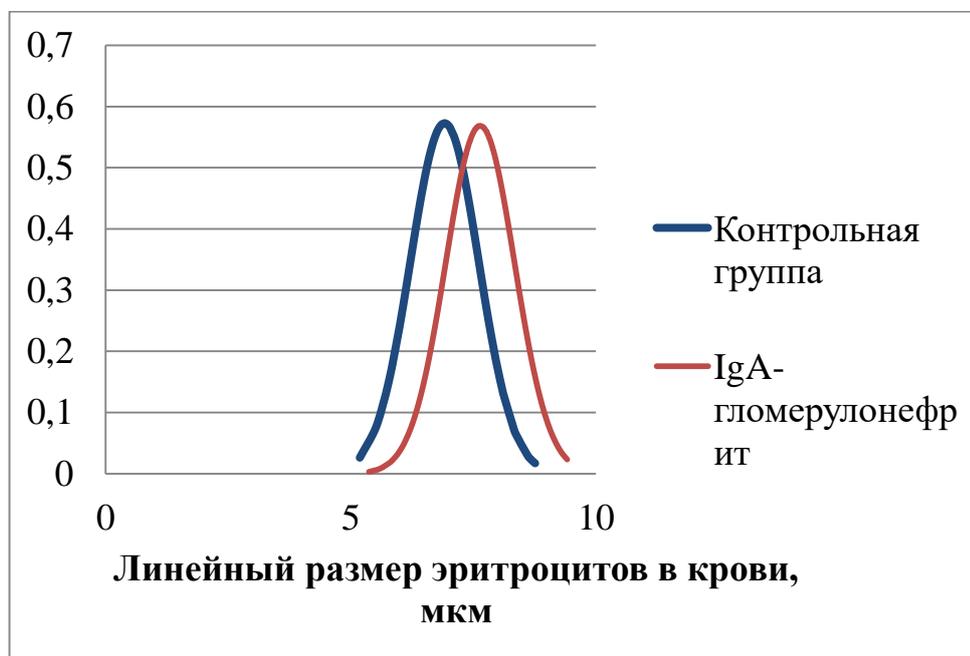


Рисунок 3.25. Функция плотности распределения размеров эритроцитов крови больных детей с синдромом гематурии (при болезни Берже).

На рисунке 3.25 представлены графики сравнения функций плотности распределения размеров эритроцитов для контрольной группы и группы больных с синдромом гематурии. Достоверными считали различия показателей крови в патологии и в норме по критерию Стьюдента. Для оценки статистической значимости результатов использовали t-критерий. По статистическим исследованиям эритроцитов при сравнении контрольной группы и группы с заболеванием Берже методом математической статистики выявлено, что распределения эритроцитов имеют вид одиночных пиков с одинаковыми ширинами на полувысоте пиков, смещенных относительно друг друга. Среднее значение линейного размера эритроцита мазков крови контрольной группы составило  $6.90 \pm 1.03$  мкм. Среднее значение диаметра эритроцитов больных с синдромом гематурии со значением  $7.64 \pm 1.14$  мкм.

Также на поверхности эритроцитов наблюдаются НРС (рисунок 3.26).

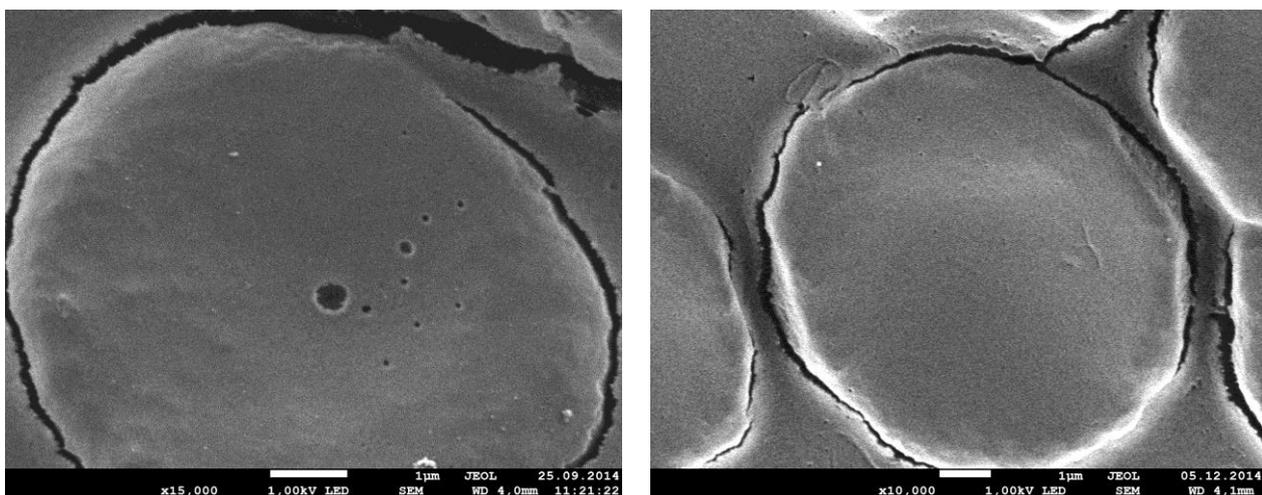


Рисунок 3.26. НРС различных размеров на поверхности эритроцитов крови больного при болезни Берже.

Исследование с помощью СЭМ крови, показало, наличие на поверхности эритроцитов НРС, что было невозможно обнаружить при исследованиях на электронных микроскопах более раннего поколения. Можно предположить, что эти объекты имеют органическое происхождение, так как многие органические объекты являются диэлектриками и при изучении с помощью СЭМ они могут быть видны как яркие светящиеся объекты. НРС имеют размеры сходные с размерами малых вирусов [191, 192] и могут являться подтверждением предположения о возможном вирусном этиологическом факторе заболевания Берже и других видов нефропатий. Дальнейшее увеличение статистики и анализ размеров НРС расширит знания о проявлениях заболевания и привнесет свой вклад в методах диагностирования заболеваний с синдромом гематурии.

Для изучения природы НРС были исследованы эритроциты мазков крови пациентов с гломерулонефритом до и после лечения в течение месяца [193].

Установлено, что до лечения в крови больных наблюдаются большое количество сцепленных эритроцитов, так называемых «монетных столбиков» (рисунок 3.27.а), а также большое количество НРС в среднем до 850 частиц на поверхности эритроцита, в то время как в плазме крови НРС наблюдаются в незначительном количестве (рисунок 3.27б).

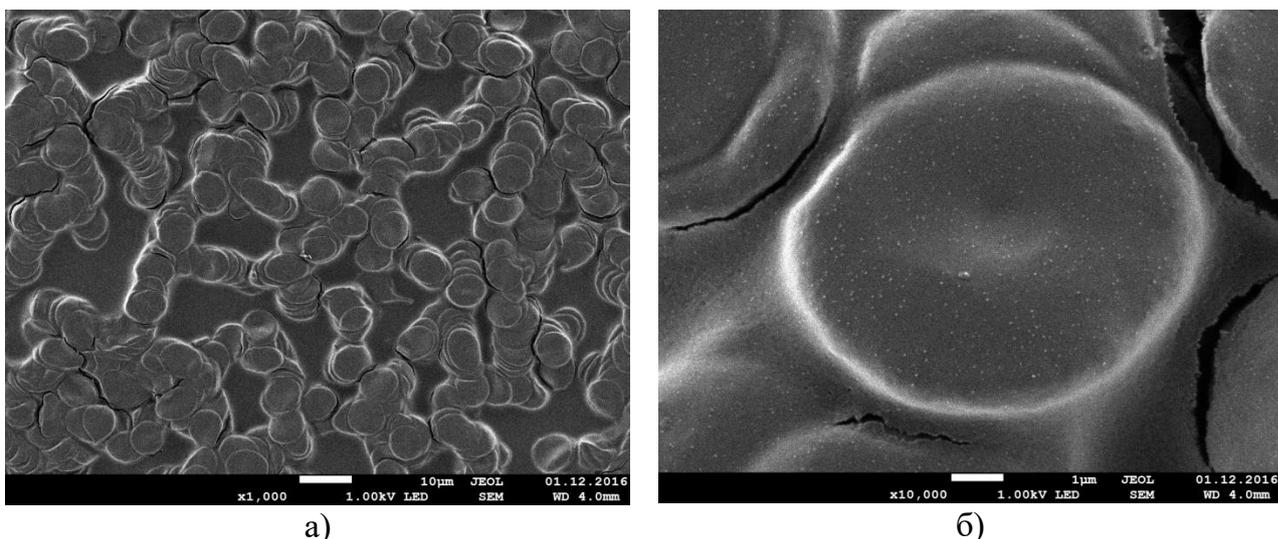


Рисунок 3.27. СЭМ изображения эритроцитов крови больных гломерулонефритом до лечения: а) «монетные столбики» эритроцитов при увеличении  $\times 1000$  раз; б) частицы нанометрового размера на поверхности эритроцита при увеличении  $\times 10.000$  раз.

После курса лечения наблюдается существенное уменьшение «монетных столбиков» (рисунок 3.28а) и количества НРС на поверхности эритроцитов до 100 единиц на поверхности одного эритроцита (рисунок 3.28б).

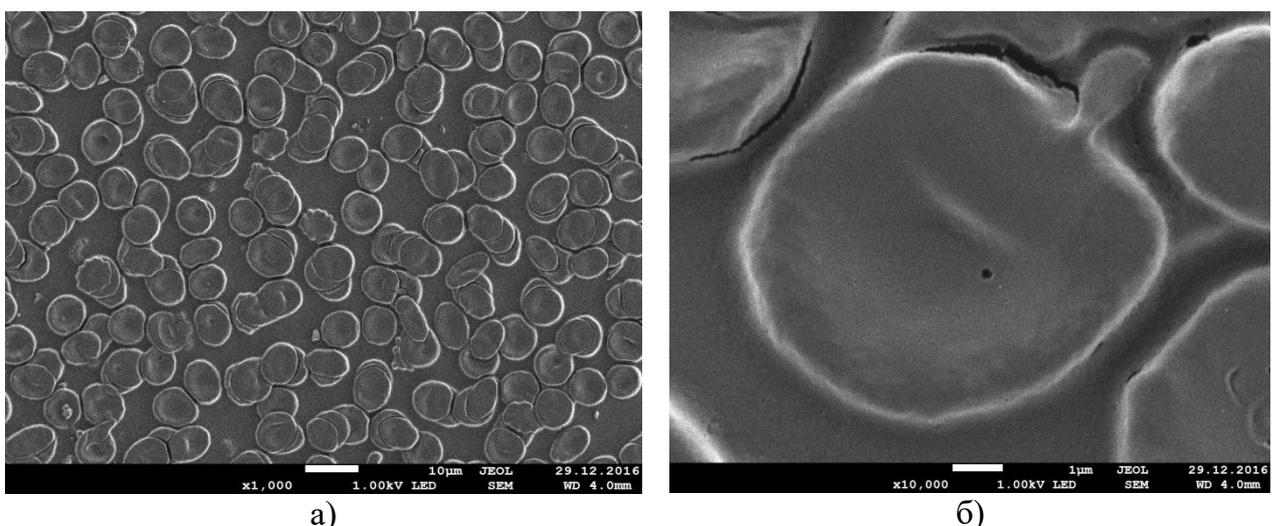


Рисунок 3.28. СЭМ изображения образца крови в случае гломерулонефрита: а) эритроциты при увеличении  $\times 1000$  раз; б) эритроцит с «наростом» с нанометровыми структурами на поверхности при увеличении  $\times 10.000$ .

Установлено, что на поверхности клетки локализованы в большом количестве НРС с размерами 45–50 нм и в меньшем количестве НРС с размерами 100-300 нм, имеющие, видимо, органическое происхождение и являющиеся диэлектриками (рисунок 3.29-3.30). НРС в малом количестве присутствуют также и в плазме. Размеры НРС (45-50 нм) сравнимы с размерами вируса папилломы человека (Papillomavirus) 50-55 нм, лишенных внешней оболочки и капсиды которых имеют сходные размеры [190]. Размеры более

крупных частиц варьирующих от 100-300 нм соответствуют размерам вириона герпеса, цитомегаловируса.

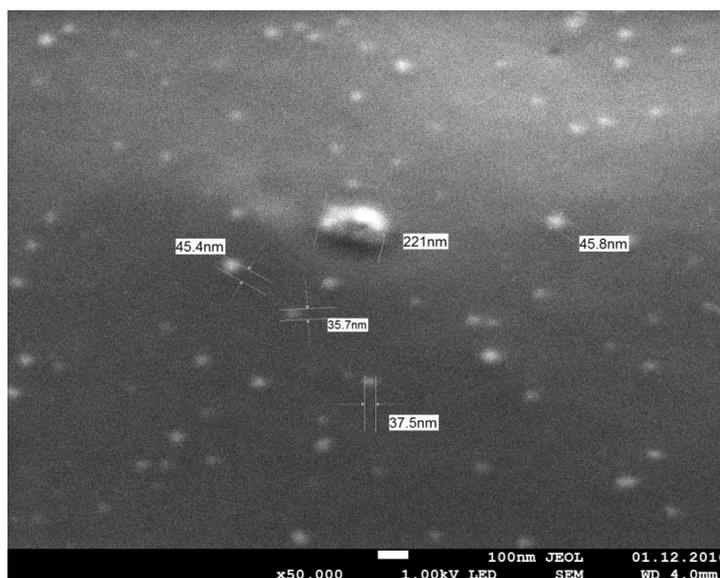


Рисунок 3.29. СЭМ-изображение НРС на поверхности эритроцита образца крови в случае гломерулонефрита при увеличении x50.000 раз с указанием их размеров.

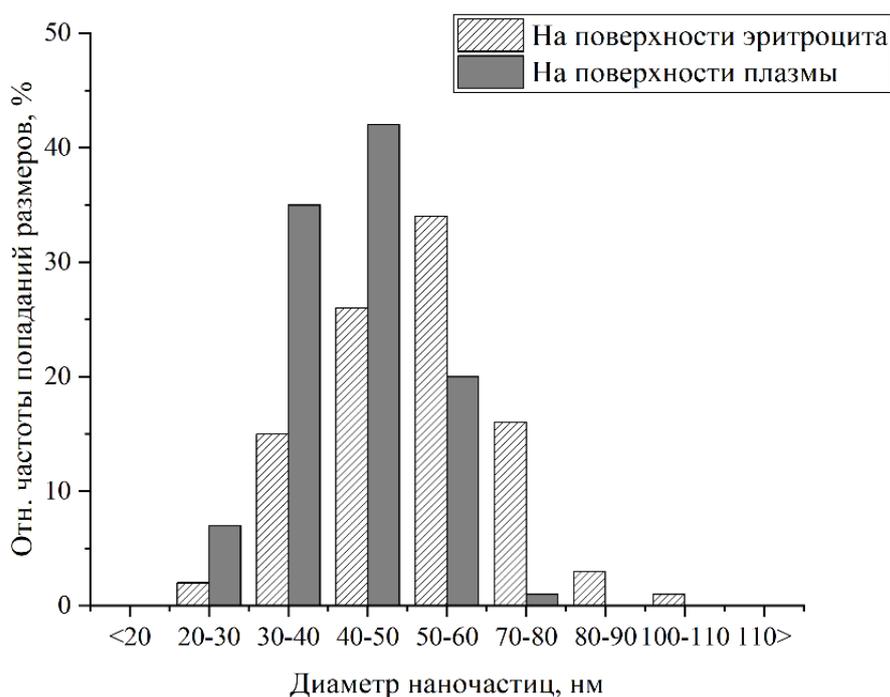


Рисунок 3.30. Диаграмма распределения линейных размеров НРС на поверхности эритроцита.

Анализ СЭМ изображений свидетельствует о том, что за время лечения в течение месяца количество эритроцитов на поверхности эритроцитов и в плазме изменяются: если в образцах крови в момент поступления наблюдалось большое количество НРС на поверхности самих эритроцитов и незначительное их количество на плазме крови, то в

конец терапии существенно изменилось соотношение количеств НРС на поверхности эритроцитов и в плазме таким образом, что количество НРС стало меньше на поверхности эритроцитов и больше в плазме с общим сокращением количества частиц на них (рисунок 3.31 а, б).

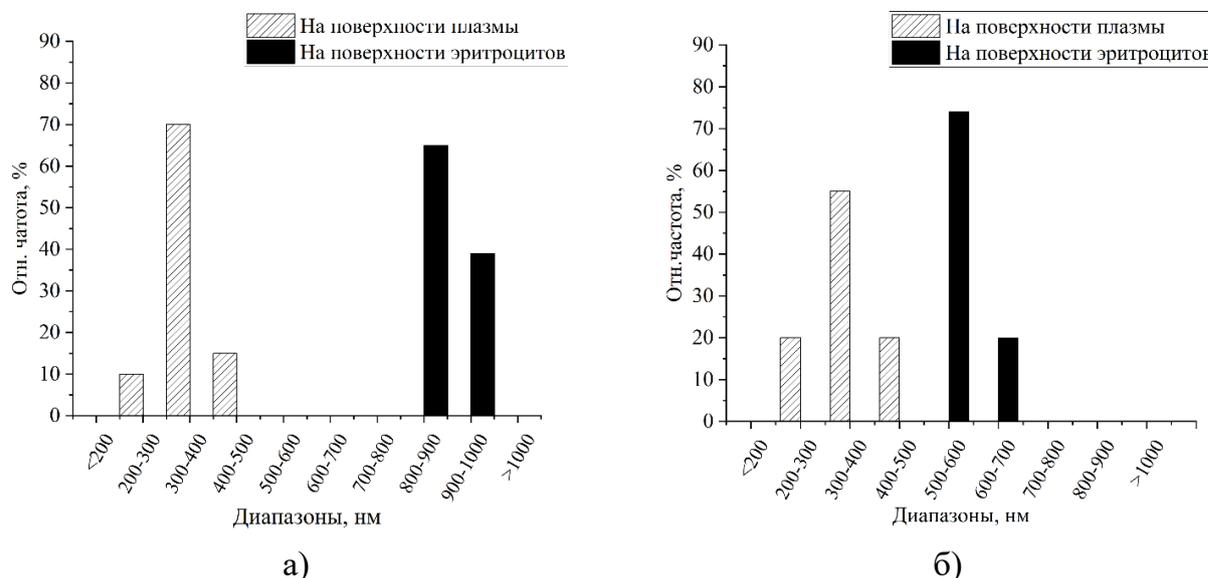


Рисунок 3.31. Диаграммы распределений количества частиц на поверхности эритроцита и в плазме: а) в момент поступления пациента в стационар; б) после проведения терапии в течение месяца.

Также обнаружено, что при гломерулонефрите в видимой области 40-45% эритроцитов являются дисморфными, из них 30% из общей массы эритроцитов составляют эллиптоциты (овалоциты) — эритроциты овальной формы, которые в норме должны быть менее 1% всех клеток, а также 15% из общей массы эритроцитов — эхиноциты. В незначительном количестве встречаются эритроциты с «наростами» и полутени (рисунок 3.32).

Согласно полученным результатам, при IgA нефропатии, гломерулонефрите на поверхности эритроцитов наблюдаются НРС, размер которых соответствует размерам определенных вирусов. Вероятно, эритроциты могут переносить вирусы, что может в дальнейшем стать причиной возникновения патологии почки. Итак, в ходе терапии уменьшается количество транспортируемых НРС на поверхности эритроцитов, а в плазме крови их количество увеличивается и при этом в среднем увеличивается их линейный размер. Также в СЭМ изображениях наблюдается преобладание определённых форм эритроцитов в зависимости от вида заболевания. Количество различных видов дисморфных эритроцитов в общей массе эритроцитов отличается.

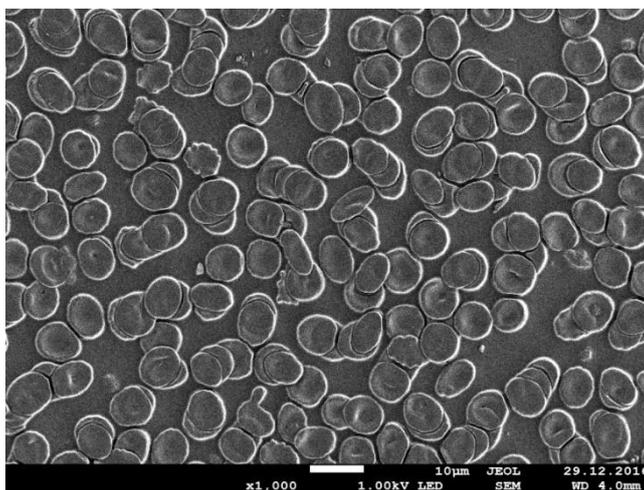


Рисунок 3.32. СЭМ изображение эритроцитов образца крови в случае гломерулонефрита при  $\times 1000$  увеличении: наблюдаются эллиптоциты, эхиноциты, эритроциты с наростами и полутени овалоцитов.

Обнаруженные в ходе исследования изменения формы эритроцитов могут быть обусловлены изменением поверхностного заряда эритроцитов в следствии прикрепления к ним достаточно большого количества НРС, которые, возможно, представляют из себя вирусные частицы, имеющие поверхностные заряды противоположного знака.

Наличие до терапии большого числа склеенных эритроцитов (монетных столбиков) также может быть объяснено уменьшением электростатического поля эритроцита в условиях адсорбции НРС на его поверхности, приводящее к уменьшению кулоновского отталкивания, что в свою очередь может привести к образованию конгломератов эритроцитов.

Итак, с помощью СЭМ впервые были обнаружены НРС на поверхности эритроцитов, размеры которых сопоставимы с размерами вирусов, что стало основой для одного из предположений о возможной транспортировке эритроцитами определенных видов вирусов. Таким образом, некоторые заболевания почек можно было бы рассматривать как вирус-ассоциированные.

#### *Исследование морфологии эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии*

Для подтверждения результатов, полученных с помощью СЭМ были проведены дополнительные исследования с помощью АСМ [159].

В ходе эксперимента были отобраны наиболее характерные эритроциты в мазках с помощью оптической микроскопии, что позволило сократить время и ресурсы основного исследования.

С помощью АСМ — сканирующего зондового микроскопа Solver Next фирмы NT-MDT проводили сканирование в полуконтактном режиме со следующими

характеристиками работы АСМ: области сканирования 50x50 мкм (512 точек), 5x5 мкм (512 точек); скорость сканирования 0,5 Гц, 0,25 Гц, значения которых были выбраны из-за неоднородностей рельефа; при всех измерениях использовался кантилевер NSG 10 с радиусом кривизны не больше 10 нм. АСМ изображение регистрировали при помощи программных обеспечений Nova и ImageAnalysis фирмы NT-MDT. Для оценки неровностей рельефа эритроцитов и толщины была использована линейка S1.

С помощью АСМ установлено наличие НРС на поверхности эритроцитов с линейными размерами, соответствующими размерам НРС, полученных с помощью СЭМ. Поперечные размеры НРС соответствуют размерам вирусов (рисунок 3.33).

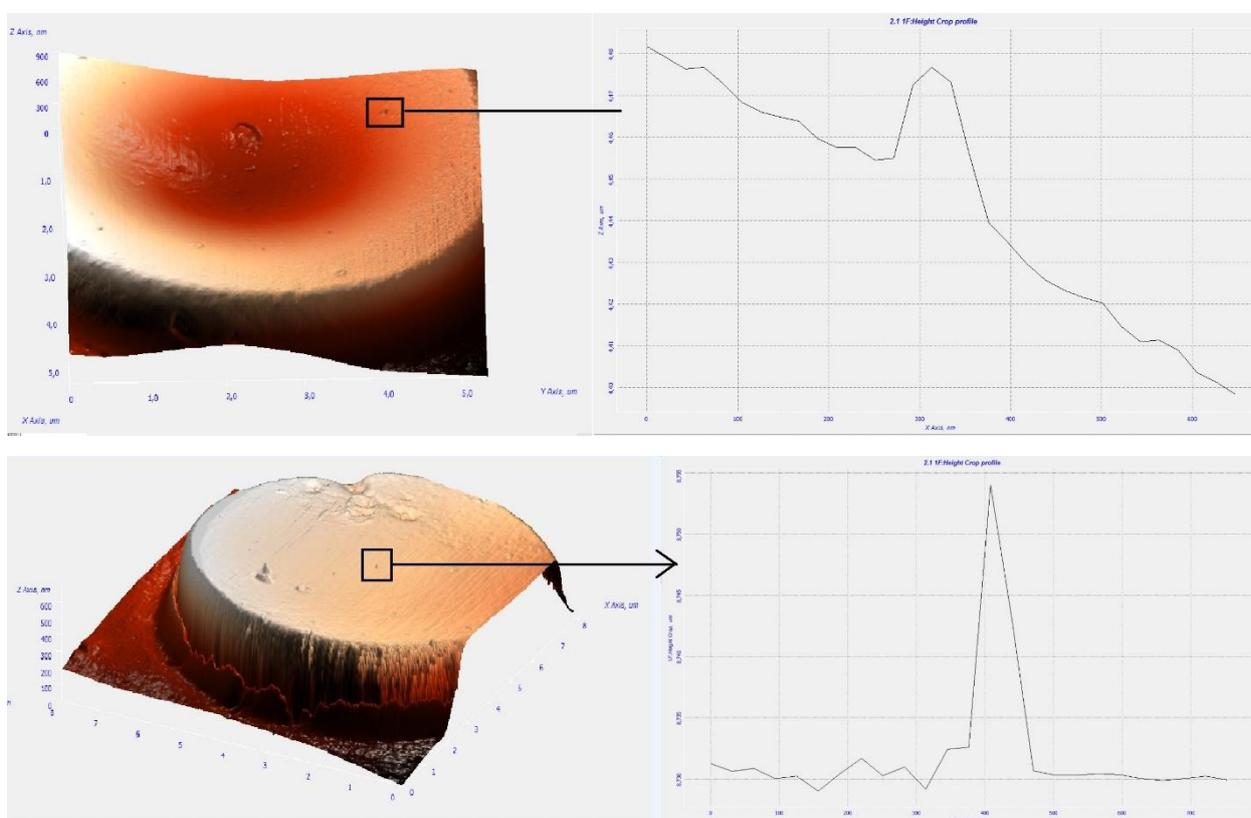


Рисунок 3.33. АСМ изображения НРС на поверхности эритроцитов и профилей НРС.

Итак, методом СЭМ и АСМ установлено, что на поверхности эритроцитов при IgA нефропатии и в других видах гломерулонефритов присутствуют НРС, размеры которых варьируют от 45 до 55 нм и от 100 до 300 нм, что сопоставимы с размерами вирусов [186-188].

Известно, что эритроциты имеют отрицательный поверхностный заряд благодаря наличию на их поверхности сиаловых кислот, способствующий их кулоновскому отталкиванию. Некоторые виды вирусов, например, оболочечные вирусы, имеют

дополнительные липидные оболочки (суперкапсиды) с мембранными белками поверх капсидов, представляют собой одинаковые белковые субъединицы (ВИЧ, вирус герпеса, вирус гепатита С) с поверхностным зарядом, зависящим от рН среды. Известно, что суммарный заряд белка при рН выше изоэлектрической точки является положительным, и, наоборот, при рН выше изоэлектрической точки общий заряд белка — положительный [185].

Кроме того у большинства вирусов гликопротеиды формируют «шипы» на поверхности вирусной частицы, длина которых достигает 7—10 нм. Шипы представляют собой морфологические субъединицы, построенные из нескольких молекул одного и того же белка. Возможно, при определенных рН условиях крови происходит прикрепление вирусных частиц к поверхности эритроцитов благодаря поверхностному заряду, формирующемуся на поверхности шипов и имеющему для этого достаточное численное значение.

Возможно, сорбция определенных вирусных частиц к эритроцитам крови и их транспортировка является одной из причин развития патологии почек [186-188]. Кроме того, возможно, это же свойство адсорбции вирусных частиц на поверхности эритроцитов обуславливает вывод патогенных НРС из организма человека вместе с мочой, т.е. в процессе функционирования почек происходит вывод из организма дисморфных эритроцитов с прикрепленными к ним НРС, предположительно вирусов [186-188].

#### *Исследование мазков крови методом ИК спектроскопии*

Для подтверждения изменений, происходящих в крови при различных видах гломерулонефритов, сопровождающихся изменением морфологии эритроцитов в условиях адсорбции на их поверхности НРС, обнаруженных методом СЭМ, были проведены исследования мазков крови детей с синдромом гематурии методом ИК спектроскопии [193, 194].

В работе определяются параметры ИК спектров образцов, которые могут быть использованы для формирования неинвазивных методов диагностики и проведения мониторинга во время лечения.

Материалом для исследования являются неокрашенные сухие мазки капиллярной крови детей в возрасте от 8 до 18 лет, проходивших лечение в нефрологическом отделении Центра охраны материнства и детства Республиканской больницы №1, нанесенные на предметное стекло, и контрольной группы, состоящей из студентов

первого курса СВФУ имени М.К. Аммосова и школьников г. Якутска без заболевания почек. В данном исследовании впервые были получены ИК спектры мазков крови детей и подростков с синдромом макрогематурии при хроническом гломерулонефрите ( $n = 4$ ), остром гломерулонефрите ( $n = 7$ ) и IgA-нефропатии ( $n = 8$ ), тубулоинтерстициальном нефрите ( $n = 2$ ), геморрагическом васкулите ( $n = 2$ ). Всего было исследовано 44 образца.

Спектральный 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 (НПВО) в учебной научно-технологической лаборатории «Технологии полимерных нанокомпозитов» парка оборудования Центра коллективного пользования Арктического инновационного центра Многоотраслевого научно-инновационного образовательного комплекса СВФУ имени М.К. Аммосова.

Сопоставление интенсивностей ИК спектров при различных заболеваниях и контрольной группы свидетельствует о нарушениях вторичной структуры белка: различия интенсивностей пиков ИК спектров наблюдаются в диапазоне волновых чисел от  $3600 \text{ см}^{-1}$  до  $2700 \text{ см}^{-1}$ , которым соответствуют валентные колебания (N-H) первичных аминов и амидов и ( $\equiv\text{CH}$ -) монозамещенных ацетиленов, а также в области волновых чисел от  $1700 \text{ см}^{-1}$  до  $900 \text{ см}^{-1}$ , основные пики которых показывают наличие валентных колебаний - C=C - ; валентных колебаний C=N и C=C - связей. (рисунок 3.34). Установлено, что интенсивность пиков образцов контрольной группы значительно меньше образцов пациентов с синдромом гематурии.

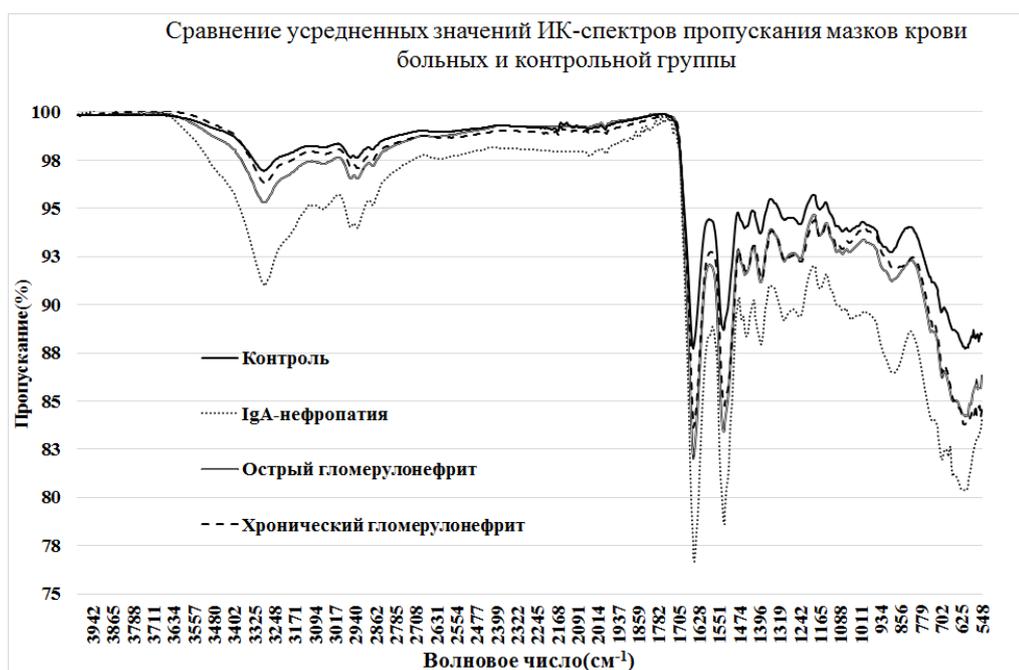


Рисунок 3.34. ИК спектры мазков крови больных и контрольной группы.

Максимальные изменения интенсивностей ИК спектров выявлены у детей с IgA нефропатией: в диапазоне больших волновых чисел 3330 – 2800 см<sup>-1</sup>, например, в пике 3286 см<sup>-1</sup> различие по сравнению с контрольной группой выше чем в 1.8 раза (рисунок 3.34). Также, например, установлено, что при интенсивности полосы 1650 см<sup>-1</sup> ИК спектра у детей с IgA-нефропатией в 1.1 раз больше, при остром гломерулонефрите – в 0.86 раза и при хроническом гломерулонефрите в 0.87 раза выше по сравнению с контролем.

Для анализа полученных результатов проводили сравнение отношений пиков спектров  $\Gamma = \frac{H_{\text{пат}}}{H_{\text{норм}}}$ ,

где  $H_{\text{пат}}$  — среднее значение пика спектра для определённого волнового числа в патологии;  $H_{\text{норм}}$  — среднее значение пика спектра образца крови из контрольной группы.

На рисунке 3.35 представлены графики зависимости  $\Gamma$  параметра от волнового числа при различных заболеваниях: IgA нефропатии, остром и хроническом гломерулонефритах в спектрах пропускания ИК излучения.

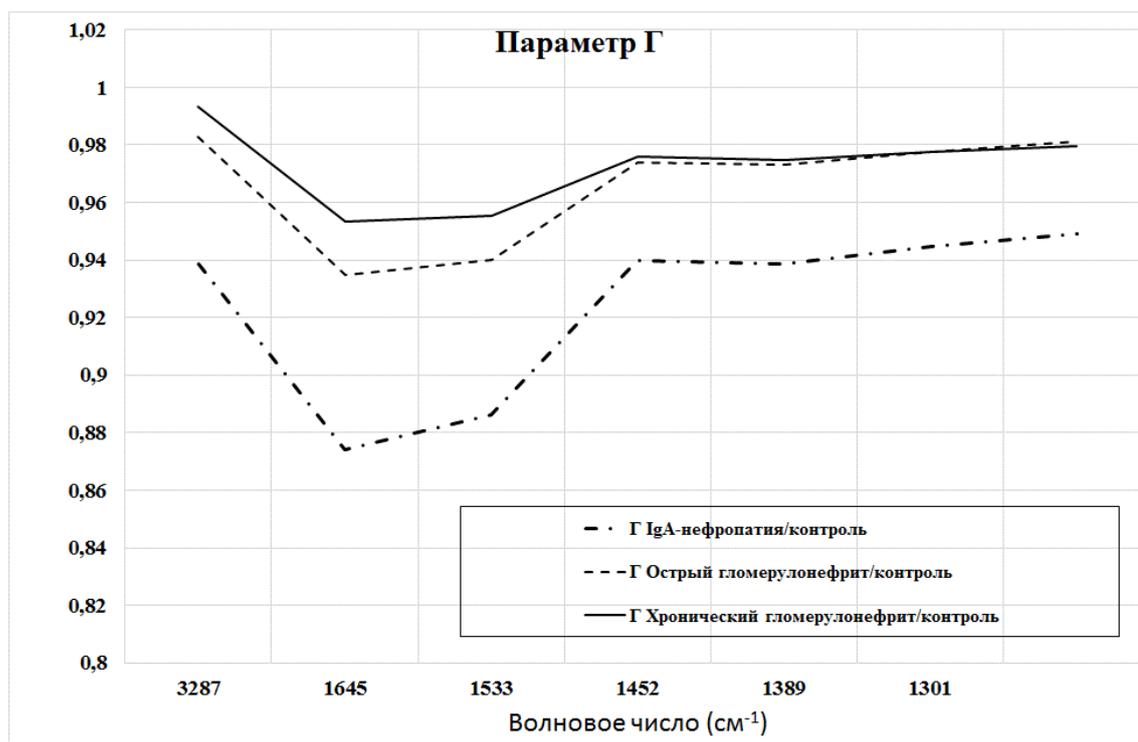


Рисунок 3.35. Зависимость  $\Gamma$  параметра крови пациентов от волнового числа.

Анализ значений  $\Gamma$  параметров свидетельствует о том, что максимальное  $\Gamma$  наблюдается при хроническом гломерулонефрите, а наименьшее значение – при IgA-нефропатии.

Далее мы рассчитывали  $\Gamma_{\text{пат}}$  — параметр, определяющий отношения высот пиков спектров пропускания ИК излучения при различных заболеваниях:

$$\Gamma_{\text{пат}} = \frac{H_i^{\text{пат}}}{H_k^{\text{пат}}},$$

где  $H_i^{\text{пат}}$  — среднее значение пика спектра для определённого волнового числа в  $i$ -патологии;  $H_k^{\text{пат}}$  — среднее значение пика спектра для определённого волнового числа в  $k$ -патологии.

На рисунке 3.36 представлены графики зависимости  $\Gamma_{\text{пат}}$  — отношения пиков интенсивностей полос в спектрах пропускания ИК излучения при различных патологиях почек и при IgA нефропатии.

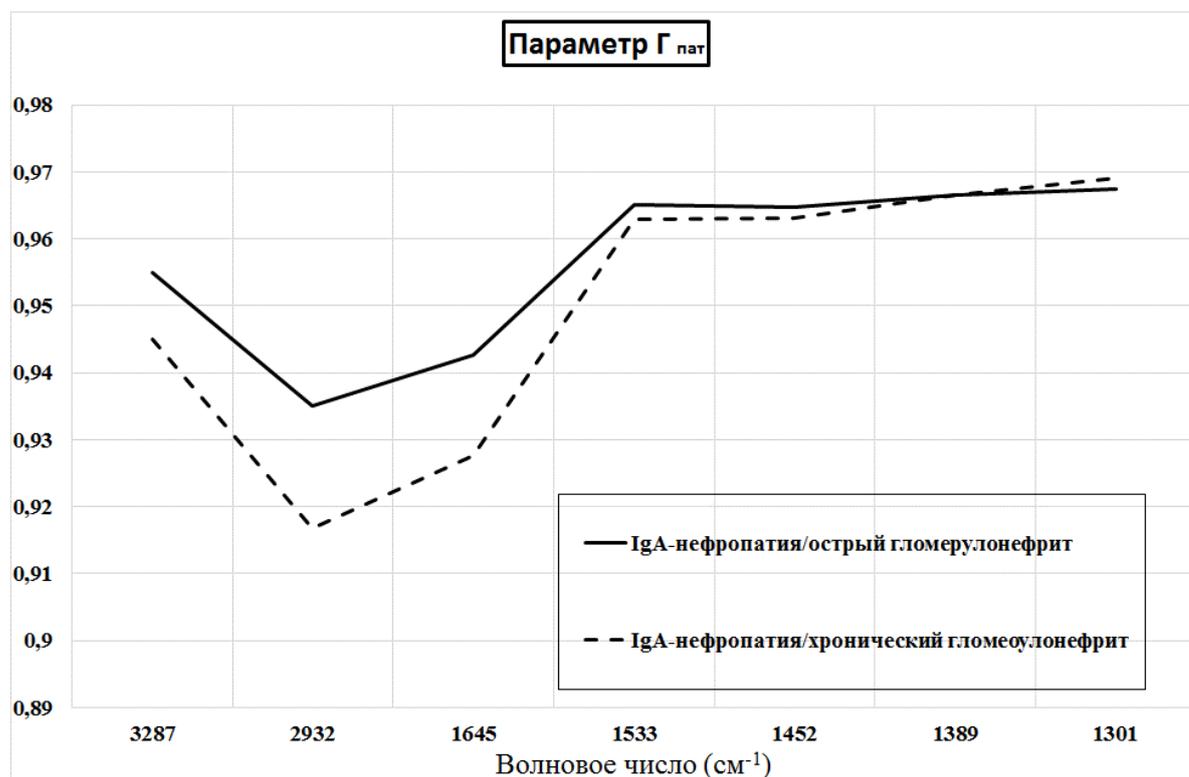


Рисунок 3.36. Зависимость  $\Gamma_{\text{пат}}$  крови пациентов от волнового числа.

Кроме  $\Gamma$  параметра для анализа результатов также использовали параметр  $A$  — отношения площадей пиков поглощения при различных заболеваниях и площадей пиков спектров поглощения контрольной группы и соответственно  $A_{\text{пат}}$  — параметры, определяющие отношения площадей пиков спектров пропускания при различных заболеваниях:

$$A = \frac{S_{\text{пат}}}{S_{\text{норм}}}, \quad A_{\text{пат}} = \frac{S_i^{\text{пат}}}{S_k^{\text{пат}}}.$$

В таблице 2 и на рисунке 3.37 представлены полученные величины параметра  $A$  и графики зависимости отношений площадей пиков спектров при различных нефропатиях с макрогематурией и контрольной группы от волнового числа соответственно.

Таблица 2. Значения А параметров при различных почечных заболеваниях с макрогематурией

Волновое число, $см^{-1}$	А-параметр IgA/контроль	А-параметр Хронический гломерулонефрит/контроль	А-параметр Острый гломерулонефрит/контроль
3287	3,86	0,59	2,11
2932	1,79	1,42	1,37
1645	1,96	1,36	1,33
1533	1,70	1,37	1,53
1452	2,72	0,76	1,67
1389	1,51	1,35	1,46
1301	2,02	1,42	1,87
1238	1,21	0,98	1,10

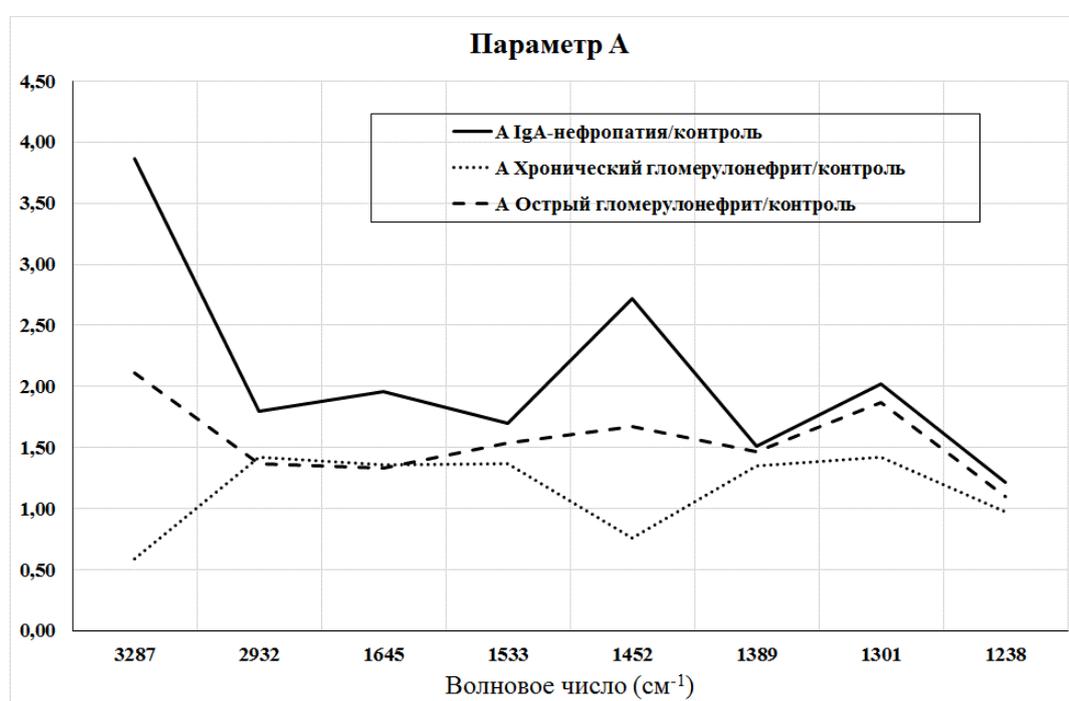


Рисунок 3.37. Зависимость отношений площадей пиков спектров параметров А пациента от волнового числа.

Из полученных данных следует, что максимальные изменения этого параметра характерны для области волновых чисел  $3287\text{ см}^{-1}$  и  $1452\text{ см}^{-1}$  (полосы характерные для амидов белков), которые могут быть рассмотрены как контрольные значения для определения параметра А при исследовании и дифференциальной диагностике почечных заболеваний с макрогематурией (рисунок 3.38.).

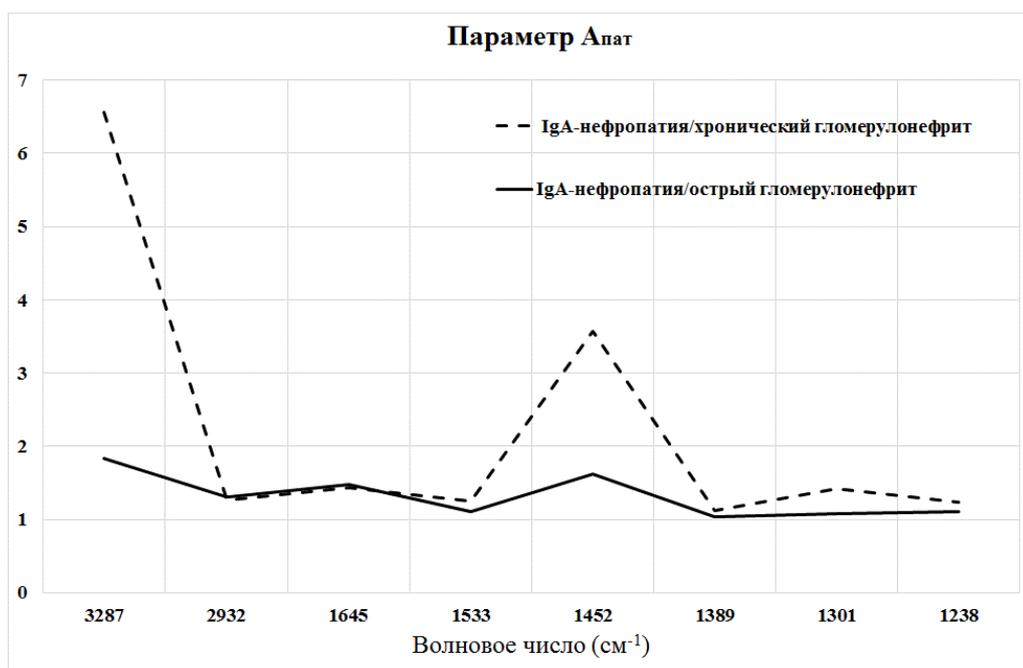


Рисунок 3.38. Зависимость отношений площадей пиков спектров – параметры  $A_{пат}$  пациентов от волнового числа.

Таким образом, анализ результатов исследования свидетельствует о существенных изменениях параметров ИК спектров больных (соотношение амплитуды пиков, площадей) образцов крови в зависимости от видов почечных заболеваний с синдромом макрогематурии. Кроме того, ИК – спектроскопия крови позволяет оценить вклад определенных колебаний молекул белков в крови (например альбумин, или гемоглобин) и более четко охарактеризовать изменения конформации белков эритроцитов и плазмы крови при патологии. В связи с этим мы предлагаем использовать метод ИК спектроскопии для разработки менее затратной и неинвазивной диагностики почечных заболеваний.

С помощью СЭМ доказано, что в образцах крови и мочи кроме дисморфных эритроцитов присутствуют НРС, сопоставимые с размерами вирусов. Применение разработанной методики исследования эритроцитов без напыления позволяет наблюдать не только изменения формы клеток, но и выявлять локализованные на поверхности клетки НРС. Применяющееся ранее проводящее покрытие ограничивало возможность исследований нанообъектов, так как толщина слоя покрытия была соразмерна с величинами малых вирусов [190]. Существование объектов нанометровых частиц органического происхождения на поверхности эритроцитов является еще одним подтверждением предположения о возможном вирусном этиологическом факторе возникновения гематурии у пациентов [192].

### 3.2.2. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при заболеваниях почек

В данной серии экспериментов были исследованы биообразцы (крови и мочи) 5 пациентов с различными вариантами обструкции мочеточников, с диагнозом нефроптоз с формированием гидронефроза.

У больного с диагнозом гидронефроз левой почки со стриктурой левого мочеточника (N13.1), а также нефроптоз слева для исследования функции каждой почки проведена катетеризация обеих мочеточников мочеточниковыми катетерами.

Образцы мочи для СЭМ готовили следующим образом: 2,50 мл мочи центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 2000 об/мин; после этого, 2 капли осадка помещали на новое обезжиренное чистое сухое предметное стекло ближе к короткой стороне. Высохший мазок визуально был равномерно тонким, почти прозрачным.

На рисунке 3.39 представлены СЭМ изображения эритроцитов и НРС мазков крови пациента. Средний линейный размер эритроцитов равен  $8.33 \pm 0.56$  микрон, что превышает средний размер эритроцитов в норме, а средний линейный размер некоторой части наблюдаемых на поверхности эритроцитов НРС –  $60.54 \pm 2.26$  нм, что соответствует размеру вируса гепатита С. Кроме таких НРС на поверхности эритроцитов присутствуют НРС с размерами, сопоставимыми с размерами вируса простого герпеса или цитомегаловируса.

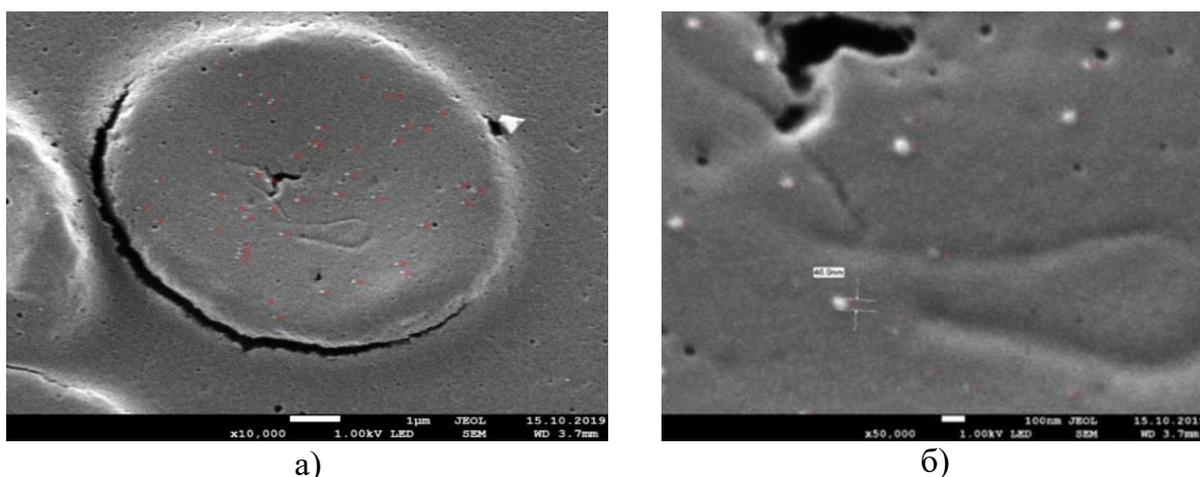


Рисунок 3.39. СЭМ изображения эритроцита при разных увеличениях: а) 10 000х; б) 50 000х.

На рисунках 3.40 и 3.41 представлены СЭМ изображения образцов мочи с левой и правой почек при различных увеличениях. На изображениях образца мочи с левой почки

наблюдаются кристаллы трипельфосфата и фосфорнокислой извести, в то время как в образце мочи с правой почки – кристаллы сульфазола и другие элементы, отсутствующие в моче с левой почки.

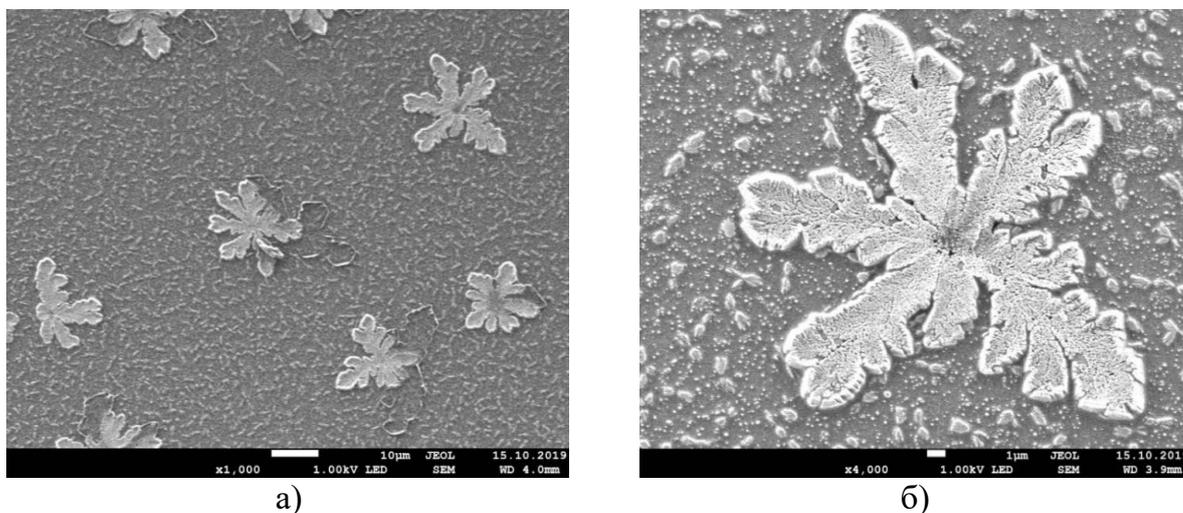


Рисунок 3.40. СЭМ изображения при разных увеличениях элементов мочи левой почки пациента а) 1 000х; б) 20 000х.

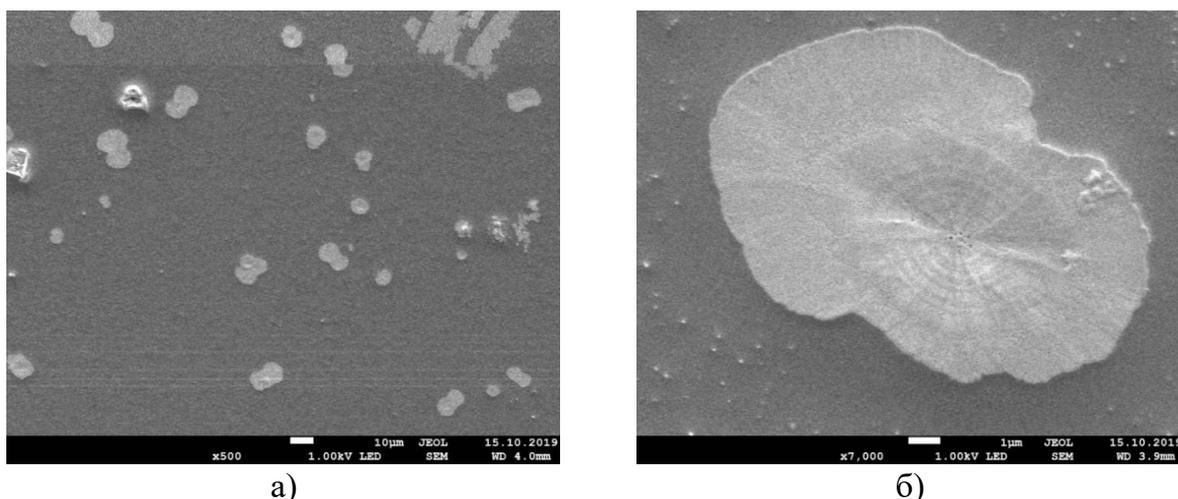


Рисунок 3.41. СЭМ изображения при разных увеличениях элементов мочи правой почки: а) 500х; б) x 7 000х.

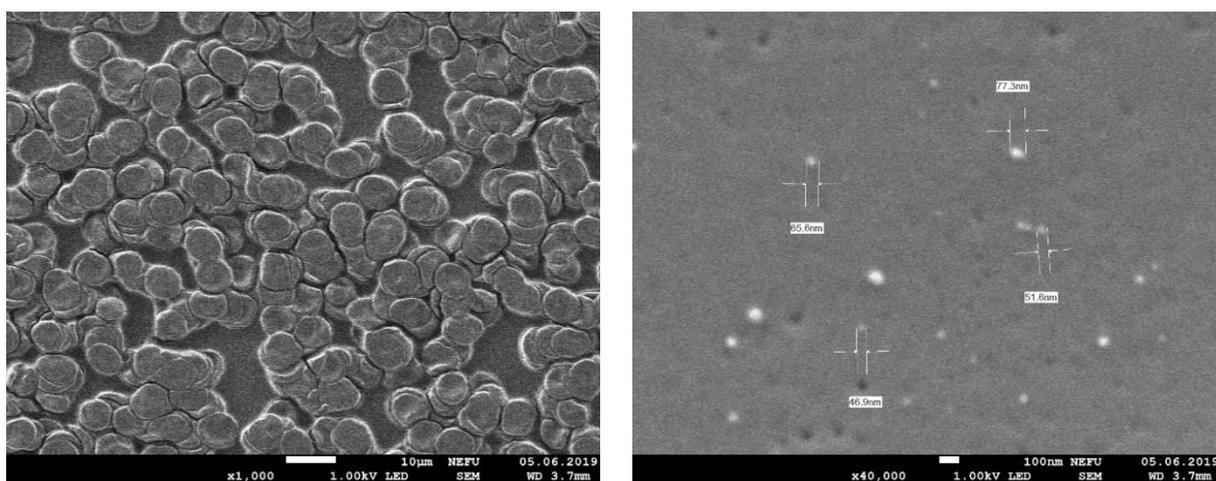
Полученные изображения на СЭМ, показывают существенные отличия в исследованиях морфологии образцов мочи правой и левой почек, что является обоснованием для признания необходимости обращения внимания на отличающиеся функции левой и правой почек при принятии решении планов терапии и в проведении мониторинга состояния пациентов до, во время и после лечения.

*Исследование образцов крови пациента с хроническим мезангиопролиферативным гломерулонефритом*

Результаты, полученные в [158, 159], позволили сформировать гипотезу о наличии связи между клинической формой гломерулонефрита и, как морфологии самих

эритроцитов, так и обнаруженных на их поверхности НРС эндогенного происхождения. Для разработки нового метода, основанного на данных СЭМ крови, необходимо установление специфических морфологических характеристик эритроцитов у пациентов с различными клинико-морфологическими формами гломерулонефритов. Специфические различия могут послужить основой для разработки новых лабораторных методов для дифференциальной диагностики гломерулонефритов. В качестве объекта была исследована капиллярная кровь: изучение СЭМ изображений эритроцитов пациентки с хроническим мезангиопролиферативным гломерулонефритом для установления специфических морфологических характеристик эритроцитов [163].

На рисунке 3.42 представлены СЭМ изображения поверхности эритроцитов капиллярной крови пациентки (с ХМПГН). Размеры эритроцитов варьируются от 5 до 10 микрон, средний размер эритроцитов составил примерно  $7,45 \pm 0,13$  микрон. Для подсчета количества эритроцитов в связи с их линейными размерами были сформированы группы с шагом в 0,5 микрон. В соответствии с этим разделением, наибольшее количество эритроцитов в поле зрения имело размер 6,5-7,0 микрон (рисунок 3.43а). Для подсчета количества НРС в связи с их размерами, они были разделены на группы с шагом в 10 нм. НРС, которые были выявлены у пациентки с ХМПГН на поверхности эритроцитов (рисунок 3.42), по размеру варьировали от 30 нм до 100 нм, максимальное количество НРС имело размеры 30-40 нм (рисунок 3.43б).



а)

б)

Рисунок 3.42. СЭМ изображения поверхности эритроцитов пациентки (с ХМПГН) при увеличениях 1000 (а), 40000 (б) крат; НРС визуализируются в виде включений белого цвета (б).

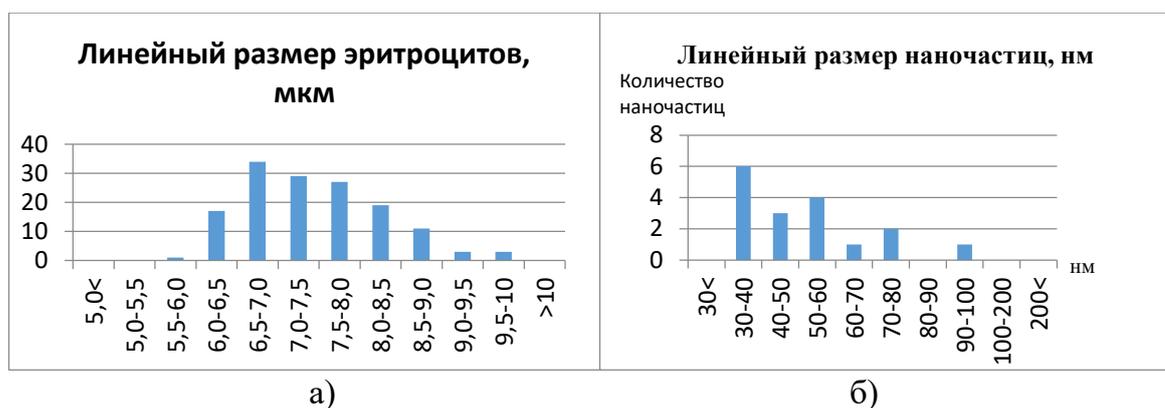


Рисунок 3.43. Диаграмма линейных размеров (с ХГМНП): а) СЭМ изображений эритроцитов, б) НРС на поверхности эритроцитов.

Конечно, для установления значимости связи обнаруженных специфических морфологических характеристик эритроцитов, а также НРС с диагнозом ХМПГН, необходимы дополнительные исследования с использованием других методов клинической лабораторной диагностики, как минимум, общего клинического анализа крови.

Однако, как нам представляется, именно особенности НРС, их качественные и количественные характеристики в большей степени, чем морфологические характеристики эритроцитов, связаны с клинико-морфологической формой патологии почек, с ХМПГН.

Анализ размера НРС, обнаруженных на поверхности эритроцитов, свидетельствует об их соответствии размерам экзосом [195-199]. В связи с этим, возможно, что разница в размерах НРС у двух пациенток обусловлена различиями биогенезе НРС, которые могут быть ассоциированы с клинико-морфологической формой патологии почек. Известно, что на характеристики экзосом влияет редокс-статус, а экспрессия окислительных и антиоксидантных ферментов различна внутри разных типов клеток одного органа. Следовательно, редокс-статус может зависеть от морфологических и патогенетических особенностей локализации патологии в почках — в клубочках, канальцах и интерстиции [200].

### 3.2.3. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при раке шейки матки

Учитывая, то что частота заболеваемости раком шейки матки имеет высокое значение в нашей республике (9,4%) [201], и также недостаточную изученность причин

рецидива, становится актуальной необходимостью разработки новых методов лечения больных РШМ.

РШМ развивается в результате ряда постепенных изменений, и нормальным клеткам требуются годы или десятилетия перейти от состояния предракового поражения (цервикальная интраэпителиальная неоплазия) к инвазивному злокачественному РШМ, который включает длительную и обратимую стадию предракового поражения [29].

Известно, что вирус папилломы 16 и 18 типов являются причиной возникновения РШМ. Около 99,7% случаев РШМ вызваны персистирующей генитальной инфекцией, вызванной вирусом папилломы человека высокого риска. Вирус обычно поражает кожно-слизистый эпителий и продуцирует вирусные частицы в зрелых эпителиальных клетках, а затем вызывает нарушение нормального контроля клеточного цикла и стимулирование неконтролируемого деления клеток, что приводит к накоплению генетических повреждений [202]. Размеры вириона вируса папилломы человека составляют около 55 нм. Факт того, что НРС сходных размеров могут быть обнаружены в крови [10] и то, что в крови были обнаружены участки ДНК РШМ [203] может свидетельствовать о том, что часть из этих НРС могут являться вирусами.

Известно, что раннее выявление и лечение предраковых поражений может предотвратить прогрессирование рака у почти девяноста процентов пациенток с РШМ. В настоящее время наиболее часто используемые методы скрининга для раннего выявления рака шейки матки включают цитологический тест Thinprep и обнаружение вируса папилломы человека (ВПЧ). Тест на ВПЧ определяет, существует ли вирусная инфекция высокого риска Thinprep тест определяет, происходят ли аномальные изменения в клетках шейки матки под воздействием патогенных факторов, которые могут привести к раку шейки матки [30]. Хотя РШМ и является предотвращаемым заболеванием, однако, ограниченные социально-экономическим статусом и уровнем образования, большинство женщин плохо осведомлены о причинах, факторах риска, профилактике и лечении рака шейки матки. Заболеваемость раком шейки матки в развитых странах остается ниже, чем в менее развитых странах. Фактически, примерно 95% смертей от РШМ приходится на страны с низким уровнем дохода [31]. В связи с этим, существует необходимость в формировании нового малоинвазивного, доступного метода ранней диагностики РШМ, объяснения причин возникновения явления метастазирования и рецидивов.

В данной серии экспериментов были исследованы образцы венозной крови 50 пациентов с РШМ. Образцы представляли собой мазки венозной крови, забранной в вакуумные пробирки с ЭДТА путем венепункции, приготовленные на предметных стеклах и высушенные на воздухе при температуре 20–22 °С. Возрастной диапазон составлял от 45 до 55 лет.

В ходе исследований были получены изображения эритроцитов при различных увеличениях из наиболее тонких частей мазков крови (рисунок 3.44). Максимальное увеличение, позволяющее детализировать топографию и объекты наноразмерного диапазона на поверхности эритроцитов, было кратно 10 000х.

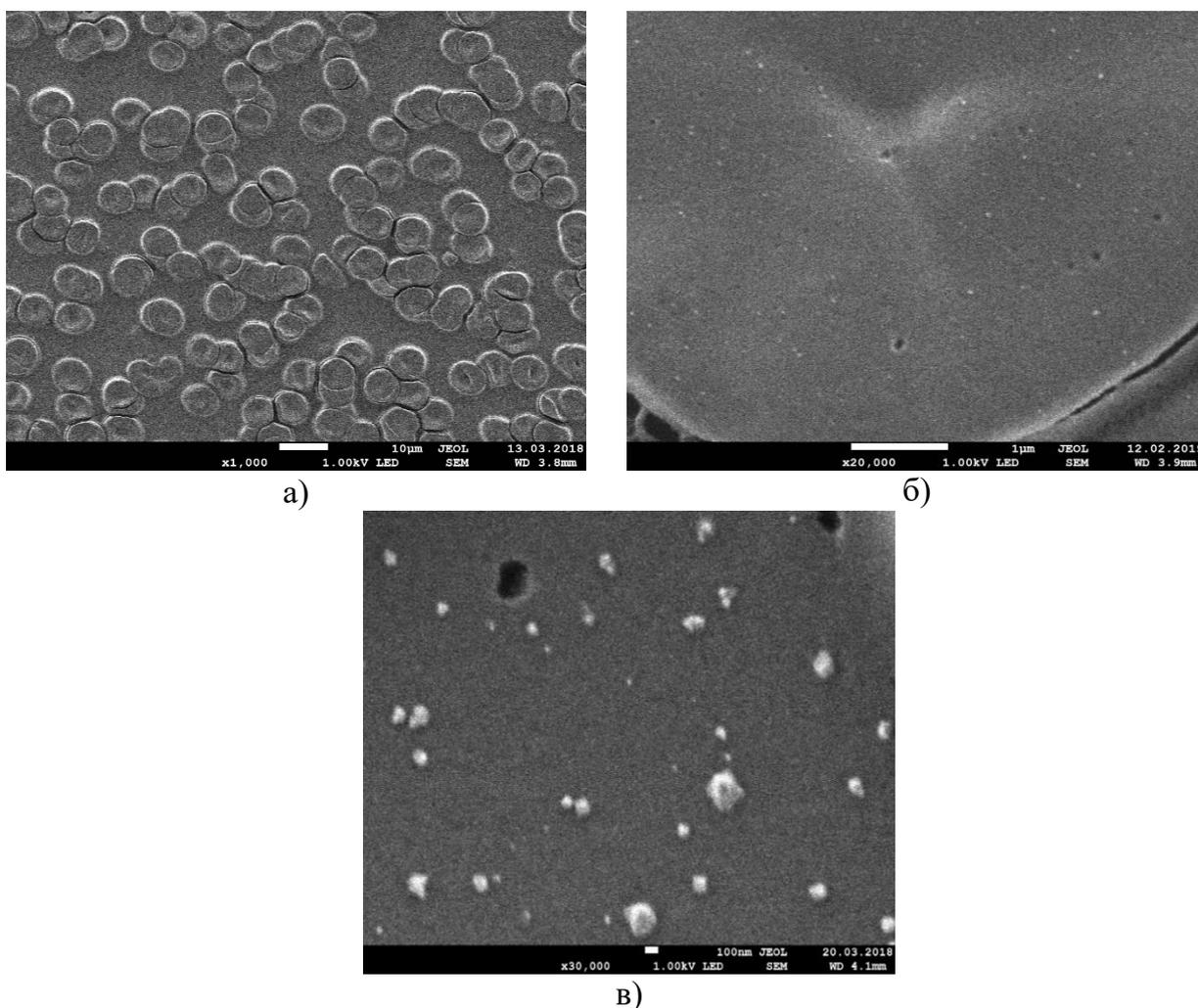


Рисунок 3.44. СЭМ изображение эритроцитов образца крови с РШМ а) при увеличении 1000х; б) при увеличении 20 000х; в) при увеличении 30 000х на стеклянной подложке.

По полученным изображениям были определены размеры эритроцитов в патологии, определено соотношение аномальных и нормальных эритроцитов, проанализировано количество НРС на поверхности эритроцитов, а также в плазме крови (рисунок 3.45).



Рисунок 3.45. Диаграмма процентного соотношения дисморфных и нормальных эритроцитов пациентов с диагнозом РШМ.

В результате исследований были получены гистограммы (относительные частоты попадания линейных размеров эритроцитов в определённых интервалах их значений) линейных размеров эритроцитов, НРС на поверхности эритроцитов (рисунки 3.46, 3.47).

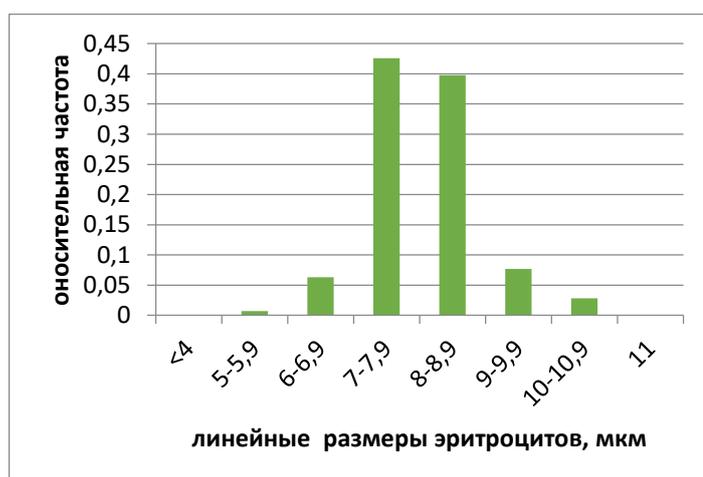


Рисунок 3.46. Гистограмма распределения линейных размеров эритроцитов пациента с диагнозом РШМ.



Рисунок 3.47. Гистограмма распределения линейных размеров НРС на поверхности эритроцитов пациента с диагнозом РШМ.

### **3.2.4. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при раке молочной железы**

По количеству новых случаев у женщин РМЖ находится на первом месте, по данным Globocan в 2020 году количество новых случаев составило 2 261 419, что составляет 24,5% [204]. Кроме того, наблюдаются ранние и поздние рецидивы онкозаболеваний после их радикального лечения с применением высоких технологий, оборудования и современных дорогостоящих фармпрепаратов, в том числе лучевой терапии, направленной на полное излечение больного от опухоли. В связи с недостаточной разработанностью методов мониторинга за качеством и безопасностью лечения онкологических заболеваний с применением высокотехнологичного медицинского оборудования, планируется создание методик мониторинга реакции на локальное воздействие радиации во время лучевой терапии, в ходе которой рассматривается роль везикул как потенциальных участников онкогенеза. Везикулы также могут быть вовлечены в метастазирование или укрытие молекул, которые участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе.

Рак молочной железы также, как и РШМ, занимает лидирующее место по часто встречаемым новообразованиям среди женщин. Согласно гипотезе, ВПЧ может инфицировать клетки молочной железы и вызывать изменения в их генетическом материале.

И для подтверждения этой гипотезы, методом СЭМ были получены снимки образцов венозной крови 4 пациентов с раком молочной железы. На представленном ниже рисунке 3.48 СЭМ изображения мазка крови образца с раком молочной железы.

На данном СЭМ изображении на поверхности эритроцита с РМЖ, также как у больных с РШМ, найдены НРС, размеры которых варьируются от 60 до 90 нм.

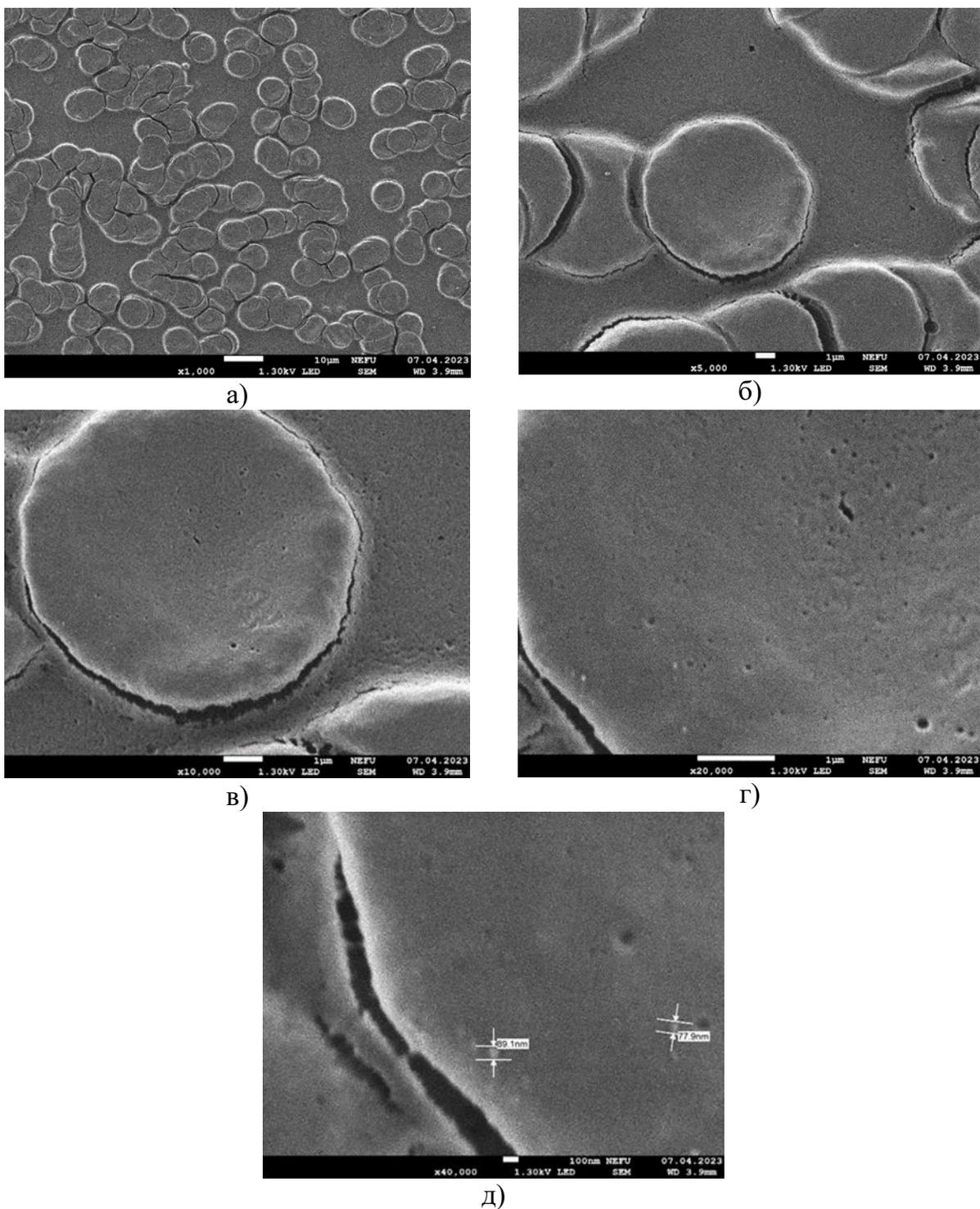


Рисунок 3.48. СЭМ изображения мазка крови с РМЖ: а) эритроциты при увеличении  $\times 1000$ ; б) эритроциты при увеличении  $\times 5000$ ; в) поверхность эритроцита при увеличении  $\times 10000$ ; г) поверхность эритроцита при увеличении  $\times 10000$  с указанием их размера; д) нанометровые частицы на поверхности эритроцита при увеличении  $\times 40000$  с указанием их размеров.

### 3.2.5. Исследования морфологии и наноразмерных структур эритроцитов при отморожении

Общее охлаждение и отморожения являются одними из тяжелых видов холодовой травмы, зачастую они приводят к высокому уровню инвалидизации и летальному исходу

пострадавших [205, 206]. В настоящее время в мире до конца не изучены вопросы смерти от общего охлаждения в условиях сверхнизких температур (ниже  $-40^{\circ}\text{C}$ ). В реальных условиях лиц, умерших от переохлаждения (по внешним признакам), без проведения реанимационных мероприятий доставляют в морг. Однако немаловажным моментом считается, что в течение первых 2 суток пострадавшие находятся в состоянии холодового анабиоза (очень редкий пульс, низкое АД) и вероятность восстановления жизнедеятельности организма не исключается (отмечаются случаи сохранения жизнедеятельности сердца и других органов у замерзших животных).

В настоящее время в доступной литературе отсутствуют данные исследований клеток крови умерших от переохлаждения методами электронной микроскопии. Выявление особенностей морфологии клеток крови умерших от переохлаждения, возможно, может дополнить представление о клеточно-молекулярных механизмах процесса общего охлаждения организма и подтвердить возможность восстановления жизнедеятельности организма.

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).

Также для наблюдения изменения морфологии эритроцитов проводилось экспериментальное исследование клеток крови добровольца *in vitro*. Кровь, помещенная в стеклянную пробирку, постепенно охлаждалась, а затем нагревалась. В ходе остужения и нагревания было сделано поочередно 6 мазков крови: сразу после забора венозной крови при температуре  $+36,6^{\circ}\text{C}$ ; затем при температурах  $+8,0^{\circ}\text{C}$ ,  $+2,0$ ,  $-1,7$ ;  $+12,5$  и  $+31,0^{\circ}\text{C}$ . Забор крови у умерших от переохлаждения был произведен из области головного мозга, где температура была максимальной (от  $+6^{\circ}\text{C}$  до  $+20^{\circ}\text{C}$ ) по сравнению с другими тканями и органами. Минимальная температура в мягких тканях верхних и нижних конечностей температура составляла  $-40^{\circ}\text{C}$ , в легких  $+12^{\circ}\text{C}$ , в печени  $+10^{\circ}\text{C}$ .

В ходе исследования мазков крови были получены СЭМ изображения эритроцитов при различных причинах смерти. На рисунке 3.49 представлены изображения эритроцитов молодого мужчины, мазок крови которого был сделан через сутки после его смерти. Смерть наступила в течение 30 мин в результате колото-резаной раны.

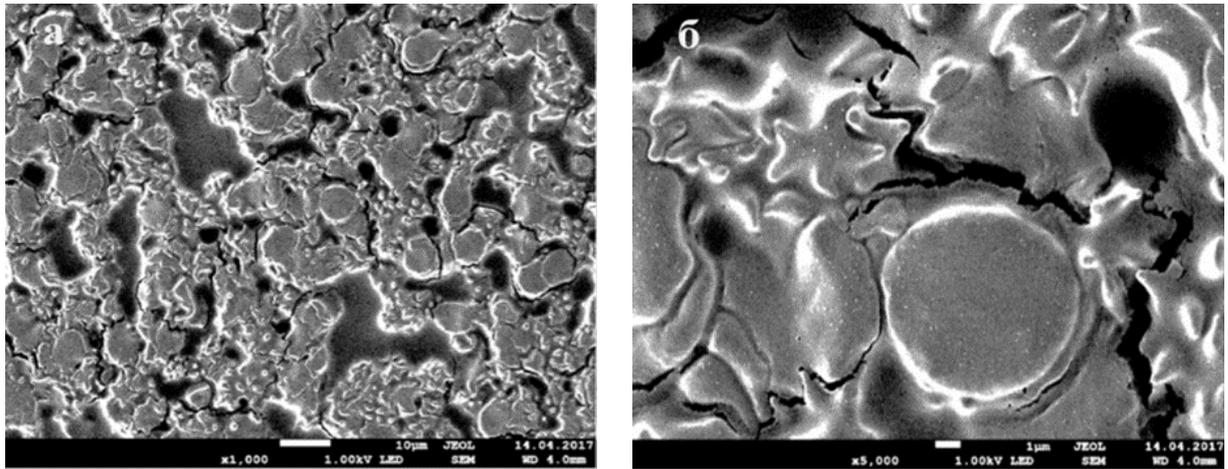


Рисунок 3.49. СЭМ изображения эритроцитов умершего от колото-резаной раны. а) при увеличении 1000х, б) при увеличении 5000х.

В поле зрения при увеличении в 1000 раз наблюдается преобладание дисморфных эритроцитов по сравнению с нормальными. Следует отметить, что дисморфные эритроциты по форме близки к акантоцитам. Неизменные клетки образуют небольшие «монетные столбики», а измененные – плотно соединены между собой отростками. На данном изображении не наблюдаются фрагменты гемолизированных эритроцитов.

На рисунке 3.50 показаны эритроциты мужчины, умершего от огнестрельного ранения, мазок крови которого был сделан на вторые сутки после наступления смерти.

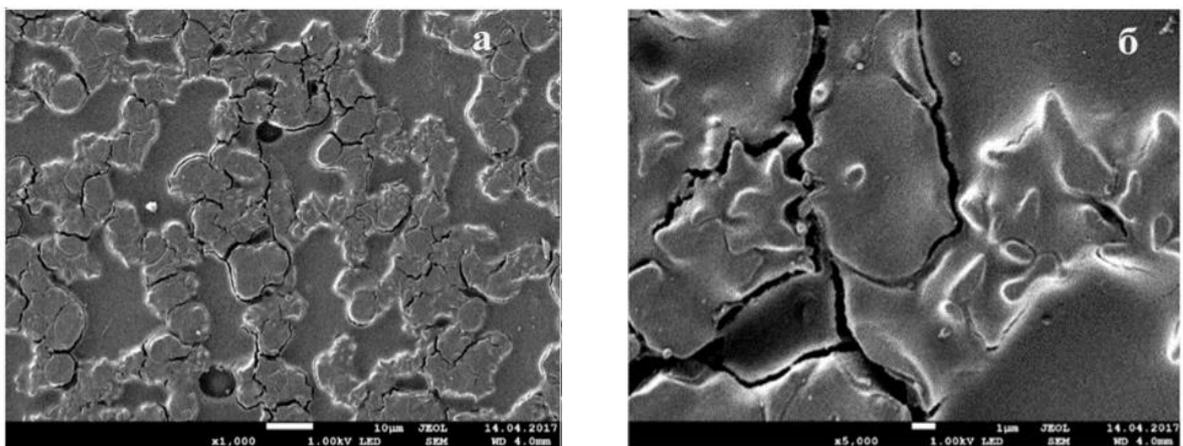


Рисунок 3.50. СЭМ изображения эритроцитов умершего от огнестрельного ранения.

В случае огнестрельного ранения измененные эритроциты по форме похожи на акантоциты. Такие же дисморфные эритроциты наблюдаются и на рисунке 3.49 в случае колото-резаной раны. В отличие от рисунка 3.50 наблюдаются признаки гемолиза эритроцитов, т.е. видно небольшое количество фрагментов эритроцитов, почти все клетки образуют конгломераты. В отличие от первого случая количество неизменных эритроцитов существенно меньше, что может быть обусловлено временным фактором:

мазок во втором случае был сделан на вторые сутки после наступления смерти, в то время как в случае колото-резаной раны – через 1 сутки.

На рисунке 3.51 представлены изображения эритроцитов крови 25-летнего мужчины, умершего от переохлаждения. Кровь была взята через 1 сутки.

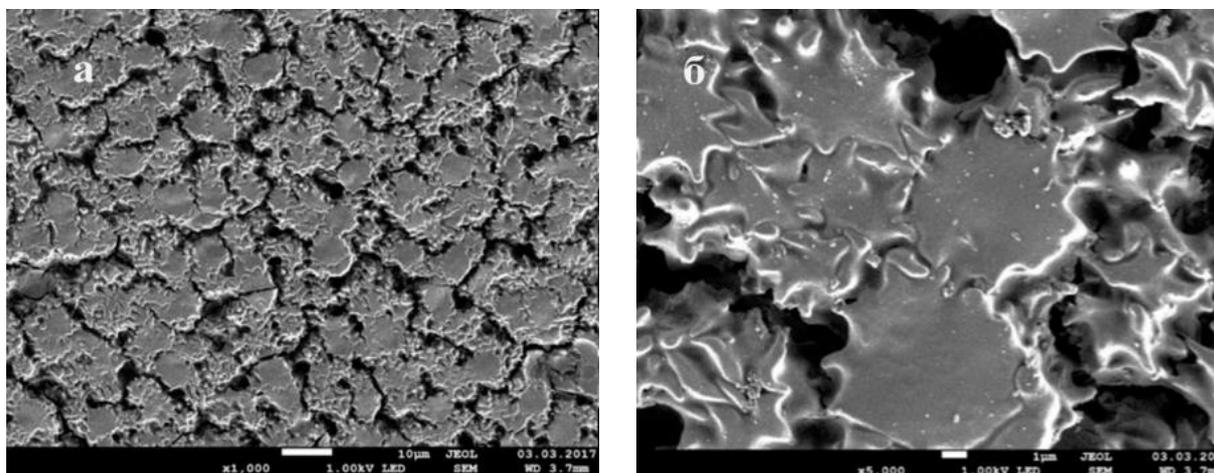


Рисунок 3.51. СЭМ изображения эритроцитов умершего от переохлаждения.

Все эритроциты здесь измененные, скорее всего их можно отнести к эхиноцитам, и при этом они равномерно распределены одним слоем. В отличие от предыдущих изображений на рисунке 3.51 все эритроциты соединены между собой очень плотно отростками и образуют небольшие группы. Отростки эритроцитов у замерзшего имеют более острую форму, чем у умерших от ранений, а также более равномерно распределены по всей поверхности эритроцитов.

Кроме исследований клеток крови из трупного материала были произведены СЭМ исследования клеток крови молодого мужчины-добровольца (рисунки 3.52-3.53). На образец крови были оказаны различные температурные воздействия.

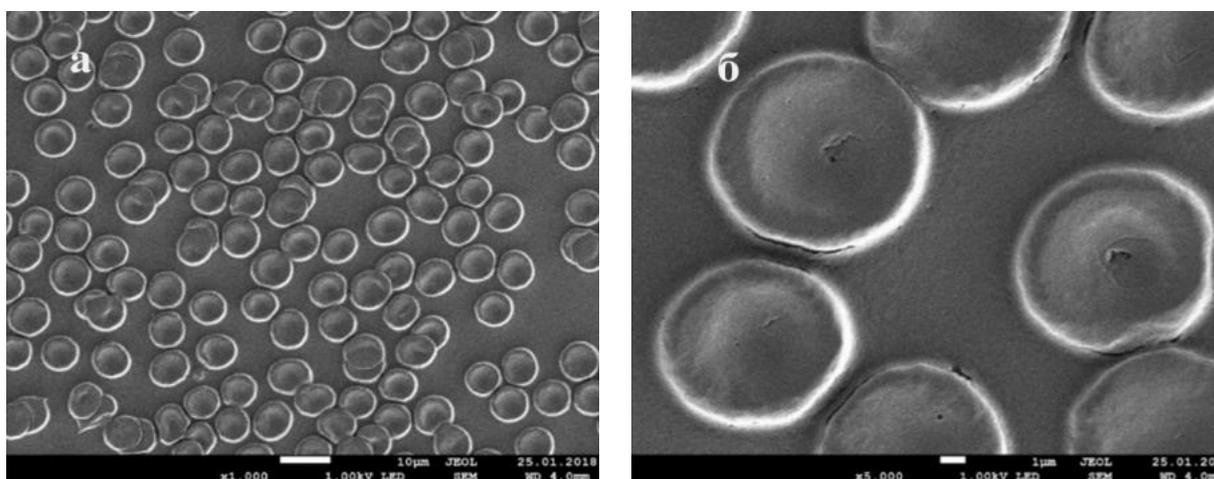


Рисунок 3.52. СЭМ изображения эритроцитов добровольца при температуре +2°C.

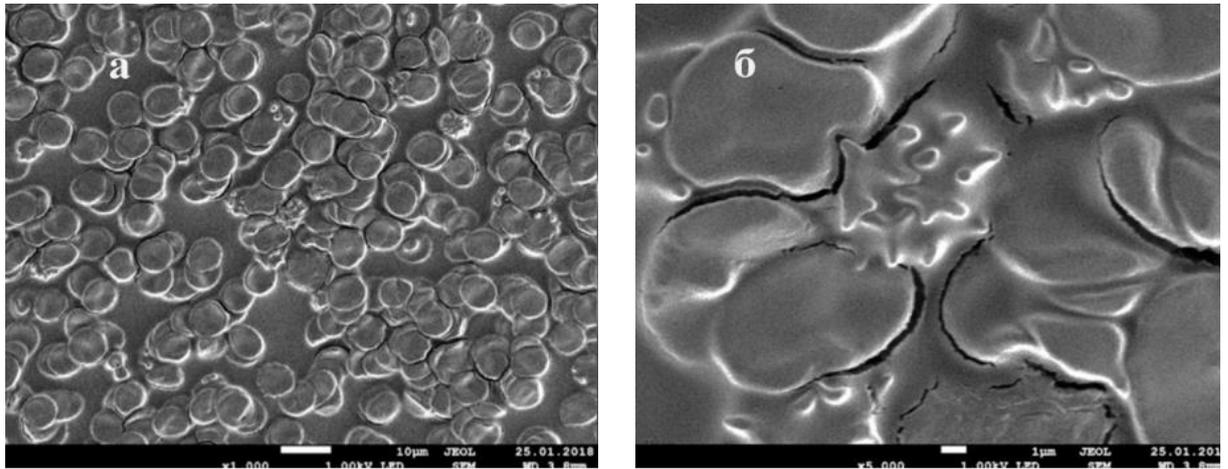


Рисунок 3.53. СЭМ изображения эритроцитов добровольца при температуре  $-1,7^{\circ}\text{C}$ .

При положительных значениях температуры крови (от  $+36,6^{\circ}\text{C}$  до  $+2,0^{\circ}\text{C}$ ) существенных изменений морфологии эритроцитов не наблюдается (рисунок 3.52). Однако при отрицательной температуре ( $-1,7^{\circ}\text{C}$ ) появляются в небольшом количестве дисморфные эритроциты, по форме близкие к акантоцитам (рисунок 3.53), а также небольшое количество шизоцитов.

Результаты свидетельствуют, что появление определенных форм эритроцитов трупного материала зависит от причин смерти. Так, при смерти от колото-резаной и огнестрельной ран эритроциты принимают акантоцитарные формы, а при переохлаждении – эхиноцитарные формы. В результатах эксперимента, проведенного *in vitro*, при небольших отрицательных температурах в СЭМ изображениях наблюдается появление акантоцитов, как и в случаях смерти от ранений. У умерших от переохлаждения и от других причин пробы крови были взяты примерно при одинаковых небольших положительных температурах. Следует отметить, что в исследовании *in vitro* эритроциты не меняли форму до  $+2,0^{\circ}\text{C}$ . Этот факт свидетельствует о том, что появление акантоцитов в крови у умерших от переохлаждения возможно только при длительном пребывании трупа в среде с отрицательной температурой, т.е. при условии понижения температур внутренних жизненно важных органов до отрицательных значений [207].

Изучение состояния эритроцитов при критических, терминальных и постреспираторных состояниях позволяет выявить, как реагируют клетки, ответственные за газообмен в организме, на сильные изменения обмена веществ, происходящие при критических состояниях, и как при этом изменяются их функциональные, структурные и биохимические свойства. Изменения

морфофункциональных свойств эритроцитов приводят к нарушению газообмена, изменению рН крови, и при этом изменяется метаболизм, поскольку эритроциты являются переносчиками некоторых ферментов. Поэтому восстановление или сохранение популяции функциональных эритроцитов может решить не только проблемы, связанные с газообменом, но и восстановить метаболизм, нарушенный при критических состояниях. Необходимы дальнейшие исследования состояния эритроцитов при критических состояниях для поиска способов коррекции морфологических, функциональных и ультраструктурных изменений эритроцитов [208].

Общее охлаждение и отморожения являются одними из тяжелых видов холодовой травмы, зачастую приводящие к высокому уровню инвалидизации и летальному исходу пострадавших [209]. В настоящее время в мире до конца не изучены вопросы смерти от общего охлаждения в условиях сверхнизких температур (ниже  $-40^{\circ}\text{C}$ ). В реальных условиях лиц, умерших от переохлаждения (по внешним признакам) без проведения реанимационных мероприятий доставляются в морг. Немаловажным моментом, возможно считается, что в течение первых 2-х суток пострадавшие находятся в состоянии холодового анабиоза (очень редкий пульс, низкое АД) и вероятность восстановления жизнедеятельности организма не исключается (отмечаются случаи сохранения жизнедеятельности сердца и других органов у замерзших животных). Учитывая вышеперечисленное, нам представляется интересным определение особенностей морфологии эритроцитов при воздействии на организм низких температур (ниже  $-40^{\circ}\text{C}$ ) у умерших от переохлаждения в условиях Якутии.

Также обследованы мазки крови умершего от переохлаждения неизвестного мужчины 35-40 лет, обнаруженного в окрестности г. Якутска и доставленного ночью (температура воздуха ниже  $-45^{\circ}\text{C}$ ).

Первые мазки (до вскрытия) были сделаны сразу после доставки трупа в морг из области печени, т.к. проведенная термометрия внутренних органов и тканей показала максимальное значение температуры именно в печени, равную  $+24^{\circ}\text{C}$ . Вторые мазки были сделаны через двое суток после полного оттаивания трупа после вскрытия.

В нашем исследовании анализ СЭМ изображений до вскрытия трупов указывает, что в исследуемых полях зрения отмечается конгломерация эритроцитов и преобладание дискоцитов (рисунок 3.54). Только около 15% эритроцитов имеют измененную форму: содержание эхиноцитов – сферических клеток, на поверхности которых достаточно

регулярно располагаются так называемые спикулы, составило всего 13,72%, а акантоцитов – 2,68%.

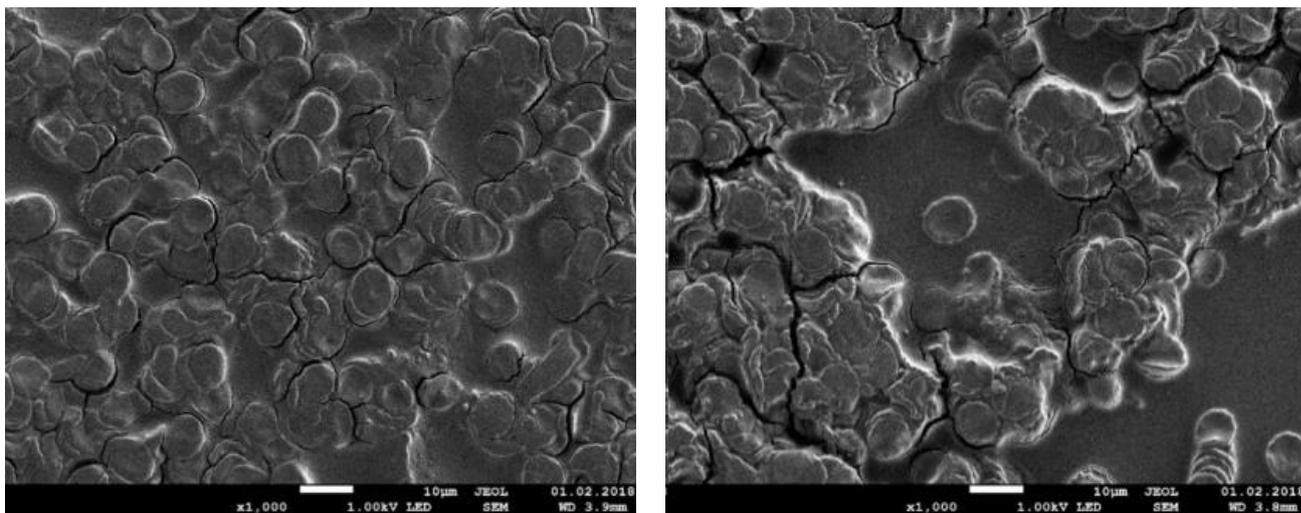


Рисунок 3.54. СЭМ изображения эритроцитов умершего от переохлаждения при увеличении в 1000х до вскрытия.

Исследование мазков крови, сделанных после вскрытия, т.е. после воздействия положительной комнатной температуры, процент эхиноцитов увеличился в 2,01 раза и составило 27,58%, а процент акантоцитов наоборот уменьшился в 3,11 раз до 0,86% по сравнению с данными до вскрытия (рисунок 3.55). Следует отметить, что конгломераты из измененных эритроцитов после вскрытия стали крупнее размером, а степень изменений мембраны эритроцитов (за счет увеличения эхиноцитов) существенно увеличилась.

Выявленные особенности морфологии эритроцитов при переохлаждении, а именно существенное преобладание эхиноцитов над акантоцитами, косвенно могут подтверждать возможность восстановления эхиноцитов в дискоциты, но при соблюдении определенных условий среды.

Нами проведен сравнительный анализ диаметров эритроцитов до и после вскрытия трупа, который выявил статистически значимые различия ( $p=0,043$ ), ( $7,78 \pm 1,30$  мкм и  $6,94 \pm 1,25$  мкм, соответственно). Характерно, что до вскрытия преобладали эритроциты с диаметром больше 8 мкм, а после вскрытия – эритроциты менее 7 мкм. Кроме того, оценивались длина и ширина спикул до и после вскрытия. Длина и ширина спикул эхиноцитов до вскрытия оказались существенно больше, чем после вскрытия [210].

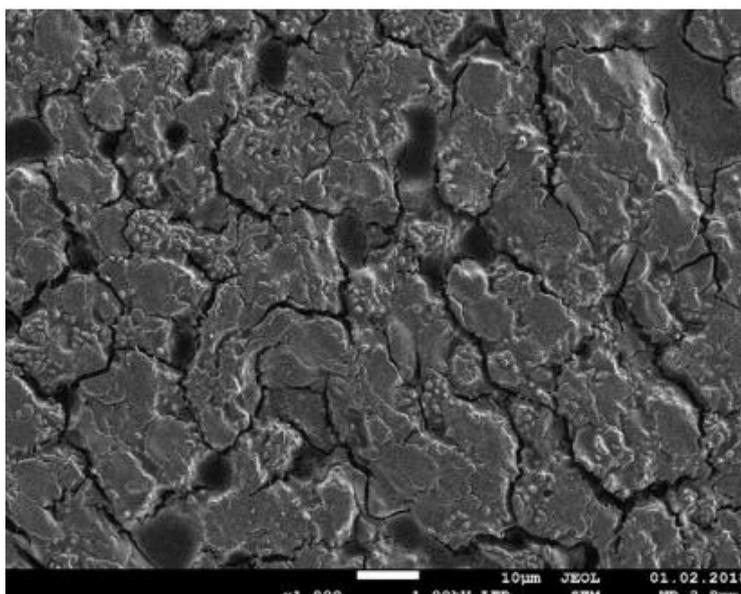


Рисунок 3.55. СЭМ изображения эритроцитов умершего от переохлаждения при увеличении в 1000х после вскрытия.

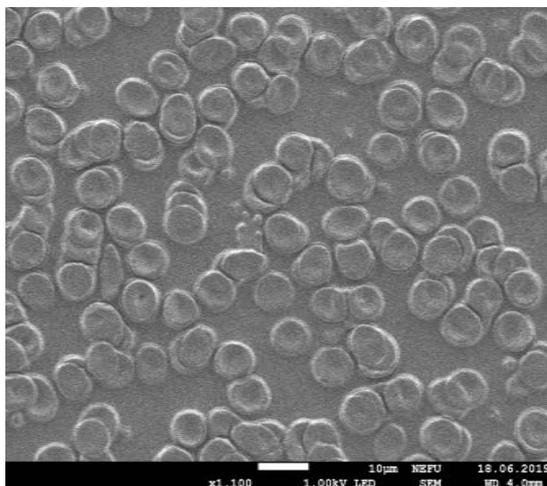
Полученные результаты свидетельствуют о наличии существенных различий в морфологии эритроцитов, что указывает на необходимость дальнейшего изучения этой проблемы для выявления зависимости возможного восстановления клеток, их нормальной популяции и их функциональных свойств в зависимости от способа отогревания умерших от переохлаждения при определенных температурных условиях.

Кроме того, были исследованы особенности изменения морфологии эритроцитов при постепенном охлаждении (ПО) и быстрой заморозке (БЗ) крови детей с заболеванием почек с макрогематурией наряду с исследованием эритроцитов крови другой возрастной группы с заболеваниями почек, а также для сравнения эритроцитов крови пациентов с другой патологией, а именно эритроцитов у пациентов с РШМ с помощью СЭМ.

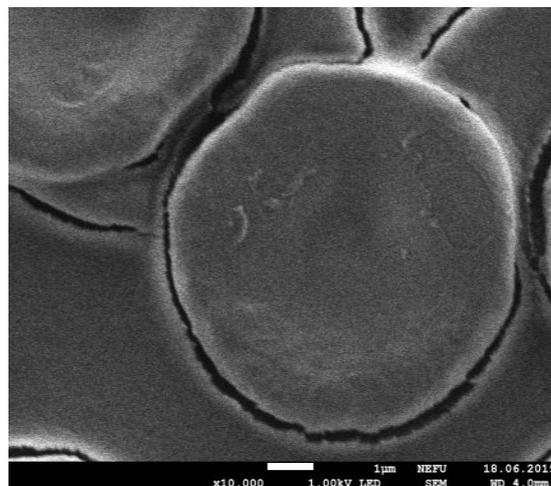
При мгновенной (шоковой) заморозке (БЗ) мазки крови выдерживали в парах жидкого азота. Использовали кровь контрольной группы (14-17 лет) и детей с гематурией возрастной группы от 14 до 16 лет. В ходе пробоподготовки готовились мазки крови на стеклянной подложке, высохшие мазки крови выдерживали в сосуде с жидким азотом (при температуре  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), и сразу после выравнивания температуры объекта и охлаждающей жидкости (на что указывает остановка интенсивного кипения азота) извлекались из жидкого азота и выдерживались в камере под определенным углом при комнатной температуре  $18-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

В ходе эксперимента сопоставляли морфологию эритроцитов больных и здоровых людей при разных температурах. На рисунке 3.56 представлены изображения

эритроцитов крови женщины из контрольной группы при температуре 18,4°C. Из 62 эритроцитов в поле зрения на СЭМ изображении количество нормоцитов составляет 64%, овалоцитов – 33%, эхиноцитов – 2%, акантоцитов – 1%.



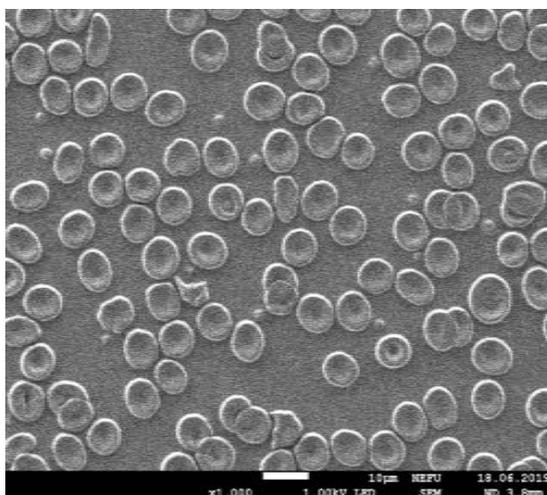
а)



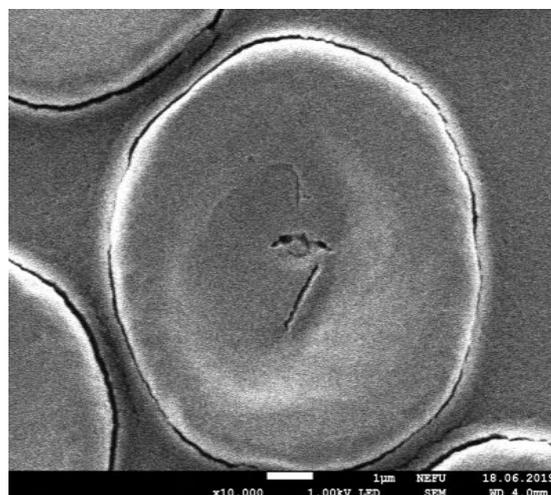
б)

Рисунок 3.56. СЭМ изображения эритроцитов крови донора при 18,4 °С:  
а) при 1 000х; в) при 10 000х.

При снижении температуры до 6,1 °С наблюдается увеличение количества дисморфных эритроцитов (рисунок 3.57). Из 84 эритроцитов овалоциты составляют 54%, нормоциты – 43%, акантоциты – 1%, шизоциты – 1%, пойкилоциты – 1%.



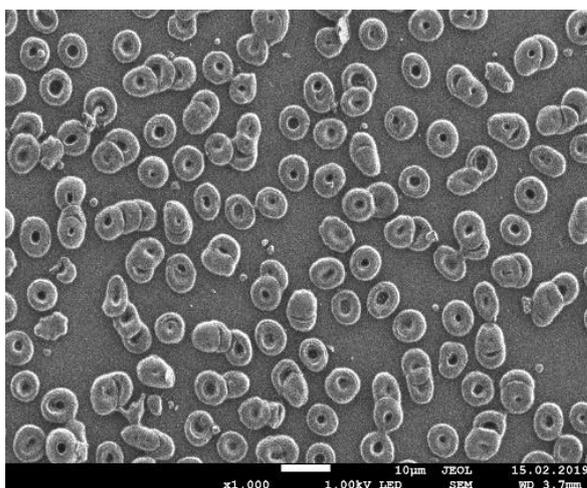
а)



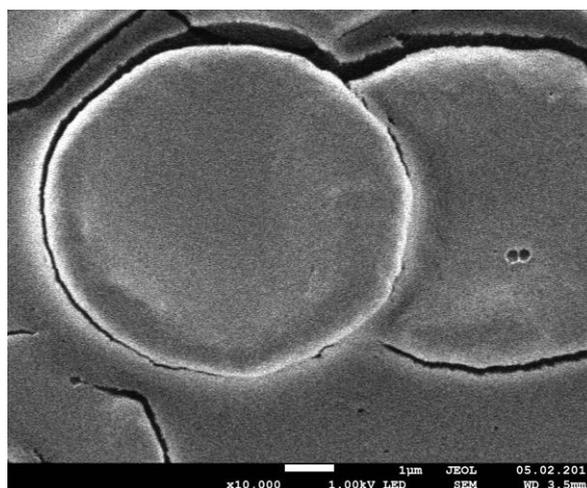
б)

Рисунок 3.57. СЭМ изображения эритроцитов крови донора при 6,1 °С:  
а) при 1 000х; в) при 10 000х.

При снижении температуры до 0,4 °С все эритроциты дисморфны (рисунок 3.58). В поле зрения СЭМ изображения из 41 эритроцитов эхиноциты составляют – 64%, клетки-мишени – 36%.



а)

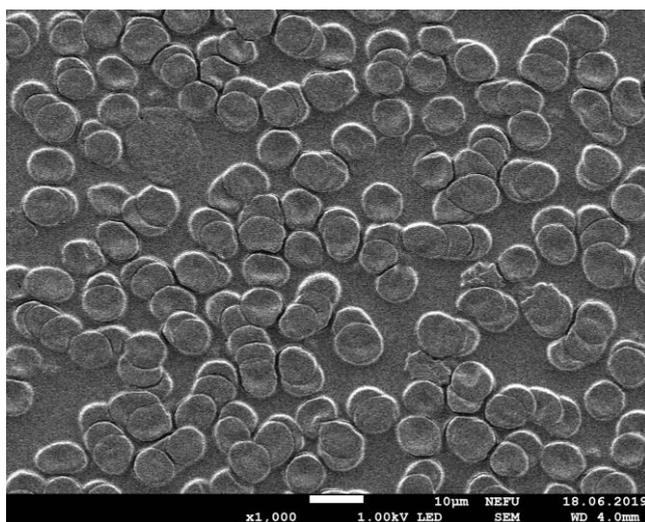


б)

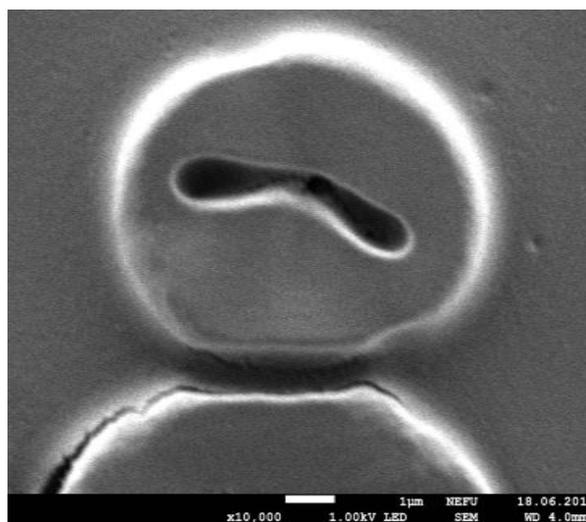
Рисунок 3.58. СЭМ изображения эритроцитов крови донора крови при 0,4 °С:  
а) при 1 000х; в) при 10 000х.

В следующей серии экспериментов исследовали изменения морфологии крови больной мезангиопролиферативным гломерулонефритом (рисунок 3.59). При температуре 19 °С из 97 эритроцитов нормоциты составляют 73%, овалоциты – 16%, сфероциты – 7%, эхиноциты – 4%. Кроме изменения формы наблюдаем образование монетных столбиков.

При 19 °С на поверхности эритроцита больного пациента наблюдается глубокая впадина в виде продолговатой формы, размер которой составляет 4,78×0,79 мкм (Рисунок 3.59б)).



а)

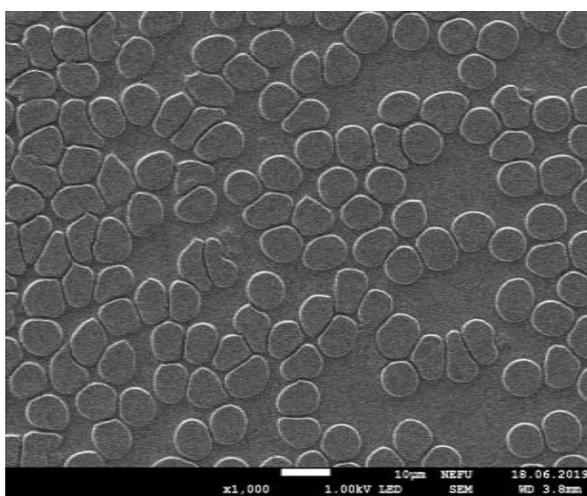


б)

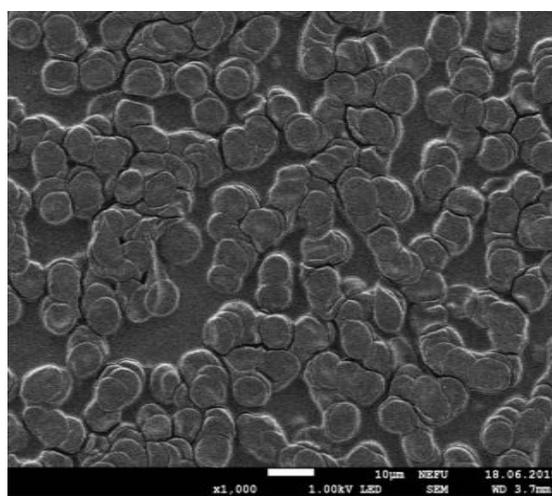
Рисунок 3.59. СЭМ изображения эритроцитов крови больного мезангиопролиферативным гломерулонефритом при 19 °С:  
а) при 1 000х; б) при 10 000х.

При температуре 11,7 °С меняется форма эритроцитов, исчезает вогнутость (рисунок 3.60а). К тому же из 109 эритроцитов наблюдается выраженный пойкилоцитоз (вариабельность эритроцитов по форме) – 76%. Встречается анизоцитоз эритроцитов (вариабельность эритроцитов по размеру) и присутствие сфероцитов – 24%.

При достижении температуры 5 °С выявлены эритроциты различных форм (рисунок 3.60б). Из 128 эритроцитов 34% составляют акантоциты, клетки-мишени – 27%, дискоциты – 18%, овалоциты – 11%, сфероциты – 10 %. На изображениях присутствуют монетные столбики. При температуре 5 °С выявлены существенные изменения в морфологии клетки, наблюдается уплощенный эритроцит, т.е. исчезает вогнутость и обретает дегенеративно – измененную форму (рисунок 3.61).



а)



б)

Рисунок 3.60. СЭМ изображения эритроцитов крови больного мезангиопролиферативным гломерулонефритом: а) при 1 000х (11,7 °С); б) при 1 000х (5 °С).

В следующей серии экспериментов исследовали морфологию эритроцитов крови больных с РШМ в условиях цикла «заморозка – разморозка» (рисунок 3.61). Полученные СЭМ изображения эритроцитов больных с РШМ до заморозки не выявили изменений мембраны (1000х). У всех пациентов изначально на поверхности эритроцитов обнаружены НРС с размерами от 30 до 135 нм (рисунок 3.62). Установлено, что после проведения цикла «заморозка–разморозка» морфология эритроцитов не изменилась.

При более высоком увеличении обнаружено, что на поверхности клетки появились хлопьевидные объекты, линейные размеры которых сильно варьируют: от 0,3 до 1,6 микрон. Отметим что число наноразмерных структур на поверхности клетки, которые были обнаружены до цикла, существенно снизилось. В одном из образцов крови

нанообъекты вообще не обнаружены, но на поверхности плазмы видны хлопьевидные объекты (рисунок 3.62 б).

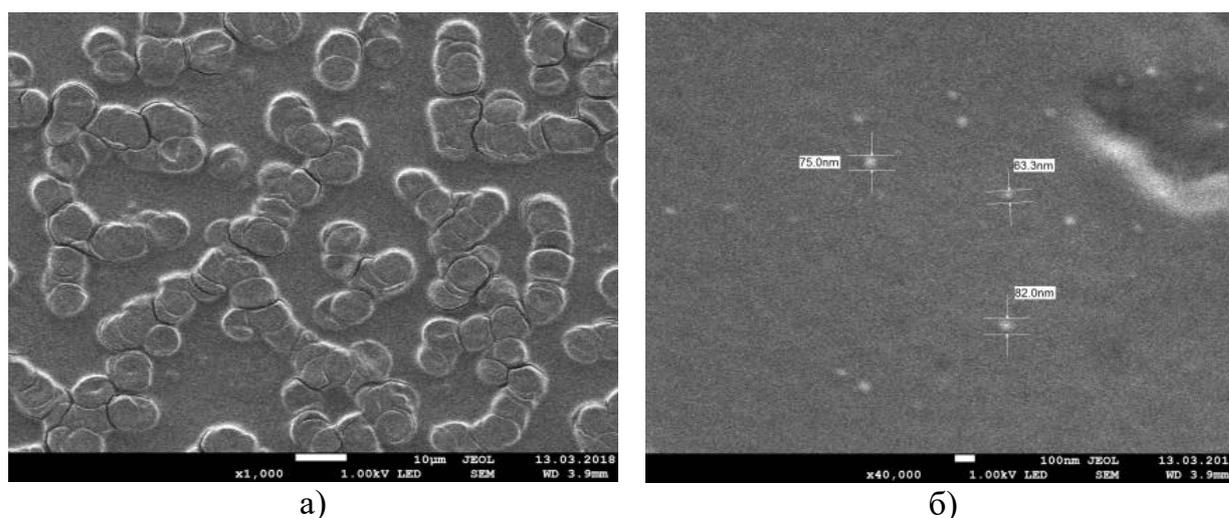


Рисунок 3.61. СЭМ изображения эритроцитов крови больных с РШМ до заморозки при увеличении: а) в 1 000 раз; б) 40 000 раз.

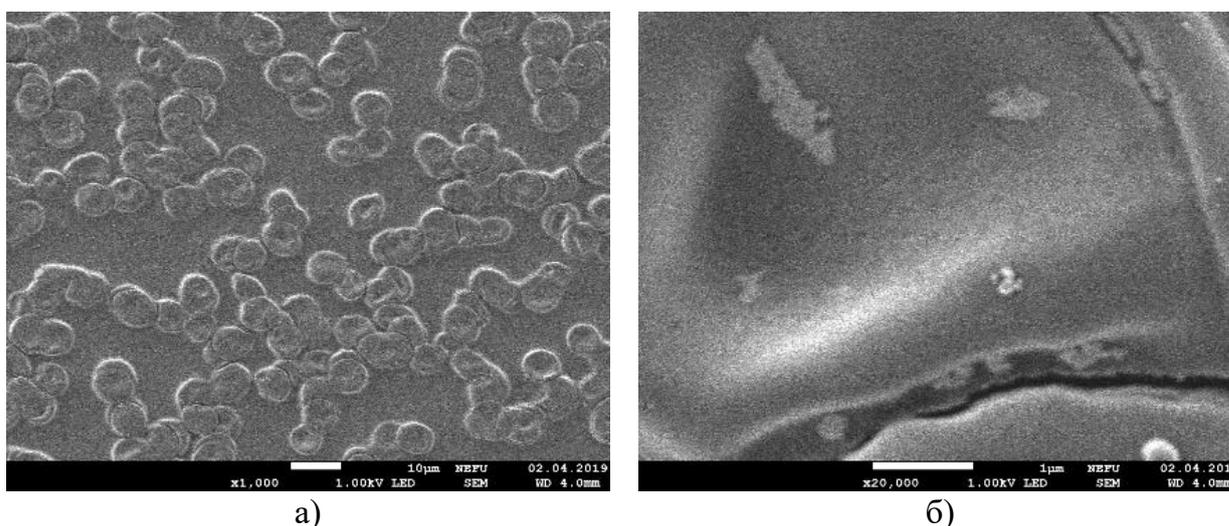


Рисунок 3.62. СЭМ изображения эритроцитов крови и поверхности эритроцита больных с РШМ после цикла «заморозки–разморозки» при увеличении соответственно: а) в 1 000 раз; б) в 20 000 раз.

В результате оценки особенностей морфологии эритроцитов при постепенном охлаждении и при шоковой заморозке жидким азотом, на СЭМ и оптических микроскопах, мы установили, что СЭМ позволяет получить дополнительно больше информации о наличии НРС, рельефе поверхности и формах эритроцитов. Также НРС, выявленные на поверхности эритроцитов до заморозки, являются инородными частицами, закреплёнными на поверхности эритроцитов.

При проведении обоих видов экспериментов эритроциты больных с определенным диагнозом, которые выглядели визуально нормальными при нормальных температурных

условиях, подвергаются более большим изменениям, чем эритроциты крови контрольной группы. Использование СЭМ позволило установить, что повреждения эритроцитов при разных патологиях в условиях шоковой заморозки, а именно при РШМ и заболеваниях почек с гематурией, существенно отличаются. Вероятно, исследование крови больных в данных температурных условиях является дополнительной технологией при разработке дифференциальной диагностики различных заболеваний и, возможно, привнести дополнительную информацию в фундаментальные представления о причине и ходе их развития.

### **3.3.6 Исследование синовиальной жидкости при ревматических заболеваниях методом сканирующей электронной микроскопии**

В последние десятилетия наблюдается непрерывный рост заболеваемости артритам как в мире, так и в Российской Федерации. В частности, в Республике Саха (Якутия) распространенность ревматических заболеваний в 1,5–2 раза превышает средние показатели по стране [211].

Исследование синовиальной жидкости становится важным инструментом для выявления кристаллов и анализа морфологических характеристик, используемых в диагностике заболеваний суставов. На сегодняшний день существует множество методов диагностики ревматических заболеваний, включая применение оптической микроскопии в исследованиях синовиальной жидкости. Однако на практике создание оптимального алгоритма диагностики, позволяющего точно поставить диагноз каждому пациенту, сталкивается с определенными трудностями, связанными с ограничениями существующих методик.

Одним из серьезных недостатков оптической микроскопии является её ограниченная способность к пространственному разрешению и пределам увеличения объектов, что связано с физическими свойствами света, такими как длина волны. Это создает препятствия для исследования морфологии биологических объектов на нанометровом уровне. Из-за этих ограничений современная диагностика не позволяет в полной мере изучить особенности биологических образцов на клеточном и молекулярном уровнях, что мешает получению точных морфологических характеристик синовиальной жидкости на ранних стадиях заболевания, которые могут оставаться незамеченными при использовании только оптических методов. Иными словами, актуальность проблемы

связана не только с ростом заболеваемости, но и трудностью идентификации кристаллов при различных ревматических патологиях, а также возможностью ранней диагностики до развития бурной клинической картины.

Кроме того, проведение исследования синовиальной жидкости, возможно, необходимо в решении проблемы несостоятельности результатов ортопедических и травматологических вмешательств, основной причиной которых является имплант-ассоциированная инфекция.

Микрокристаллические артриты – группа заболеваний, обусловленных воспалением в местах отложения образующихся *in vivo* кристаллов. И хотя провоспалительный потенциал для различных кристаллов отличается (кристаллов моноурата натрия, пирофосфатов кальция, гидроксиапатита и др.), все они клинически могут проявляться острым воспалением, чаще артритом или периартикулярным поражением одного или нескольких суставов. Наиболее часто микроскопические артриты вызываются кристаллами уратов (подагра) и пирофосфата кальция.

В последнее время пристально изучается роль кристаллов пирофосфата кальция (ПФК) дигидрата в развитии патологии опорно-двигательного аппарата. Распространенность болезней, связанных с отложением кристаллов кальция, нарастает с увеличением возраста пациентов, составляя 10–15% у больных 65–75 лет и достигая 40% у лиц старше 80 лет. Понятие частоты встречаемости пирофосфатной артропатии достаточно условно, так как болезнь может маскироваться остеоартрозом (ОА), ревматоидным артритом, подагрой, проявляться в виде недифференцированного артрита, что затрудняет ее своевременную диагностику [212].

Кристаллы ПФК в хряще и в синовиальной жидкости при ОА определяются у 65% больных гонартрозом [213,214]. Кристаллы ПФК первоначально откладываются в толще суставного хряща, затем на его поверхности, а впоследствии — в синовиальной оболочке и периартикулярных тканях [215].

Подтверждают наличие кристаллов ПФК в синовиальной жидкости методом поляризационной световой микроскопии в виде характерных кристаллов (в форме параллелепипеда, преимущественно внутриклеточных, со слабым светоотражением или его отсутствием). Следует учитывать, что при исследовании в поляризованном свете определяется примерно 1/5 часть всех кристаллов ПФК. В последнее время для визуализации кристаллов ПФК предлагается использовать люминесцентную

микроскопию с применением кальций-чувствительного флуоресцентного зонда Fluo-4. Данный метод позволяет проводить и проточную цитометрию для быстрого полуколичественного анализа кристаллов. При определенном опыте исследователя кристаллы пирофосфата кальция могут быть идентифицированы при обычной световой микроскопии (в отличие от игловидных уратов они имеют вид параллелепипедов с «обрубленными» концами, ромбов).

Более достоверным способом обнаружения и идентификации кристаллов является микроскопия в поляризованном свете с применением компенсатора, при которой определяется способность кристаллов пирофосфата к слабому двойному лучепреломлению [216]. Исследование в поляризованном свете позволяет обнаружить кристаллы пирофосфата кальция в 5 раз чаще, чем при обычной микроскопии. Но, несмотря на это, определение кристаллов ПФК в синовиальной жидкости является трудной и трудоемкой задачей.

Диагностика и лечение микрокристаллических артритов, несмотря на их широкое распространение, до сих пор вызывают затруднение. В доступной нам литературе отсутствуют исследования микрокристаллов синовиальной жидкости методами электронной микроскопии. Пункция суставов с последующим исследованием синовиальной жидкости является незаменимым диагностическим методом, позволяющий в большинстве случаев при правильном методологическом подходе идентифицировать различные кристаллы и распознать подагру и ПФА даже в межприступный период.

Хронические суставные патологии практически не поддаются лечению и во многих случаях приводят к необходимости проведения эндопротезирования – операции, суть которой состоит в замене суставов искусственным имплантатом.

Причины возникновения несостоятельности имплантации в настоящее время связывают с возникновением послеоперационной инфекции без учета особенностей характеристик синовиальной жидкости до проведения операции. Существует большое количество исследований, связанных с инфекционной причиной результатов процесса эндопротезирования в связи с разработкой имплантатов с антибактериальными покрытиями [217]. Также существуют методы радиационной стерилизации имплантатов [218], позволяющие снизить вероятность инфицирования. Несмотря на постоянные улучшения материалов имплантатов до сих пор существует большой процент несостоятельных ортопедических и хирургических вмешательств. И в связи с этим

появляются новые методики диагностики перипротезной инфекции [219]. Но эти подходы недостаточны для проведения своевременной диагностики и для проведения безопасных операций эндопротезирования с меньшей вероятностью несостоятельности.

Таким образом, существует проблемы и в диагностике, и в терапии ревматических заболеваний, решение которых требует больших временных и финансовых затрат, связанных с попытками восстановления качества жизни пациентов. Разработка новых подходов при решении этих проблем является необходимым.

Объектом исследования явились сухие мазки синовиальной жидкости, полученные при пункции коленного сустава 101 пациентов с различными диагнозами: ревматоидный артрит – 25, подагра – 18, реактивный синовит – 15, остеоартроз – 25, пирофосфатная артропатия – 18.

Анализ СЭМ изображений свидетельствует о наличии существенных различий форм, размеров и степени конгломерации кристаллов в зависимости от диагноза и формы течения. Дополнительная информация было получена при использовании данных энергодисперсионного микроанализа Oxford INCA Energy-350, который позволяет оценить соотношение макроэлементов и их спектр.

На рисунке 3.63 представлены СЭМ изображения синовиальной жидкости с предварительным диагнозом подагра.

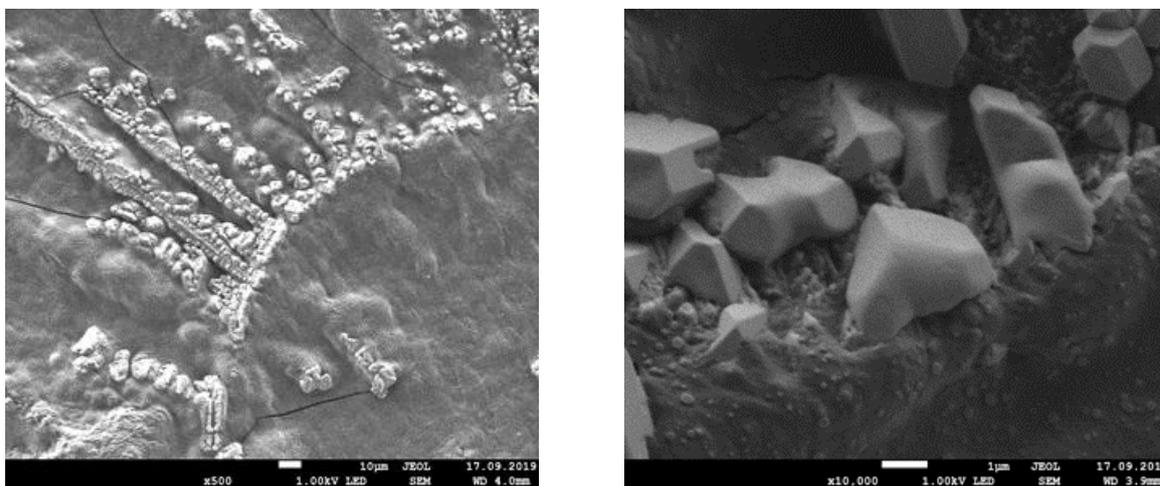


Рисунок 3.63. СЭМ изображения сухого мазка синовиальной жидкости при различных увеличениях: а) x 500; б) x 10 000.

Мазок синовиальной жидкости при подагре характеризуется большим количеством кристаллов в поле зрения по сравнению с мазками пациентов с другими формами артритов. На изображениях в основном наблюдались кристаллы двух видов: мелкие, размер которых варьируется от 0,1 до 0,3 мкм; крупные с размерами от 0,6 до 2,0 мкм.

Результаты спектрального анализа элементного состава кристалла в мазке пациента с подагрой представлены на рисунках 3.64-3.65.

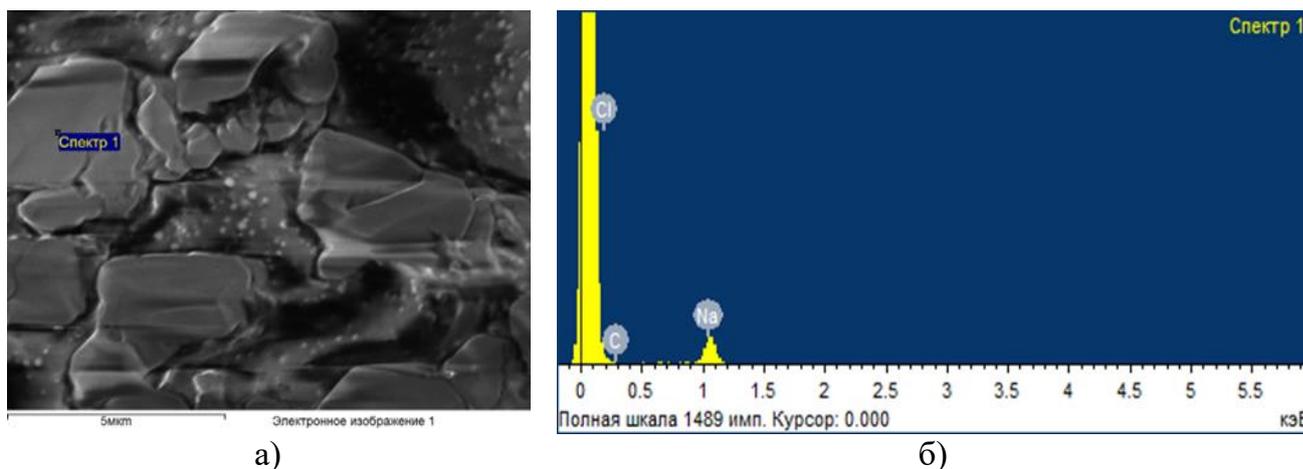


Рисунок 3.64. СЭМ-исследование образца синовиальной жидкости пациента с диагнозом подагра: а) СЭМ-изображение выбранного наиболее крупного кристалла с текстом «Спектр 1» сухого мазка синовиальной жидкости пациента; б) спектр элементов кристалла, указанного на рисунке 3.65 а).

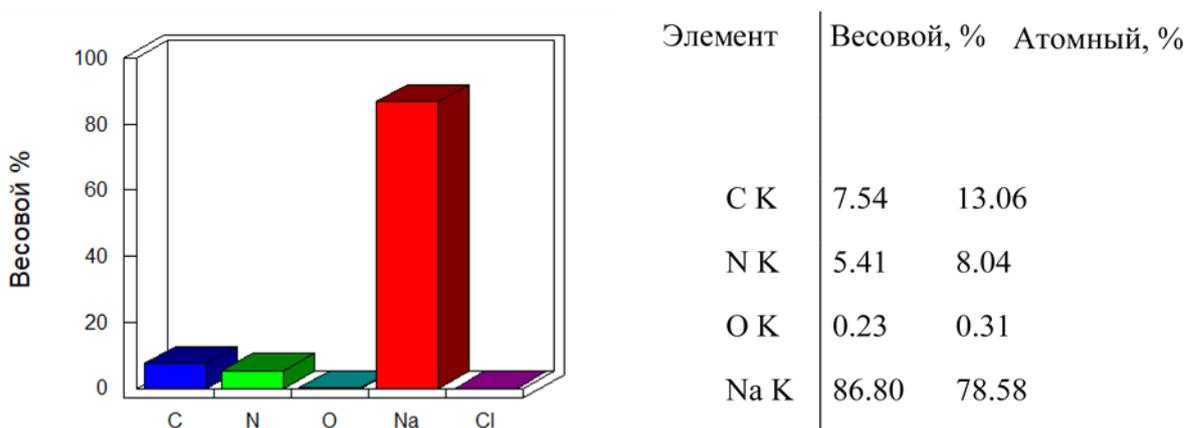
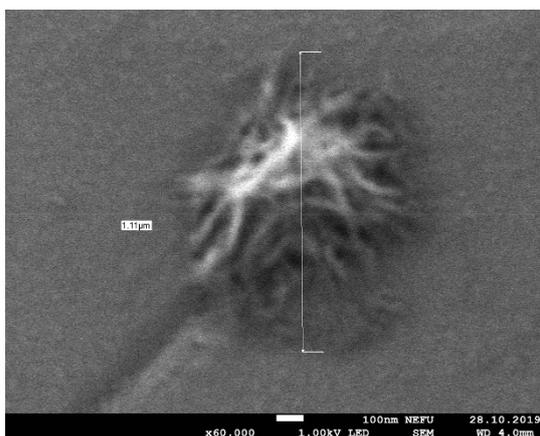


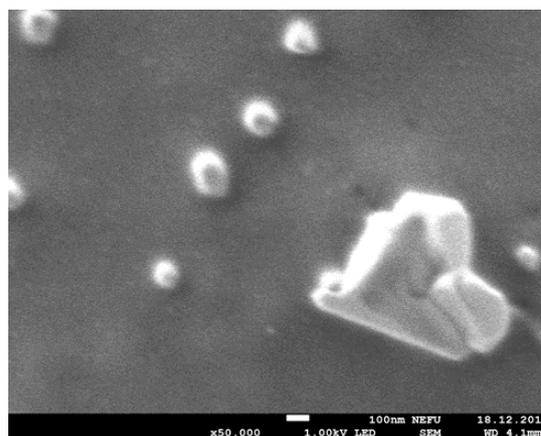
Рисунок 3.65. Количественные результаты элементного анализа мазка пациента с диагнозом подагра.

Как видно из спектрального анализа, кристаллы в подавляющем большинстве состоят из Na, C, N, O, где содержание Na преобладает над другими.

В некоторых образцах синовиальной жидкости с различными патологиями коленного сустава на СЭМ изображениях кроме кристаллов обнаружены объекты, которые по размерам соответствуют вирусам и бактериям. Известно, что инфицирование сустава может наблюдаться не только при реактивных артритах. На рисунке 3.66 представлен объект, по размерам (около 1 мкм) и форме похожий на бактерию и НРС, по размерам предположительно вирусы.



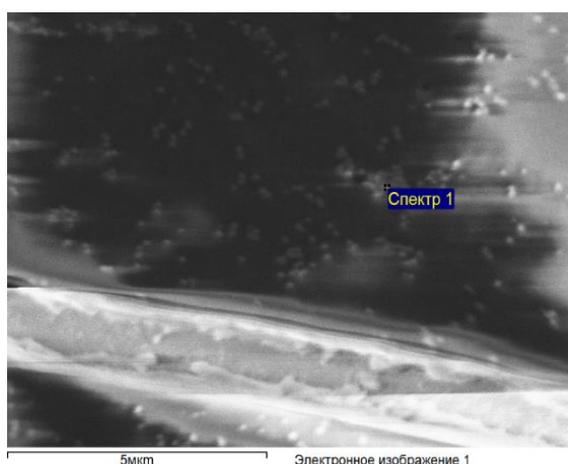
а)



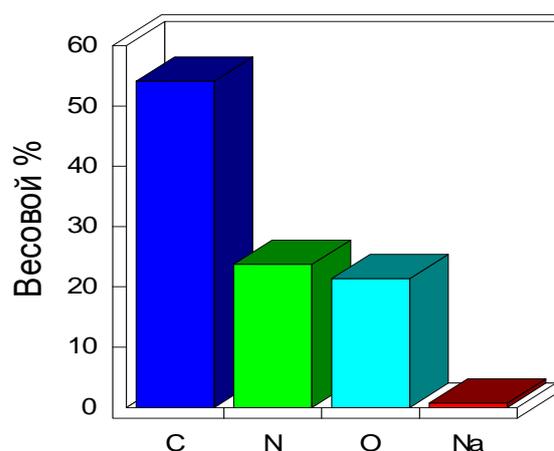
б)

Рисунок 3.66. СЭМ изображения: а) предполагаемой бактерии при увеличении  $\times 60\,000$  с указанием ее размера; б) предполагаемых вирусов при увеличении в  $50\,000$  раз.

На рисунке 3.67 представлена диаграмма количественного элементного анализа НРС – предполагаемого вируса. Количественный спектральный анализ показывает органическую природу этой НРС, который косвенно подтверждает предположение об их вирусной природе.



а)



б)

Рисунок 3.67. а) СЭМ изображение образца синовиальной жидкости; б) Весовое, атомное процентные распределения элементов НРС образца синовиальной жидкости.

Полученные СЭМ изображения позволили более детально изучить строение, формы, размеры и особенности расположения микрокристаллов в образцах синовиальной жидкости пациентов с различными диагнозами патологии суставов.

Полученные особенности СЭМ изображений и спектрального анализа химических элементов кристаллов могут иметь в будущем важное значение для дифференцирования диагноза и могут стать основой для разработки новых диагностических методов. Показано, что качество СЭМ изображений при более больших увеличениях по сравнению с оптическими микроскопами и одновременная возможность проведения элементного

анализа повышают достоверность диагностики ревматических заболеваний. Определено, что СЭМ является весьма информативной методикой обследования больных ревматическими заболеваниями. Перспективность ее использования заключается в выявлении данных заболеваний на ранних стадиях и возможности более детальной оценки динамики лечения.

Методами СЭМ и АСМ установлено, что на поверхности эритроцитов при гломерулонефритах, РШМ и РМЖ присутствуют НРС, размеры которых варьируют от 45 до 55 нм и от 100 до 300 нм, что сопоставимы с размерами вирусов.

Дальнейшее изучение микро- и нанообъектов синовиальной жидкости методом СЭМ в совокупности с морфологией кристаллов в ней, могут представить интерес в исследованиях, связанных с разработкой имплантатов и проблемой снижения вероятности послеоперационного инфицирования.

В ходе исследований синовиальной жидкости коленного сустава в некоторых образцах были обнаружены НРС, размеры которых сопоставимы с размерами вирусов (50 нм), а также бактерий, превышающие 1 микрон.

Таким образом, результаты всех проведенных исследований эритроцитов и НРС при различных патологиях в установленном режиме работы СЭМ подчеркивают широкий спектр применения СЭМ. Этот метод, позволяющий визуализировать биологические образцы на уровне нанометров при низких энергиях электронных пучков, открывает новые горизонты для разработки высокоразрешающих модификаций СЭМ, предназначенных для детального исследования биологических образцов.

### **3.2.7 Формирование базы данных изображений эритроцитов в патологии, полученных методом сканирующей электронной микроскопии, и их основных параметров**

На основе полученных нами изображений эритроцитов методом СЭМ была сформирована база данных изображений эритроцитов крови пациентов с РШМ и детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии «База данных РЭМ-изображений эритроцитов при раке шейки матки и заболеваниях почек у детей с синдромом гематурии и их основных параметров (определённые методами математической статистики с применением программы Microsoft Excel)», полученные с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) — СЭМ JSM 7800 F JEOL с термополевым катодом

Шоттки и с супергибридной линзой в режиме детектирования вторичных электронов. Для получения изображений эритроцитов методом СЭМ были подготовлены образцы венозной крови пациентов в виде тонких слоев, равномерно нанесенных на сухое обезжиренное предметное стекло, которые высушивались при нормальной температуре. Мазки исследовали при ускоряющих напряжениях 1-1,5 кВ и фокусных расстояниях 3,8-4,1 мм. Т.к. изображения эритроцитов получали при низких ускоряющих напряжениях, мазки не подвергались напылению золотом. Изображения получали при различных увеличениях (500х-100000х).

Все изображения были распределены по папкам отдельно для каждого пациента, которые были объединены в отдельные папки по виду заболевания. Были отобраны изображения эритроцитов при увеличении в 1000 раз: были созданы папки с изображениями эритроцитов для каждого пациента.

Линейные размеры эритроцитов измерялись с помощью компьютерной программы JMicroVision v1.2.7, которая находится в свободном доступе. Заполнялись таблицы линейных размеров каждого видимого эритроцита в поле зрения изображения мазка крови каждого пациента с указанием вида заболевания, даты забора крови и проведения исследования. Все полученные данные в виде таблиц были обработаны методом математической статистики с помощью программы Microsoft Excel. С помощью Excel были определены основные статистические данные эритроцитов и построены гистограммы линейных размеров эритроцитов в норме и патологии для каждого пациента. Кроме того, были определены количественные соотношения дисморфных эритроцитов в процентах по их основным морфологическим данным для каждого образца.

На рисунках 3.68, 3.69, 3.70 для примера представлены: 1) Excel-файл таблица, включающие данные двух пациентов с диагнозом РШМ: вид дисморфных эритроцитов с их количеством, их процентное соотношение, размеры, средние значения линейных размеров, среднее квадратичное значение, дисперсия, ссылка на файл, где находятся данные пациента в базе данных (рис. 3.68) ; 2) изображения эритроцитов (файлы JPG), полученные с помощью СЭМ (рис. 3.69), и 3) Excel-файлы с таблицами линейных размеров эритроцитов в поле зрения каждого СЭМ снимка, включающие средние линейные размеры эритроцитов, диаграммы процентного соотношения эритроцитов

различных видов дисморфии, а также гистограммы линейных размеров эритроцитов для каждого пациента (рис. 3.70).

№	Диагноз пациента	дисморфия эритроцитов			Увеличение	линейный размер, мкм	среднее значение линейного размера, мкм	среднее квадратичное линейного размера, мкм	дисперсия	ссылка File
			кол-во	%						
1	РШМ	нормациты 31	31	13,78%	1000	8,15	7,61	0,70	0,84	<a href="#">АРХИВ ДАННЫХ</a> примеры для РИД 30.11.22'Ионова С.1 и 2 эт. ЛТ графики.xlsx
		эхиноциты 34	34	15,11%		7,86				
		овалоциты 41	41	18,22%		7,42				
		оборванные 5	5	2,22%		8,04				
		мишеневидные 20	20	8,89%		7,50				
		серповидные 6	6	2,67%		7,55				
		шлемовидные 48	48	21,33%		7,96				
		промежуточные 34	34	15,11%		8,33				
		полудунные 2	2	0,89%		7,61				
		каплевидные 3	3	1,33%		7,60				
акантоцит 1	1	0,44%								
2	РШМ	дискоциты 10	10	9,17%	1000	7,21	6,85	0,39	0,23	<a href="#">АРХИВ ДАННЫХ</a> примеры для РИД 30.11.22'Ионова С.РЭМ 1 этап ЛТ.xlsx
		платициты 6	6	5,50%		7,05				
		эхиноциты 23	23	21,10%		6,93				
		каплевидные 3	3	2,75%		6,36				
		овалоциты 21	21	19,27%		6,09				
		шлемовидные 26	26	23,85%		6,56				
		промежуточные 16	16	14,68%		7,41				
		менискоциты 2	2	1,83%		6,53				
		дрепаноциты 2	2	1,83%		7,61				
						6,79				

Рисунок 3.68. Пример Excel-файла таблицы, включающие данные пациентов с диагнозом рак шейки матки.

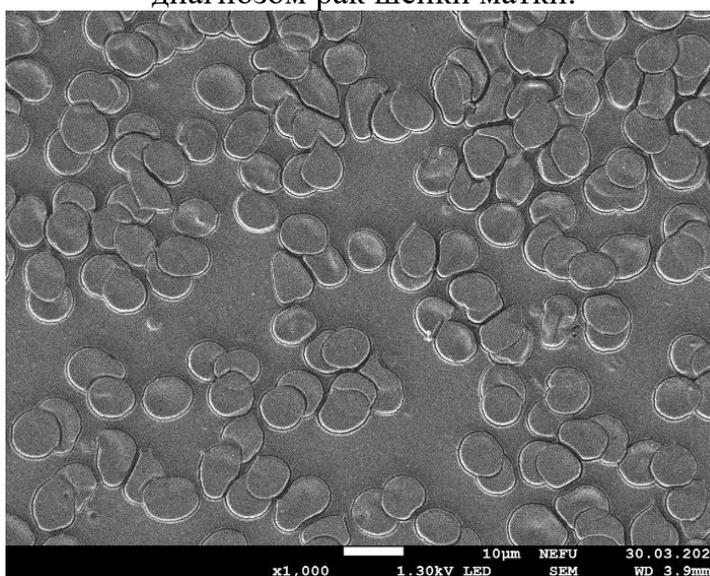


Рисунок 3.69. СЭМ изображение эритроцитов крови пациента с диагнозом РШМ при увеличении в 1000х.

Область применения базы данных – это биомедицина, образование, трансляционная и персонализированная медицина. В области биомедицины данная база данных может применена для проведения научно-исследовательских работ, связанных с изучением онкологических заболеваний, для разработки методик дифференциального диагностирования видов гломерулонефритов, для построения модели эритроцитов при раке шейки матки, заболеваниях почек у детей с синдромом гематурии, для построения новых машинных программ, которые могут быть применены в комплексных диагностических методиках заболеваний.

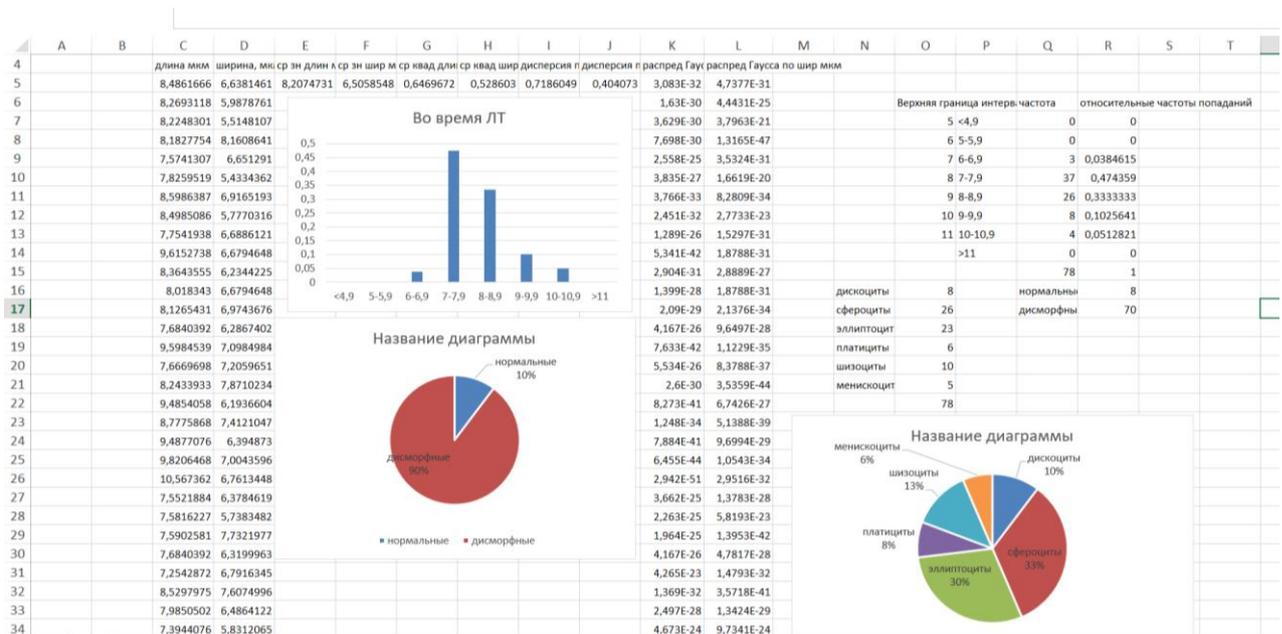


Рисунок 3.70. Пример Excel-листа из базы данных эритроцитов.

Кроме того, данная база данных может применена для образовательного процесса, в качестве учебного материала для студентов медицинских ВУЗов, факультетов и институтов естественных направлений.

Используя базу данных, возможно осуществить создание новых комплексных диагностических тестов на базе СВФУ имени М.К. Аммосова, которые могут быть внедрены в клиническую практику как дополнительные методы диагностики, создание медицинского атласа морфологии эритроцитов при различных патологиях для медицинских и образовательных учреждений (в печатном и электронном видах).

Кроме того, на основе базы данных впервые [220] методом машинного обучения с применением языка программирования Python с использованием библиотек OpenCV, pytesseract, numpy, matplotlib и Skimage, pandas получена программа, позволяющая обрабатывать СЭМ изображения эритроцитов с увеличением 500 и 1000 раз, распознавать элементарные формы эритроцитов в изображениях СЭМ, сегментировать исследуемые объекты, вычислять их количество, диаметры, площади. В ходе исследования были определены диапазоны значений расхождения морфологических параметров эритроцитов пациентов с РШМ от параметров контрольной группы.

### Выводы к Главе 3

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 термополевым 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.

## ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАДИАЦИИ

В четвертой главе рассмотрены влияние ионизирующего излучения на живые организмы: на эритроциты крови пациентов с РШМ до, во время и после ЛТ, на эритроциты крови теплокровных при фракционном облучении в модельных условиях.

В данной серии экспериментов дистанционная гамма-терапия, внутрисполостная гамма-терапия пациентов проводились в отделении Якутского Республиканского онкологического диспансера на аппаратах «MultiSource HDR» (ФРГ, контактная гамма-терапия от источника Кобальт-60; 5Гр x5) и Elekta Synergy, (Великобритания, для облучения опухоли; 2Гр x (5 и 15)). Терапия проводилась различными методами (IMRT, IGRT, VMAT), чтобы обеспечить точное подведение к опухоли высоких доз, к области здоровых тканей – низких доз облучения. Кроме того, были исследованы образцы крови пациентов с РШМ до и после проведения ЛТ методами ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа с применением светового инвертированного микроскопа.

В данной главе представлены результаты комплексного исследования поражающего воздействия ионизирующего излучения (ИИ) на функциональные состояния эритроцитов обезьяны (макака-резус, самцы) (содержание гемоглобина в крови и гематокрит; изменения объема эритроцита; содержание конформация гемопорфирина гемоглобина) до и после воздействия ИИ. В ходе эксперимента животных облучали либо 1/10 суммарной дозы (50 сЗв) в течение 10 дней с перерывом в два дня (группа 1), либо 1/2 суммарной дозы (50 сЗв) в течение двух дней (группа 2). Установлено, что при действии ИИ наблюдается снижение величины гематокрита для группы 1 на 36 день, а группы 2 – на 64 день. Как правило, после первого и повторного облучения наблюдается снижение содержания гемоглобина, что может свидетельствовать о снижении способности переносить кислород. С помощью КР спектроскопии исследованы изменения при действии ИИ молекул гемоглобина в эритроцитах и каротиноидов в плазме крови.

В связи с задачами диссертационной работы, в четвертой главе рассматривается проблема идентификации химического состава НРС на поверхности эритроцитов – определения их физико-химической природы с помощью дополнительных методов ИК и КР спектроскопии, ПЦР исследования, иммунофлуоресцентного анализа.

Для определения химического состава НРС, локализованных на поверхности мембраны клеток, исследовали наличие циркулирующей ДНК как в плазме крови

пациенток с РШМ, так и во фракции эритроцитов. В качестве индикатора циркулирующей ДНК ВПЧ 16 и 18 типов, которые являются маркерами РШМ, исследовали у пациенток с диагнозом РШМ одновременное наличие генов, соответствующих участку белка L1 ВПЧ. Предполагали, что обнаруженные методом СЭМ на поверхности эритроцитов НРС имели сходные с ВПЧ 16 и 18 типов размеры, то и ДНК в них должны соответствовать  $\beta$ -глобина ДНК генома человека. В данной серии экспериментов исследовали впервые обнаружили ДНК во фракции эритроцитов. В результате эксперимента у пациенток с РШМ, были выявлены гены, соответствующие участку белка L1 ВПЧ и участку  $\beta$ -глобина ДНК генома человека. Учитывая то, что продукты амплификации изучаемых генов исходной ДНК присутствовали в эритроцитарной взвеси, вероятно, циркулирующая ДНК (маркер РШМ), локализована на поверхности эритроцита.

В данной главе также представлены результаты исследования состава НРС, локализованных на поверхности эритроцитов пациентов с РШМ, с помощью иммунофлуоресцентного анализа.

#### **4.1. Исследование влияния ионизирующего излучения на морфологию эритроцитов крови методом сканирующей электронной микроскопии**

Ежегодно примерно у 500 000 женщин диагностируется рак шейки матки [221]. Это второй по распространенности вид рака среди женщин [222], он очень смертоносен и вызывает около 260 000 смертей во всем мире [222] и является основной причиной смертности от рака среди женского населения развивающихся стран [223].

Несмотря на наличие неопровержимых доказательств того, что персистирующая инфекция вируса папилломы человека (ВПЧ) является основной причиной развития карциномы шейки матки, вероятно, и другие факторы также способствуют возникновению и прогрессированию рака. Несколько исследований показали повышенные уровни внеклеточных везикул (ВВ) в жидкостях организма онкологических больных [224], в том числе, в частности, больных раком шейки матки [225]. ВВ можно представляют собой мембранные частицы, высвобождаемые во внеклеточное пространство клеткой любого типа [226]. ВВ обычно имеют диаметр от 30 до 2000 нм [227] и в соответствии с их биогенезом могут быть классифицированы как экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца [227]. В то время как микровезикулы и апоптотические тельца возникают в результате прямого отрыва мембраны нормальной

или апоптотической клетки соответственно, экзосомы генерируются эндолизосомным путем [227]. Существующие исследования признают, что повышенное содержание экзосом в крови больных раком [228,229] может выполнять важную роль в так называемом «эффекте поля» рака, при котором раковые клетки вызывают злокачественные изменения в окружающих здоровых клетках [230]. Фактически, существует большое количество исследований, посвященных роли, которую экзосомы выполняют в межклеточной коммуникации, перенося молекулярные сообщения, часто в форме микроРНК, от родительской клетки к клетке-мишени [225,231,232].

Лучевая терапия, которая является распространенным методом лечения РШМ, может усугубить «полевой эффект» рака, поскольку ИИ оказывает косвенное воздействие на клетки, которые сами не были облучены [233]. Этим можно, по крайней мере частично, объяснить стимулирующим действием радиации на секрецию экзосом и их последующее поглощение окружающими клетками [233-236].

Хотя существует множество исследований, посвященных экзосомам опухолевого происхождения в кровотоке онкологических больных [228,230], похоже, что раковые клетки могут быть не единственными виновниками повышенного уровня ВВ у больных раком. Фактически, исследование Кима и соавт. (2003) [223] доказали, что количество микровезикул (МВ) мембран тромбоцитов в крови больных раком желудка было более чем в три раза выше, чем у здоровых людей, при этом количество МВ тромбоцитов  $>2,70 \times 10^9/\text{мл}$  коррелирует с наличием отдаленных метастазов и неблагоприятный прогноз. Эти данные свидетельствуют на необходимость более комплексного понимания роли различных параметров крови, включая содержание ВВ, как биомаркеров прогрессирования рака. Более того, в настоящее время в центре внимания научных исследований находятся свободно циркулирующие ВВ или их поглощение окружающими клетками. Доказано, что примерно 2/3 общего количества ВВ в крови у больных раком молочной железы находится в связанных с клетками крови клетках [237]. Поэтому тщательное исследование связанных с клетками крови ВВ как потенциальных биомаркеров рака полностью оправдано.

В настоящем исследовании [163] мы используем СЭМ и АСМ для изучения изменений в морфологии эритроцитов и исследования наноразмерных объектов, обнаруженных на их поверхности у больных с диагнозом РШМ, проходящих лучевую терапию. Хотя определение точного биогенеза этих объектов выходит за рамки

настоящего исследования, мы предполагаем, что они могут быть связанными с клетками ВВ различного происхождения.

Были получены мазки венозной крови, содержащие КЗ-ЭДТА, от 12 больных РШМ и от 3 больных контрольной группы в возрасте от 45 до 55 лет. У 4 пациентов из 12 анализы сдавались на каждом этапе полного курса лечения, а у остальных 8 пациентов сразу после первого этапа. Тонкий ровный слой крови наносился на чистое обезжиренное предметное стекло и высушивался.

СЭМ и АСМ использовались для исследования морфологии и поверхности эритроцитов у больных РШМ в начале, в середине и в конце дистанционной лучевой терапии, а затем в середине и в конце брахитерапии.

В Якутском республиканском онкологическом диспансере больным проводилось лучевое лечение, состоящее из двух этапов: сначала дистанционная лучевая терапия с использованием ускорителя Elekta Synergy (Великобритания, дистанционная лучевая терапия, 6-18 МэВ), а затем брахитерапия с использованием аппарата MultiSource HDR (Германия, брахитерапия источником Кобальт-60). На первом этапе обработка проводилась на линейном ускорителе в режиме работы с фотонами с энергией 6 МэВ. Терапия проводилась следующим образом: трижды по 5 дней ежедневно с перерывом в два дня, т.е. на первом этапе проводилось всего 15 фракций по 2 Гр. Далее, без перерыва между первым и вторым этапом, проводилась контактная лучевая терапия в дозе 5 Гр с чередованием дистанционной лучевой терапии в дозе 2 Гр по 5 фракций каждого вида лучевой терапии. Образцы крови собирали в начале, середине и конце дистанционной терапии, затем в середине и в конце контактной лучевой терапии. В ходе терапии применялось несколько методов (3D CRT, IMRT, VMAT), чтобы обеспечить доставку высоких доз в опухоль и низких доз в здоровые ткани.

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.

В ходе настоящего исследования были получены гистограммы распределения линейных размеров эритроцитов и НРС и обнаружены эритроциты аномальной формы

(рисунок 4.1 а, б). Диаметр эритроцитов составил  $8,38 \pm 0,36$  мкм в контрольной группе и  $9,41 \pm 0,47$  мкм у РШМ (по данным АСМ исследования). Во время проведения ЛТ у некоторых пациентов наблюдалось резкое увеличение НРС (рисунок 4.1 в, г).

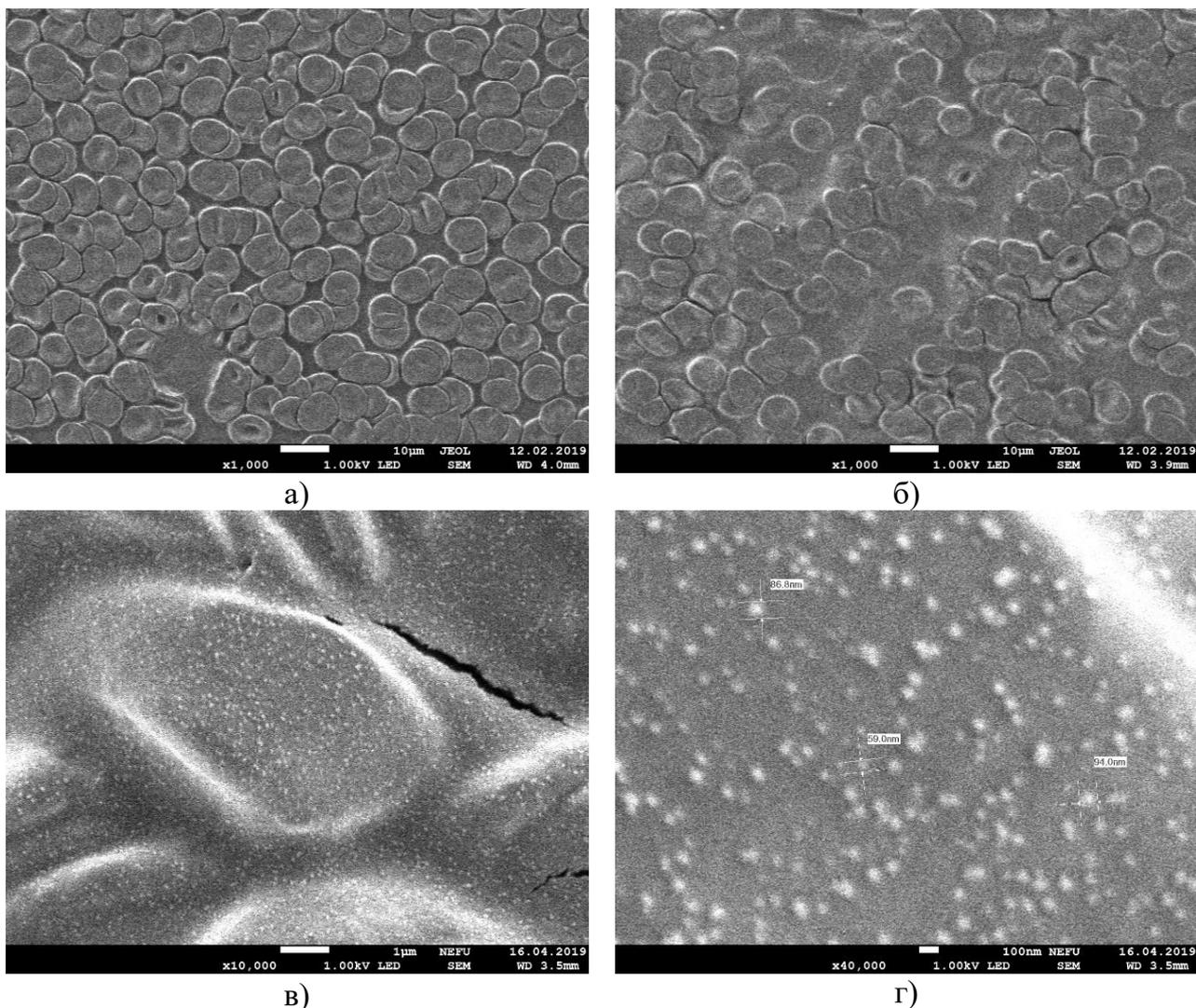


Рисунок 4.1. СЭМ изображение эритроцитов больных раком шейки матки а) до лучевой терапии; б) после лучевой терапии; x1000; в) во время лучевой терапии x10000 и г) во время лучевой терапии x40000.

Было обнаружено, что ИИ влияет на размер и морфологию эритроцитов (рисунок 4.2). Размеры эритроцитов увеличивались в среднем в ходе ЛТ. Например, общее количество дисморфных эритроцитов увеличилось с 19% до 23% в ходе ЛТ с увеличением примерно на 1% на каждом этапе терапии. Соотношение дисморфных эритроцитов также варьировало в зависимости от этапа ЛТ. Количество разорвавшихся эритроцитов увеличилось с 11% до 24%, а количество дискоцитов снизилось с 77% до 71%. Также были обнаружены дрепаноцитоподобные клетки (7% в середине и 5% в конце ЛТ) и эхиноциты (12% в начале ЛТ). На рисунке 4.3 представлен график распределения

линейных размеров эритроцитов до, во время и после ЛТ на основе данных, полученных методом СЭМ.

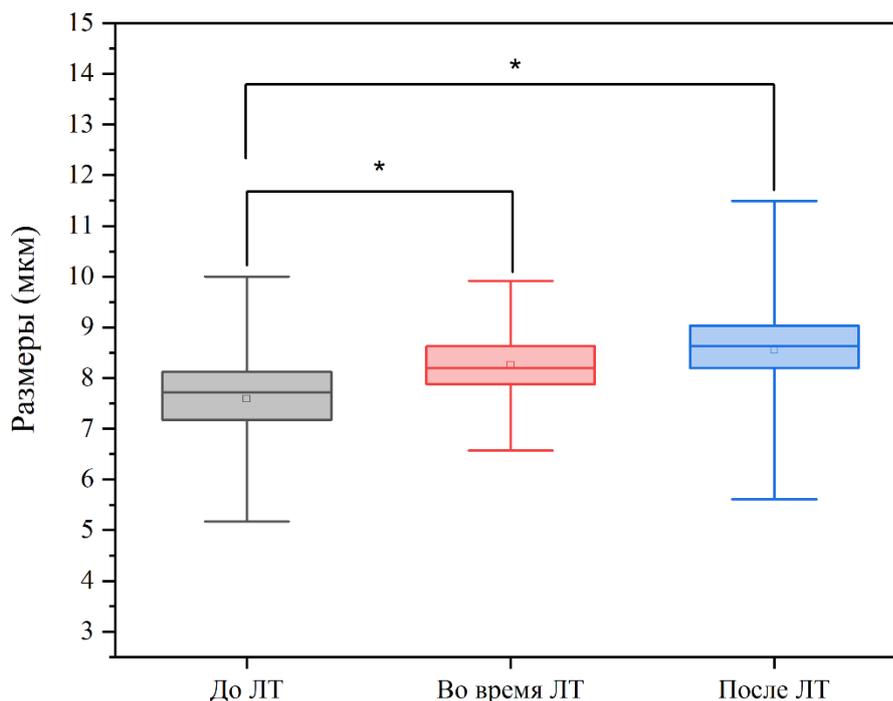


Рисунок 4.2. Средние линейные размеры эритроцитов до, во время и после ЛТ (по данным, полученными с помощью сканирующего электронного микроскопа).

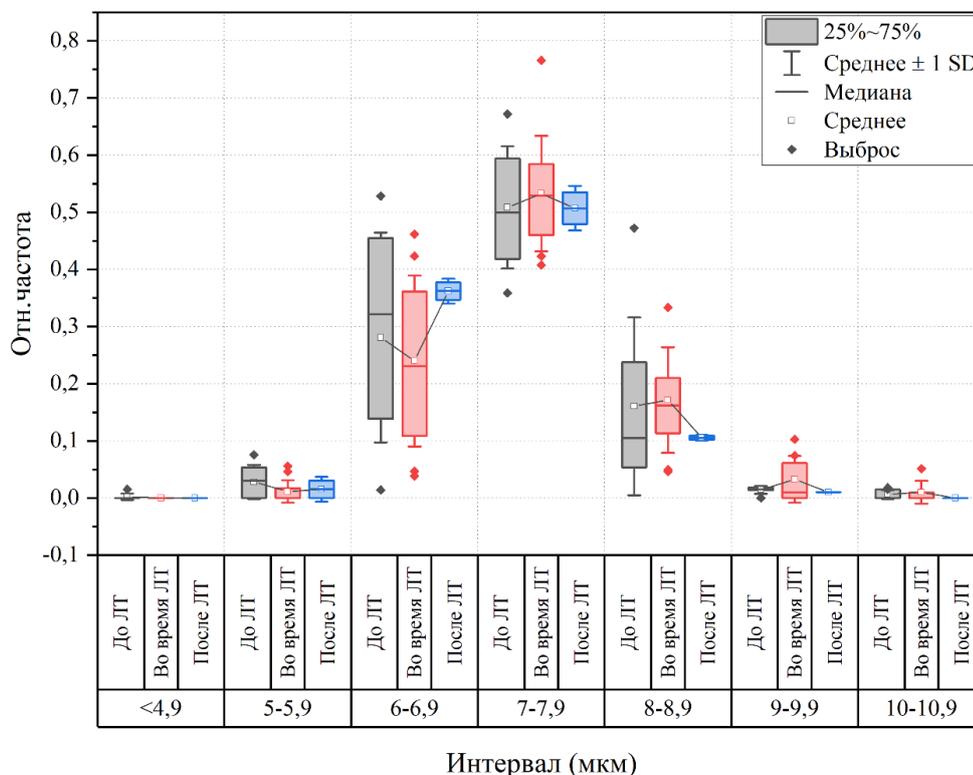


Рисунок 4.3. График распределения линейных размеров эритроцитов до, во время и после ЛТ (серый цвет – до ЛТ, красный цвет – во время ЛТ, синий цвет – после ЛТ).

На рисунке 4.4. представлен график распределения линейных размеров НРС у пациентов во время проведения ЛТ, полученный на основе СЭМ данных.

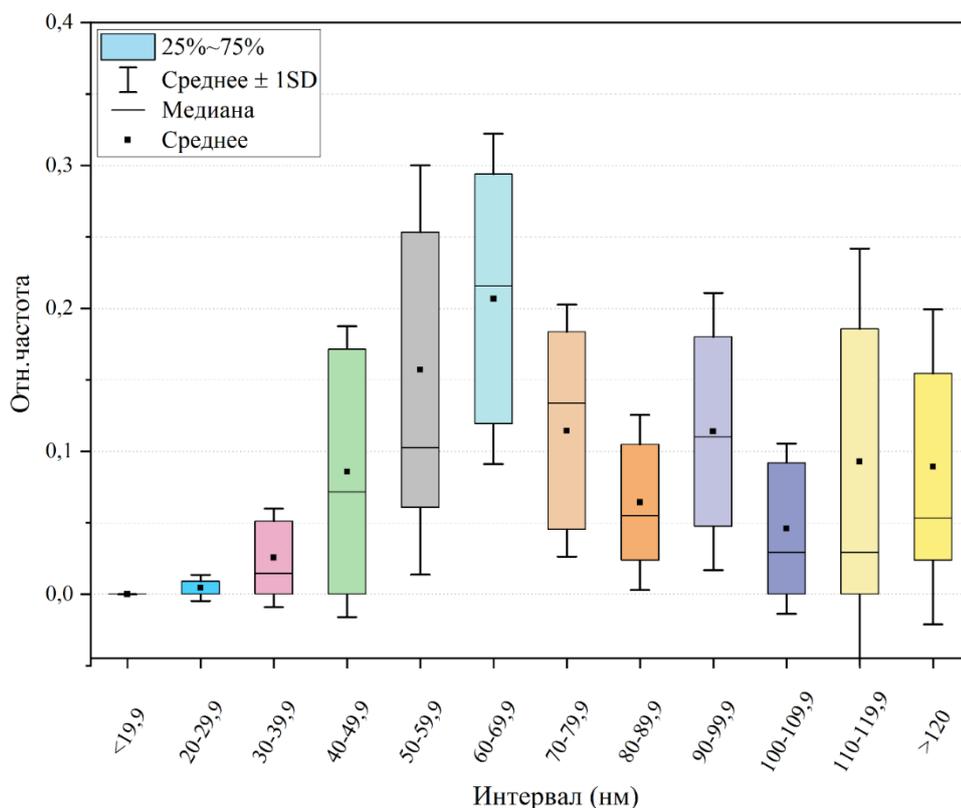


Рисунок 4.4. График распределения линейных размеров наноразмерных структур на поверхности эритроцитов крови пациентов с раком шейки матки.

В настоящем исследовании методом СЭМ было установлено, что количество НРС в крови больных РШМ увеличивается и также меняется средний размер НРС (рисунок 4.5).

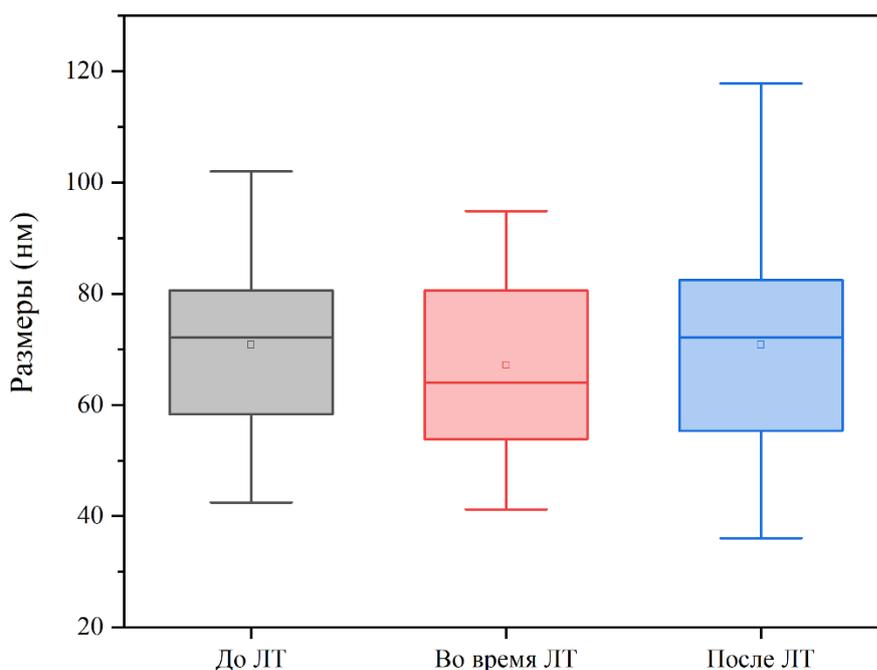


Рисунок 4.5. Средние линейные размеры НРС до, во время и после ЛТ (по данным, полученными с помощью сканирующего электронного микроскопа).

Средний диаметр обнаруженных объектов составил  $69,91 \pm 12,15$  нм, а средняя высота —  $23,75 \pm 3,70$  нм (по данным АСМ исследования). Например, на рисунке показаны данные НРС для одного пациента с РШМ в начале лечения (рисунок 4.6 а и б). Количество НРС увеличивалось с каждым этапом лучевой терапии со 136 в начале до 192 в середине второго этапа лечения. После окончания ЛТ количество НРС уменьшилось (рисунок 4.6 в).

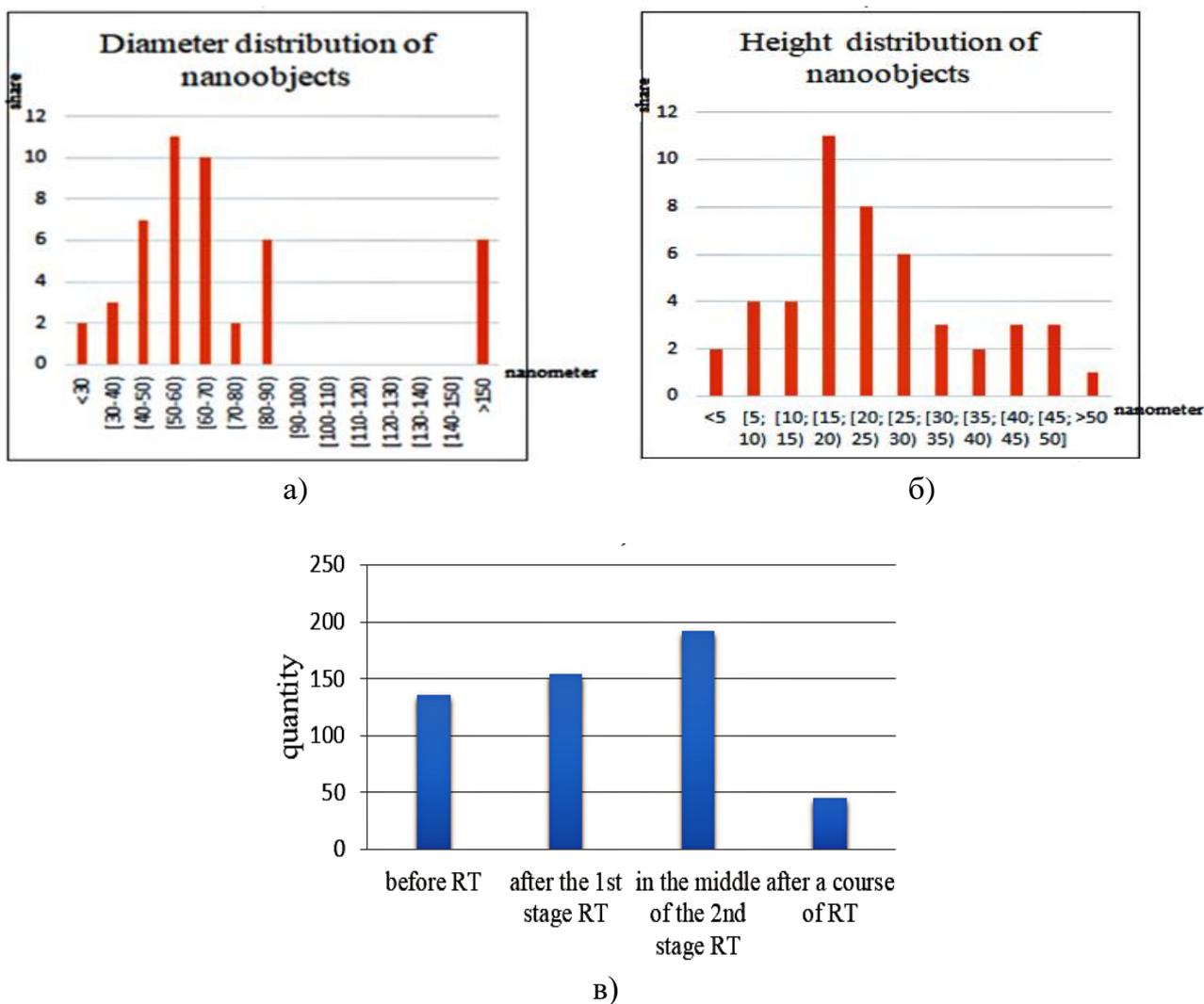


Рисунок 4.6. а) распределение диаметра б) и высоты НРС на поверхности эритроцитов пациента; в) изменение количества НРС на поверхности эритроцитов во время лучевой терапии.

СЭМ изображения до и после ЛТ выявили агглютинацию эритроцитов (рисунок 4.1 б) или «слипание» во всех образцах. На рисунке показаны линейные размеры НРС на поверхности эритроцитов (рисунок 4.6 б,в). На поверхности эритроцитов на АСМ изображениях наблюдались характерные выпуклости — НРС (рисунок 4.7).

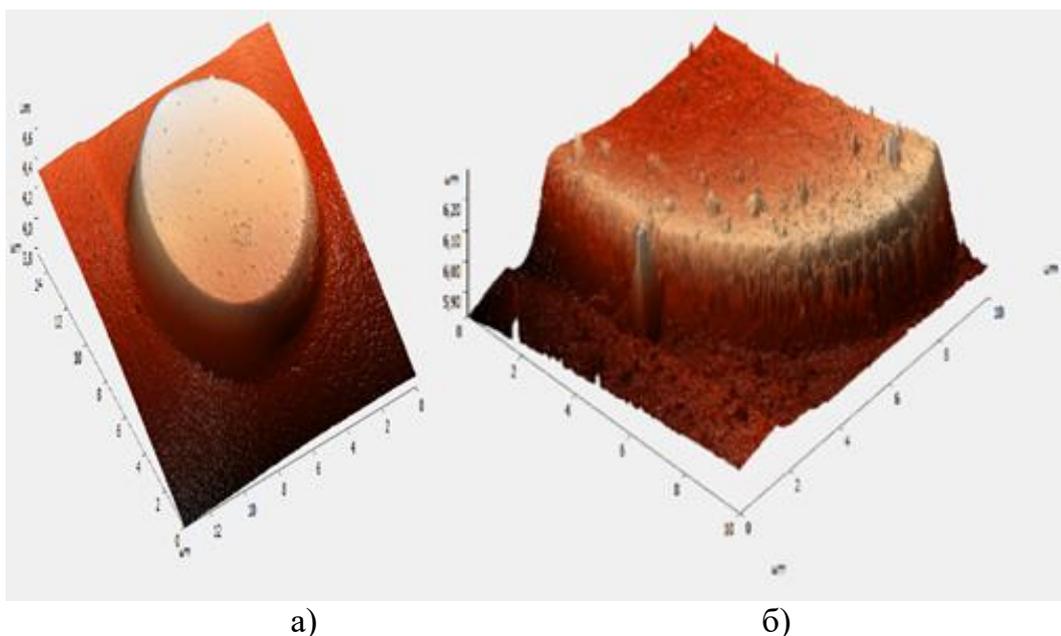


Рисунок 4.7. АСМ изображение эритроцита образца крови из контрольной группы (а) и эритроцита образца крови пациента с диагнозом РШМ (б).

Результаты, полученные с помощью СЭМ и АСМ свидетельствуют, что у пациентов с РШМ наблюдаются изменения в морфологии эритроцитов, а также в количестве и размере НРС, обнаруженных на их поверхности на разных стадиях лучевой терапии. Было обнаружено, что ионизирующее излучение влияет на размер и морфологию эритроцитов. Среднее значение диаметра эритроцитов больных РШМ выше, чем в контрольной группе. Общее количество дисморфных эритроцитов увеличивалось на каждом этапе терапии. Соотношение дисморфных эритроцитов также варьировало в зависимости от этапа ЛТ. Также повышенный уровень НРС был обнаружен в крови больных РШМ, причем количество НРС увеличивалось с каждым этапом лучевой терапии. После окончания ЛТ количество нанообъектов сократилось. СЭМ изображения до и после ЛТ выявили агглютинацию эритроцитов. Наблюдаемые изменения могут послужить основой для разработки показателей эффективности лучевой терапии рака.

Настоящее исследование показало, что ЛТ приводит к морфологическим нарушениям и агглютинации эритроцитов («монетные столбики»). Это согласуется с предыдущими данными о том, что ионизирующее излучение увеличивает относительное количество эхиноцитов, сфероцитов и других типов дисморфных эритроцитов дозозависимым образом [164]. Предположительно, что такие изменения в морфологии эритроцитов могут быть вызваны модификациями структуры белков, изменениями деформируемости и проницаемости мембран, а также разрывом мембраны, вызванным

радиацией [164]. При исследовании крови крыс после лечения гамма-облучением наблюдалось увеличение размера и ширины распределения эритроцитов, что может указывать на возможные радиационно-индуцированные морфологические изменения [238].

Наше исследование также позволило обнаружить большое количество НРС в крови больных РШМ. Значения линейных размеров НРС ( $69,91 \pm 12,15$  нм), находящихся на поверхности эритроцитов, попадают в типичный диапазон для экзосом от 30 до 100 нм [195]. Здесь мы предполагаем, что эти НРС могут быть ВВ различного биогенеза, поскольку многочисленные исследования показали, что наличие большого количества ВВ типичны для онкологических заболеваний [223, 228], и значительная часть из них существует в связанных с клетками крови состоянии [236]. Известно, что некоторые вирусы запускают формирование везикул на поверхности клеток во время инфекции [239]. Вероятно, что корреляция между выявленным с помощью СЭМ количества вирусов и везикулами на поверхности клетки может быть основой для формирования новой диагностики терапий и скрининга вакцин. Проллиферативные раковые клетки демонстрируют увеличение раковой ткани в результате ангиогенеза, приобретение миграционной и инвазивной способности и приобретение способности избегать атак иммунных клеток и, в конечном итоге, образование метастатических поражений. Известно, что экзосомы участвуют в каждом из этих процессов [9]. В крови экзосомы могут появиться из различных клеток, опухоли являются максимальными продуцентами экзосом ( $10^9$  везикул/мЛитр в крови), что коррелирует с их ролью в канцерогенезе. Отношение между циркулирующими экзосомами и опухолью могут быть описаны как “семена и растения”. Экзосомы полученные из клетки опухоли, несущие различный генетический материал выбрасываются в кровеносное русло. Некоторые экзосомы распространяются на отдаленные органы и трансформируют клетки органа в опухолевые путем передачи биоактивной составляющей клетке реципиенту.

Кроме увеличения количества циркулирующих экзосом в крови раковых пациентов, выявлены их отличие в размерах и морфологии. Например, было показано, что размеры экзосом в сыворотке полученной от пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы были существенно меньше чем те, что у здоровых доноров. Также, путем использования АСМ было выявлено морфологическое и молекулярное отличие экзосом здоровых людей и пациентов с раком полости рта [240].

Одним из возможных источников этих ВВ могут быть клетки РШМ, которые, как известно, секретируют большое количество экзосом [224]. Эти экзосомы содержат аномально высокие уровни микроРНК-21 и микроРНК-146а, связанные с онкогенезом рака шейки матки, по сравнению с клетками, свободными от рака [224]. Похоже, что ВПЧ, которые являются основной причиной РШМ, влияют на состав микроРНК экзосом рака. В исследовании [231] подтвердили, что подавление вирусных онкогенов Е6/Е7 примерно вдвое увеличивает относительный процент микроРНК внутри экзосом по сравнению с другими малыми фракциями РНК. Интересно, однако, что другое исследование не обнаружило содержание РНК, соответствующих ВПЧ, в клетках карциномы шейки матки, инфицированных ВПЧ [241]. Эти данные указывают на тот факт, что, хотя связь между ВПЧ и содержимым экзосом клеток РШМ нельзя отрицать, необходимы дальнейшие исследования для определения точных механизмов формирования содержания экзосом раковых клеток, инфицированных ВПЧ.

Следует отметить, что не только экзосомы, полученные из клеток HeLa, содержат ДНК вируса ВПЧ, но и нераковые ВПЧ-положительные образцы шейки матки с плоскоклеточным интраэпителиальным поражением низкой степени злокачественности и без него содержат ДНК ВПЧ (включая онкогены Е6 и Е7) [242]. Эти результаты указывают на еще один потенциальный источник ВВ, связанных с эритроцитами, у больных РШМ: свободные от рака клетки, инфицированные ВПЧ. Хотя вполне вероятно, что связанные с эритроцитами ВВ у больных онкологией шейки матки могут быть отнесены к раковым клеткам или клеткам, инфицированным ВПЧ, нельзя исключать возможность того, что они имеют эритроцитарное происхождение, особенно с учетом того, что средний диаметр обнаруженных ВВ ( $69,91 \pm 12,15$  нм) близко соответствует экзосомам эритроцитов, о которых сообщили в работе [243] и размер которых составляет 64,08 нм. Эритроциты выделяют везикулы во внеклеточное пространство в течение своей нормальной жизни, повышая уровень везикул при патологии [244]. Их роль в патологических состояниях, включая РШМ, недостаточно изучена, однако было показано, что они модулируют иммунный ответ, повышая пролиферацию Т-клеток зависимым от антиген-представляющих клеток образом [245]. Фактически, в зависимости от дня хранения количество Т-клеток увеличивалось более чем на 50% по сравнению с стимуляцией только фитогемагглютинином (ФГА) [245]. Кроме того, ВВ, происходящие из эритроцитов, могут быть вовлечены в процессы воспаления, как показало

исследование [245] они вызывали значительную активацию 14 провоспалительных цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови.

В настоящем исследовании в ходе ЛТ наблюдалось увеличение размера наноразмерных объектов, связанных с эритроцитами, однако сообщения о влиянии облучения на размер ВВ представляют противоречивые данные. Недавнее исследование показало, что ЛТ оказала значительное влияние на размер экзосом, увеличив его примерно на 37% при дозе 10 Гр [246]. Однако другая исследовательская группа сообщила об отсутствии изменений в размере экзосом после облучения [234,247] или о незначительном увеличении примерно на 5% [232]. Было высказано предположение, что изменения размера экзосом могут быть вызваны воздействием ИИ на этапе формирования содержания мультивезикулярных тел [246], однако доказательства в поддержку этой гипотезы остаются ограниченными.

Увеличение количества НРС, обнаруженное у пациентов во время ЛТ, согласуется с данными о том, что облученные клетки имеют тенденцию увеличивать секрецию ВВ [232-235]. Усиленное высвобождение экзосом после облучения может быть результатом активации определенных генов. Одно исследование обнаружило значительно повышенные уровни транскриптов Rab 11, Rab 27a, Rab27b, TSAP6, CD63 и Alix в облученных клетках по сравнению с контролем [246]. Считается, что эти гены ответственны за секрецию экзосом, и влияние радиации на их численность зависело от дозы, достигая своего пика при 10 Гр [234]. В то время как в исследовании [246] изучались экзосомы рака молочной железы, повышенная секреция ВВ после облучения также наблюдалась в нормальных астроцитах [233], что указывает на то, что аналогичные генетические изменения могут иметь место в здоровых клетках. Эти результаты согласуются с нашей гипотезой о том, что ВВ, связанные с эритроцитами, могут возникать не только из клеток РШМ, но также из незлокачественных клеток, инфицированных ВПЧ, или эритроцитов.

Определение состава НРС может быть применено в разработке новых подходов в методах определения эффективности ЛТ РШМ, включающих элементный анализ НРС с использованием, СЭМ и формирование прообраза экспериментов по определению состава НРС [248]. Эффективность ЛТ связано с явлением рецидивов раковых заболеваний.

Очевидно, что полученные результаты могут служить основой для разработки эффективной диагностики лучевой терапии рака. С другой стороны, идентификация НРС и процесс формирования НРС на поверхности эритроцитов, количество которых меняется во время ЛТ, требует дальнейших исследований. Данный подход позволит контролировать эффективность ЛТ, а объяснить причины возникновения рецидивов и дальнейшего развития заболевания.

Некоторые исследования [227, 228] привели к заключению, что наличие экзосом в крови больных раком стимулирует изменения в окружающих здоровых клетках [229], что свидетельствует о роли экзосом в передаче молекулярных сообщений из родительской клетки в клетку-мишень [224,230,231]. Предполагается, что ЛТ усугубляет данный процесс в здоровых клетках путем повышения уровня внеклеточных везикул, что в свою очередь, возможно, опосредовано их стимулирующим эффектом.

Исходя из результатов исследований [9, 239, 240, 249-259], в которых рассматривается взаимосвязь вирусов, ассоциированных с определенными раковыми заболеваниями, и экзосом, можно сделать предположение, что наблюдаемый рост количества везикул в данном исследовании во время ЛТ у некоторых пациенток, может быть спровоцировано воздействием радиации на опухолевые клетки. Действительно, в работе [242] установлено, что не только экзосомы, полученные из клеток HeLa, содержали вирусную ДНК ВПЧ, но и незлокачественные ВПЧ-положительные образцы шейки матки с плоскоклеточным внутриэпителиальным поражением и без него имели ДНК ВПЧ (включая онкогены E6 и E7). Эти данные указывают на еще один потенциальный источник внеклеточных везикул, связанных с эритроцитами, у пациентов с раком шейки матки: неинфекционные ВПЧ-клетки.

В соответствии с данными литературы и результатами наших исследований [248] увеличение НЧ поверхности эритроцитов и, возможно, вследствие патологии эритроцитов под воздействием вирусов. Секреция экзосом из эритроцитов, в свою очередь, также может быть усилена под воздействием радиации.

Эти исследования указывают на необходимость более детального исследования различных параметров крови, включая количество внеклеточных везикул (ВВ), как биомаркеров прогрессирования рака.

Какова природа этих НРС? Являются ли данные НРС вирусами, везикулами или мы наблюдаем и тех, и других? И если мы наблюдаем и вирусы, и везикулы, то как их различать?

Мазки венозной крови, содержащей КЗ-EDTA, от 16 пациентов с РШМ в возрасте от 45 до 55 лет. У 4 пациентов из 16 анализы были взяты в начале и на каждом этапе полного курса лечения, а у остальных 12 пациентов – в начале и сразу после первого этапа ЛТ.

Для проведения элементного анализа НРС на поверхности эритроцитов и на плазме использовали дополнительный модуль СЭМ — систему энергодисперсионного микроанализа Oxford INCA Energy 350. Принцип действия микроанализатора основан на методе рентгеновского микроанализа, сущность которого заключается в возбуждении атомов анализируемого вещества электронным пучком (зондом) высокой энергии с одновременной регистрацией характеристического рентгеновского излучения атомов, входящих в состав этого вещества.

Микроанализатор работает по энергодисперсионному принципу, в соответствии с которым происходит одновременная регистрация всех участков рентгеновского спектра. Для осуществления указанного принципа микроанализатор снабжен сверхтонким входным окном SATW для регистрации легких элементов, начиная с углерода. Микроанализатор конструктивно включает в себя основной блок с детектором X-тах 80 на базе энергодисперсионного спектрометра и блок управления. В качестве детектора характеристического рентгеновского излучения микроанализатора используется кремниевый дрейфовый детектор. Управление работой микроанализатора и обработка данных измерений осуществляется с помощью компьютера типа IBM PC и специализированной аналитической системой программного обеспечения Aztec, при этом вывод информации о массовых долях анализируемых элементов осуществляется на монитор микроанализатора.

Для определения элементного состава «везикул» и НРС, а также поверхности эритроцита без НРС использовали систему энергодисперсионного микроанализа Oxford INCA Energy 350. Электронный зонд наводили на интересующий объект с помощью СЭМ изображения, полученные при увеличении в 40 000 раз и при значении рабочего расстояния (WR) равному 10 мм. Первичные методы статистической обработки экспериментальных данных были использованы для определения в процентах весового

соотношения химических элементов наноразмерных объектов. Программа выводит на монитор гистограммы весового соотношения элементов исследуемых объектов. На основании этих гистограмм распределение веса элементов определяли, как нормальное распределение Гаусса, которое проверялось с помощью теста Шапиро-Уилка.

Для исследования состава НРС использовали образцы крови одной из пациенток 38 лет с диагнозом РШМ. Для проведения эксперимента по определению элементного состава НРС, которые условно разделили на везикулы и вирусы использовали СЭМ изображения этих объектов при увеличении в 40 000 раз и ускоряющем напряжении равным 1 кВ (рисунок 4.4). НРС (обозначенные как вирусные частицы – НРС-вирусы НРС-В), обнаруженные на поверхности эритроцитов до ЛТ, имеют более четкие контуры и их значительно меньше, чем НРС-В, возникающие во время ЛТ. НРС (обозначенные как НРС-везикулы, НРС-Э), возникающие во время лучевой терапии, равномерно распределены не только на поверхности эритроцитов, но и обнаруживаются в плазме. Количество НРС-В в некоторых образцах уменьшается во время ЛТ, в то время как НРС-Э выявлены именно во время ЛТ и их количество как увеличиваться, так и уменьшаться в ходе ЛТ. Распределение линейных размеров НРС-Э соответствует распределению Гаусса, т.е. имеют нормальное непрерывное распределение по одному диапазону, в то время как НРС-В характеризуются дискретным распределением, т.е. линейные размеры НРС-В различны в нескольких характерных диапазонах, где имеет вид распределения Гаусса. Также количество НРС-В, имеющих разные линейные размеры, существенно отличаются.

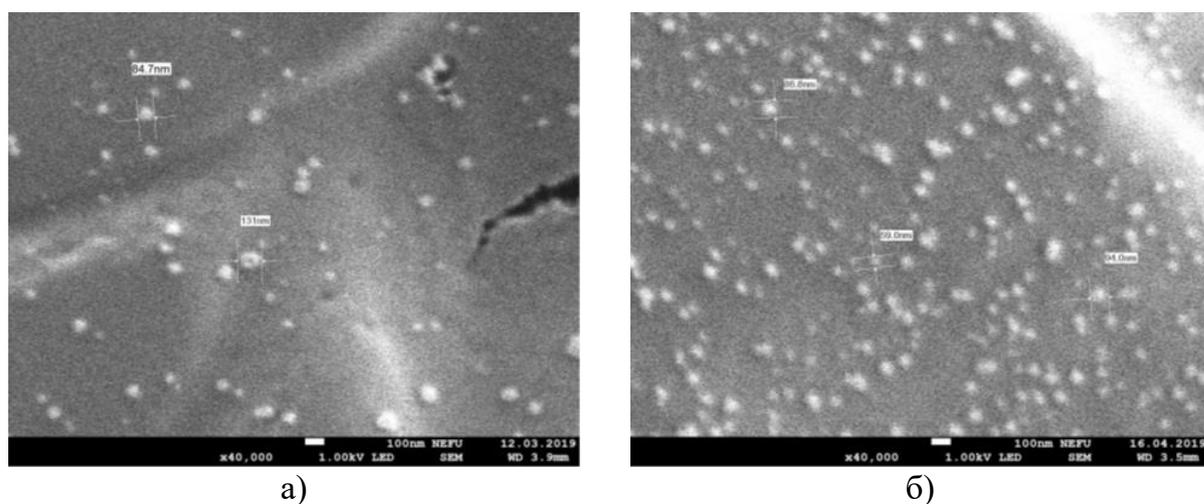


Рисунок 4.8. НРС на поверхности эритроцитов до (А) и во время (Б) лучевой терапии образца крови пациентки с РШМ при увеличении в 40.000 раз и ускоряющем напряжении 1 кВ.

Для определения элементного состава НРС с помощью СЭМ, ускоряющее напряжение было выбрано равным 2 кВ, наведение луча на НРС производили при увеличении в 40.000 раз. В ходе исследования был получен элементный состав 13 НРС одного образца крови пациентки до и после лучевой терапии. Например, на рисунке 4.9 представлены область наведения луча на НРС-Э («везикула») и его элементный состав.

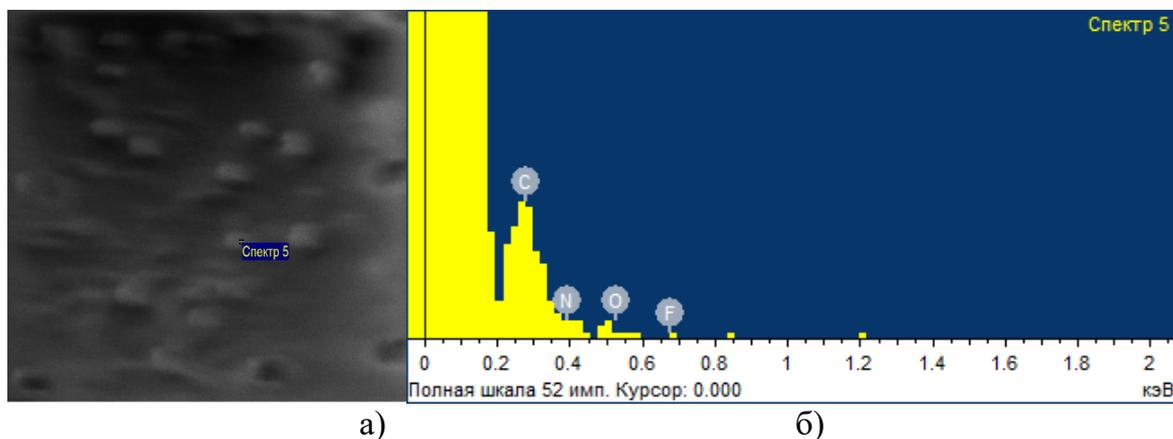


Рисунок 4.9. а) – указан НРС («везикула») для исследования элементного состава; б) – энергетический спектр указанного в а) НРС.

На одном из образцов были получены спектры 13 НРС.

На рисунке 4.10 представлена гистограмма элементного весового состава НРС в процентах в среднем.

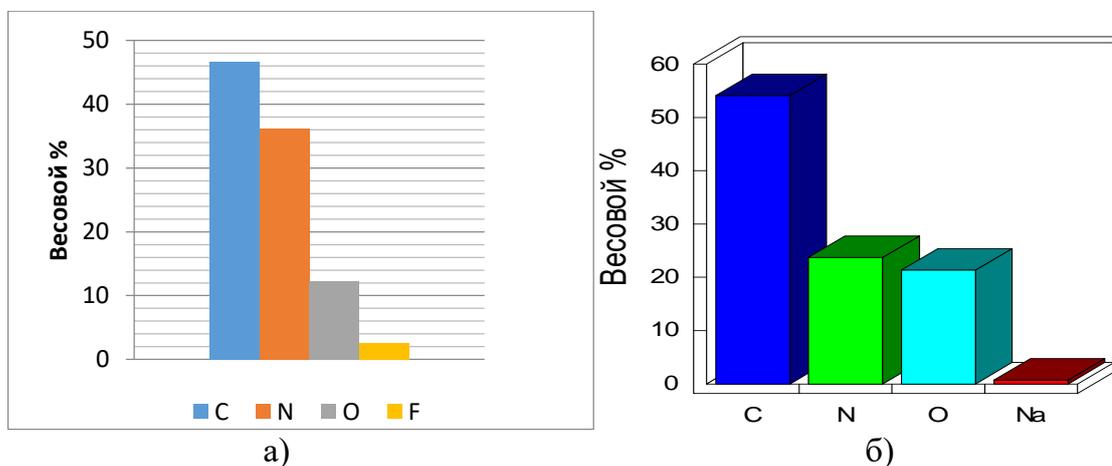


Рисунок 4.10. Гистограмма среднего элементного весового состава НРС в процентах: А) – НРС-Э «везикулы»; Б) – НРС-В «вируса».

Из полученных нами данных следует, что состав НРС примерно одинаковый, что соответствует данным литературы. Известно то, что атомный состав примерно одинаковый и у везикул клеток, и капсидов вирусов, в том числе вирусов папилломы человека 16, 18 типов, т.к. они состоят из белков [248-255].

В соответствии с данными литературы и результатами наших исследований [248] увеличение НРС поверхности эритроцитов и, возможно, вследствие патологии эритроцитов под воздействием вирусов. Секретция экзосом из эритроцитов, в свою очередь, также может быть усилена под воздействием ИИ.

В ходе данного исследования было проведено наблюдение за состоянием данной пациентки, у которой наблюдался наибольший рост количества НРС «везикул» после проведенной ЛТ в течение полутора лет. За данный период были проведены курсы химиотерапии и лекарственной терапии, однако в течение этого периода у данной пациентки наблюдалось по сравнению с другими пациентками рецидив и более агрессивное дальнейшее развитие заболевания с сопутствующими осложнениями.

Результаты данного исследования с применением СЭМ свидетельствуют о том, что наблюдаемое до воздействия ионизирующего излучения формирование НРС может быть вызвано различными процессами, а именно воздействием и локализацией вирусов и образованием в следствие этого везикул на поверхности клетки. Анализ этих двух возможностей свидетельствует о разном вкладе при формировании «везикул» и «вирусов». Увеличение числа «везикул» на поверхности эритроцитов и в плазме во время ЛТ свидетельствует о активации процесса формирования экзосом как самими раковыми клетками, так и эритроцитами под воздействием ионизирующего излучения. Кроме того, также предполагается, что выявленные на поверхности вирусы могут более интенсивно стимулировать процесс образования везикул на поверхности эритроцитов во время ЛТ.

Дальнейшее наблюдение пациентов с РШМ после ЛТ показывает, что увеличение количества везикул в крови может быть ассоциирована с негативным прогнозом, связанным с рецидивом заболевания, т.е. о низкой эффективности проведенной лучевой терапии. Кроме того, незначительное уменьшение количества НРС, схожих с вирусами, во время ЛТ также может говорить о незначительном воздействии ЛТ на них.

Очевидно, что дальнейшее исследование крови пациентов во время ЛТ позволит выявить количественное соотношение этих НРС до и после каждого этапа ЛТ для определения критерия (критического соотношения) эффективности терапии. Таким образом, комплексная методика исследования крови пациентов с РШМ, рассмотренная в данной работе, может стать как основой для разработки методологии диагностики и эффективности ЛТ, так и исследований роли вирусов, везикул, эритроцитов в процессе развития онкологических заболеваний.

Кроме того, требует дальнейших исследований точное объяснение происхождения НРС разного размера, наблюдаемых на поверхности эритроцитов, количество которых меняется во время лучевой терапии.

Прикрепление большого количества НРС до и во время ЛТ на поверхности эритроцитов может влиять на поверхностный потенциал плазматической мембраны эритроцита, что в свою очередь может привести к изменениям морфологии этих клеток (будет рассмотрено в главе 5), а также к изменениям структуры гемоглобина. Эти изменения могут быть определены при помощи ИК и КР спектроскопии.

#### **4.2. Исследование свойств наноразмерных структур методами инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния**

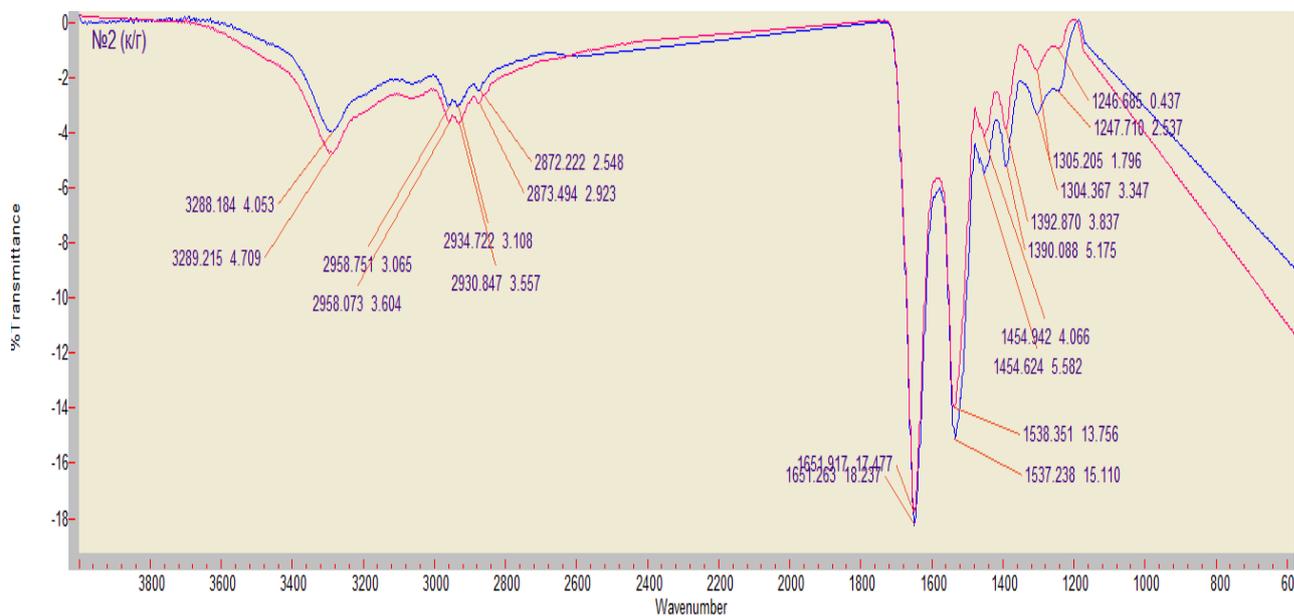
Несмотря на современные, высокотехнологичные методы лечения РШМ, вероятность развития рецидива после комбинированного лечения (операции и радиотерапии) составляет примерно 30%, причем рецидивы могут возникнуть даже при лечении РШМ, выявленных на ранних стадиях. Большинство рецидивов диагностируются в течение 2 лет после завершения терапии. Для рецидивных новообразований характерно более агрессивное течение, в связи с чем, существует необходимость выявления причин распространения заболевания, роста количества рецидивов при позитивных прогнозах после лечения. Также существует необходимость разработки методик наблюдения за пациентами, определяющих эффективность и безопасность ЛТ с использованием новых подходов.

В этом параграфе рассматривается исследование особенностей ИК и КР спектров крови пациентов с РШМ в ходе лучевой терапии. Проводится оценка возможности использования полученных данных для разработки методики эффективности лучевой терапии.

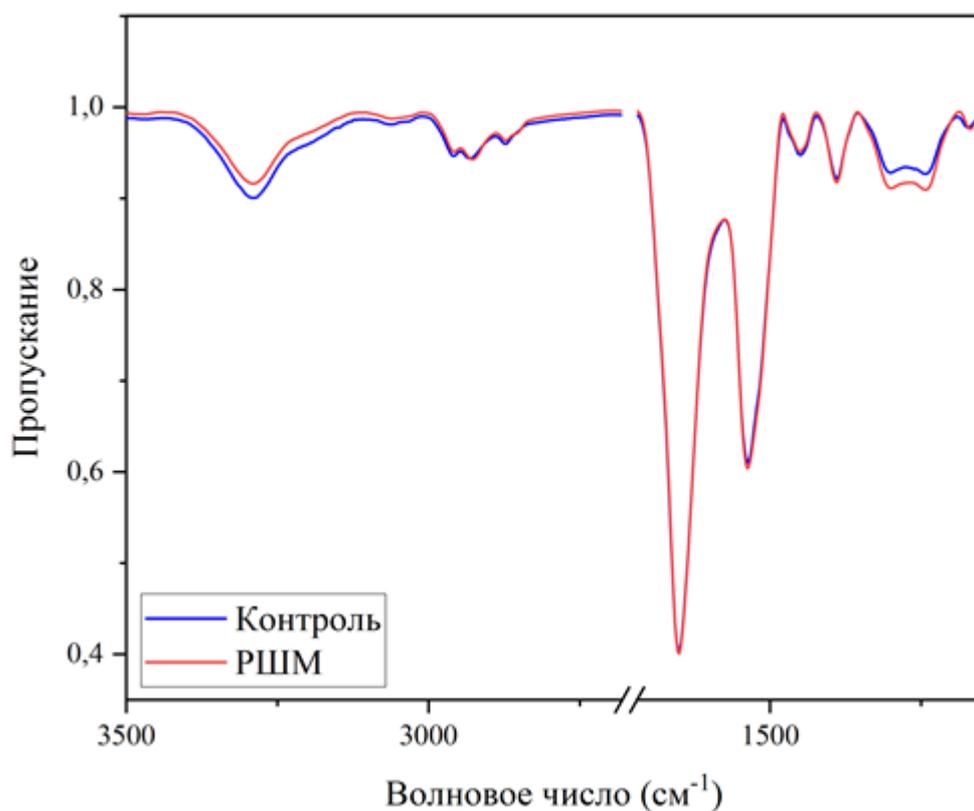
##### *Исследование с помощью ИК спектроскопии образцов крови пациентов с диагнозом РШМ при лучевой терапии*

В данной серии экспериментов с помощью ИК спектроскопии исследовали состояние белков образцов крови пациентов с диагнозом РШМ при лучевой терапии. Объектами исследования были мазки крови 5 женщин с диагнозом РШМ, проходивших лечение в Якутском республиканском онкологическом диспансере и мазки 5 женщин

крови контрольной группы. В работе использовали ИК спектрометр с Фурье преобразователем Varian 7000 в диапазоне от 4000 до 400  $\text{cm}^{-1}$  в режиме пропускания (рисунок 4.11 а и б).



а)



б)

Рисунок 4.11. а) и б) ИК спектры крови пациентов с диагнозом РШМ и контрольной группы: а) в общем виде; б) в урезанном виде.

В ходе проведенного исследования образцов были выявлены характерные полосы ИК спектра белков: полоса 1641–1660 см<sup>-1</sup> (Амида I, обусловленная валентные колебания связи νC=O) пептидной связи белка, полоса 1539–1546 см<sup>-1</sup> (Амида II, обусловленная валентные колебания связи νCN и деформационные колебания связи δNH) пептидной связи белка, а также деформационные колебания метильной группы δCH<sub>3</sub> на 1451 см<sup>-1</sup> и полосы характерные для молекул липидов, белков и углеводов: 1380–1410 см<sup>-1</sup> (рисунок 4.11). В ходе обработки ИК- спектров было проведено усреднение величин интенсивностей пиков ИК, а для статистической обработки результатов использовали метод Манна-Уитни (рисунок 4.12 и таблица 3).

Таблица 3. Амплитуда интенсивности ИК спектров пациентов с диагнозом РШМ и контрольной группы

Положение пика см <sup>-1</sup>	РШМ Ср.знач. пиков интенсивностей %	Контроль Ср.знач. пиков интенсивностей %	p-value*
1245,05	0,91	0,92	0,68
1301,95	0,91	0,93	0,21
1390,67	0,92	0,92	0,40
1451,43	0,95	0,95	0,09
1537,26	0,60	0,61	0,83
2871,99	0,96	0,96	0,40
2928,89	0,94	0,94	0,30
2957,82	0,95	0,95	0,30

\* отличия статистически значимы при p<0.05

Установлено, что при сопоставлении величин амплитуд интенсивности ИК спектров образцов крови пациентов с РШМ и контрольной группы статистически значимых отличий между интенсивностями полос пропускания обеих групп не было обнаружено (таблица 4), что, вероятно, обусловлено отсутствием изменений первичной структуры белка образцов крови, в том числе и глобина гемоглобина эритроцитов крови. В связи с этим, в следующей серии экспериментов, с помощью КР спектроскопии, мы исследовали специфические изменения именно гема гемоглобина крови пациентов до и после ЛТ.

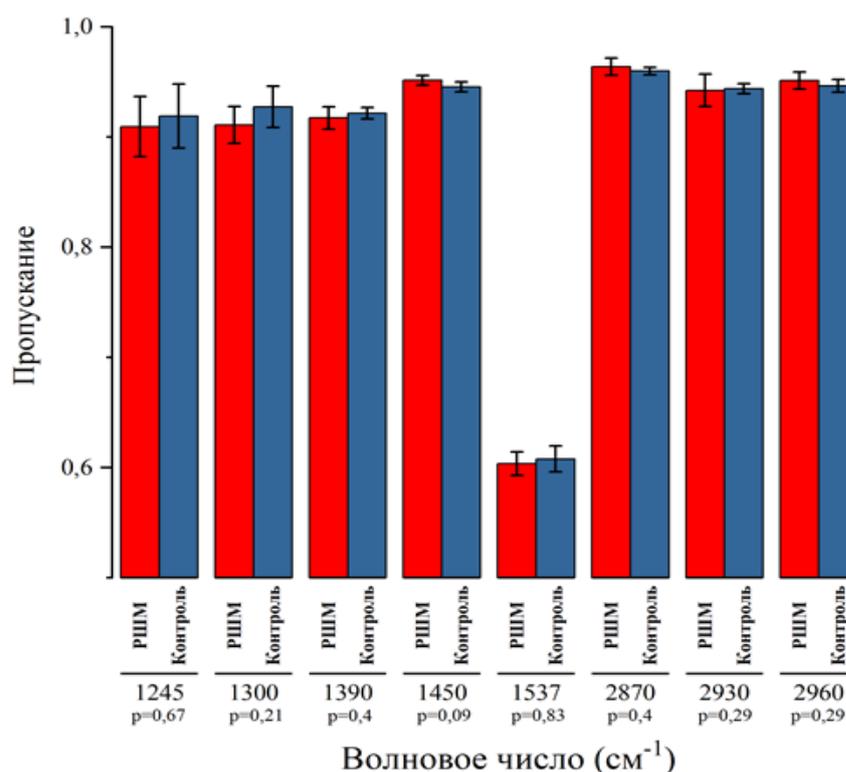


Рисунок 4.12. Амплитуда интенсивности ИК спектров пациентов с диагнозом РШМ и контрольной группы.

*КР спектроскопия образцов крови пациентов с диагнозом РШМ во время лучевой терапии*

Известно, что у пациентов со злокачественными новообразованиями с одной стороны увеличивается число сосудов в опухоли, а с другой - развивается анемия. Наиболее распространенным типом анемии, возникающей у пациентов с солидными опухолями, является "хроническая анемия", которая, связана не только с наличием патологии, но и с хроническими воспалительными заболеваниями, тяжелыми инфекциями и травмами всего организма [260]. Одним из сопутствующих признаков являются гипоферриемия и снижение насыщения трансферрина в сочетании с гиперферритинемией, что приводит к нарушению выработки эритроцитов костным мозгом [261]. Отметим, что факторы, связанные с лечением, также могут способствовать развитию анемии, например, кровопотерей при хирургическом вмешательстве, нарушение формулы крови при лучевая терапия (ЛТ) больших участков костного мозга или химиотерапия миелосупрессивными цитотоксическими препаратами [262]. Эти лечебные факторы могут усиливать тяжесть анемии у онкологических больных.

В связи со сказанным важным направлением онкологии является исследование состояния эритроцитов и гемоглобина, как основного фактора переноса кислорода в

организме человека. Гемоглобин - гемсодержащий белок, отвечающий за транспорт кислорода в организме человека [263], который представляет собой тетрамерный белок, состоящий из двух  $\alpha$ -субъединиц и двух  $\beta$ -субъединиц и четырех гемопорфириновых циклов (гем). Основная функция гема заключается в связывании молекулы кислорода [264]. При связывании гемоглобином кислорода, в нём происходит изменение конформации гемом гемоглобина и увеличивается сродство некоторых участков белка к молекулярному кислороду. Поэтому, последующим молекулам кислорода становится легче образовывать связь с гемоглобином, у которого одна связь уже образовалась. Данный механизм описывается в рамках модели, объясняющей кооперативное связывание кислорода с гемом с помощью двух состояний гемоглобина: R-форма (R-relaxed, «расслабленная») высокоаффинная форма с высоким сродством к кислороду и T-форма (T – tense, напряжённая) с низким сродством к кислороду [265].

Целью данной серии экспериментов было исследование роль конформации в изменении кислород связывающих свойств гема гемоглобина эритроцитов крови пациентов до и после проведения лучевой терапии при РШМ.

Объектом исследования служили 6 образцов венозной крови пациентов с РШМ (сухие мазки), полученные в радиотерапевтическом отделении Якутского республиканского онкологического диспансера, и 3 образца крови здоровых доноров (доноров подбирали соответствующего пола и возраста), которые наносились на сухое, обезжиренное предметное стекло и регистрировали спектры комбинационного рассеяния (КР). Эксперименты проводились на установке NTEGRA Spectra с конфокальной КР/флуоресцентной микроскопией и спектроскопией, длина волны источника излучения 532 нм при температуре помещения 23°C. Полученные КР спектры обрабатывались при помощи программного обеспечения OriginPro 2018 (сглаживание, нормировка, вычитание базовой линии проводилось по 15 точкам). Сравнение усредненных спектров контрольной группы и группы с РШМ до и после ЛТ представлены на рисунке 4.13.

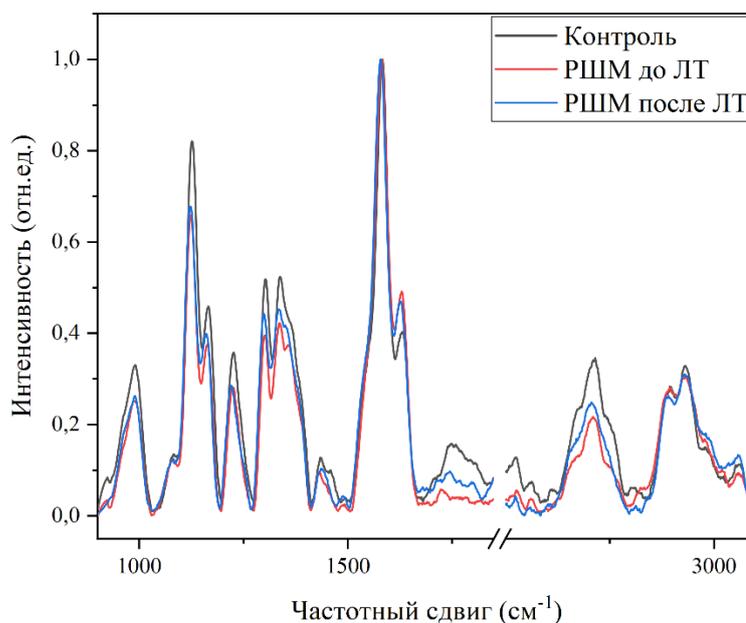


Рисунок 4.13. КР спектры гема гемоглобина эритроцитов крови контрольной группы и крови пациентов с РШМ до, после лучевой терапии.

Для увеличения разрешающей способности и для разделения совмещенных пиков КР – спектров была применена деконволюция методом наименьших квадратов. Неразрешенные пики возникают, когда различия в локализации полос максимумов близки. Деконволюция позволяет разделить эти пики и восстановить исходные сигналы (рисунок 4.14).

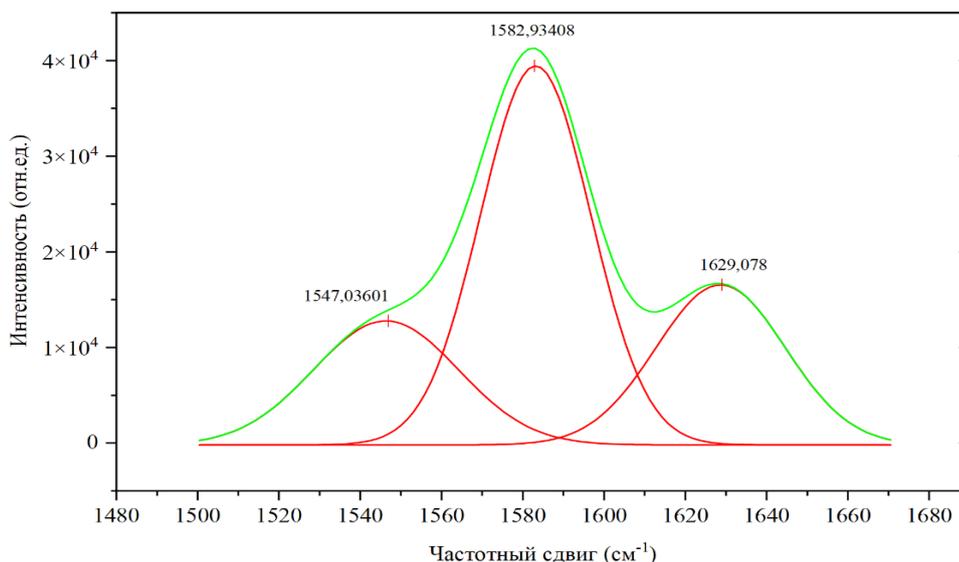


Рисунок 4.14. Анализ полосы КР спектра с помощью метода деконволюции для отделения пиков, расположенных в области волновых чисел от 1500 до 1700  $\text{см}^{-1}$ .

Для анализа изменений конформации гема и глобина молекулы Гб эритроцитах использовали величины соотношений интенсивностей характерных полос спектра КР:

$I_{1375}/I_{1127}$  — колебания боковых радикалов  $\text{C}\beta\text{CH}_3$  в гемопорфирине, зависит от белкового окружения и конформации глобина возле гемопорфирина вклад боковых  $-\text{CH}_3$  групп колебаний полуколец пиррола в гемопорфирине, выраженных при изменении конформации глобина в непосредственной близости от гема, характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец (изменение величины соотношения характеризует изменение конформации Гб из Т (дезоксигемоглобин) в R (оксигемоглобин). При увеличении данного соотношения вероятность нахождения гема в R-форме увеличивается.

$I_{1375}/I_{1172}$  — групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине, зависит от белкового окружения глобина возле гемопорфирина (характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец). Изменение соотношения, может быть связано с конформационными изменениями пирролов.

$I_{1375}/I_{1580}$  — относительная способность Гб выделять лиганды (в том числе,  $\text{O}_2$ ), чем оно выше, тем меньше способность выделять лиганды.

$I_{1580}/I_{1550}$  — вклад колебаний метиновых мостиков между пирролами в гемопорфирине, выраженных при деформации макроцикла - где гемопорфирин растянут и деформирован, либо имеет компактную недеформированную конформацию (характеризует сродство Гб к лигандам, в частности к кислороду). При увеличении данного соотношения возрастает сродство гема к лигандам.

$I_{1355}/(I_{1355}+I_{1375})$  — относительное количество комплексов дГб.

$(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$  — сродство Гб к лигандам (в первую очередь,  $\text{O}_2$ ).

$I_{1618}/I_{1580}$  — относительное число комплексов Гб с  $\text{NO}(\text{I})$ .

$I_{2850}/I_{2880}$  — отношение симметричных колебаний  $-\text{CH}$  метиленовых групп аминокислот к несимметричным колебаниям. Указывает на изменение липидной текучести мембраны. Чем выше соотношение, тем ниже плотность упаковки.

$I_{2880}/I_{2930}$  — вклад колебаний Н- метиленовых групп аминокислот, определяется конформационной подвижностью. При увеличении параметра увеличивается упорядоченность аминокислот и плотность упаковки аминокислот.

$I_{2930}/I_{2850}$  — отношение вклада колебаний симметричных концевых метиленовых групп к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот. Характеризует изменение полярности окружения аминокислот. При увеличении соотношения, полярность окружения гема снижается.

Таблица 4. Сравнение величин соотношений интенсивностей характерных полос спектра КР гема гемоглобина эритроцитов пациентов с диагнозом РШМ до и после ЛТ

Соотношение интенсивностей	Контроль	До ЛТ	После ЛТ
$I_{1375}/I_{1127}$	1,59	1,56	1,50
$I_{1375}/I_{1172}$	0,87	0,89	0,88
$I_{1375}/I_{1580}$	0,52	0,42	0,45
$I_{1580}/I_{1550}$	0,12	0,08	0,08
$I_{1355}/(I_{1355}+I_{1375})$	0,50	0,48	0,49
$(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$	3,18	2,50	2,85
$I_{1618}/I_{1580}$	0,34	0,41	0,39
$I_{2850}/I_{2880}$	0,28	0,34	0,38
$I_{2880}/I_{2930}$	0,85	0,92	0,84
$I_{2930}/I_{2850}$	4,20	3,16	3,13

\*Цветаи отмечены тенденции, зеленыи – возрастание, красныи – убывание

В ходе исследования установлено снижение соотношения интенсивностей полос  $I_{1375}/I_{1127}$ ,  $I_{1580}/I_{1550}$  и  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ , которые коррелируют с изменением конформации гема Гб и вероятностью нахождения гема в Т форме и сродство к лигандам (в основном к кислороду). Полученные данные свидетельствует об уменьшении числа комплексов оксигемоглобина и уменьшении способности связывать кислород гемом гемоглобина эритроцитов крови при РШМ. Доказано, что эффект возрастает после проведения ЛТ: отличия в соотношении пиков  $I_{1375}/I_{1127}$  составляют 2% и 5,5% до ЛТ и после ЛТ по сравнению с контрольной группой соответственно, что свидетельствует об уменьшении доли Гб находящегося в R форме.

Установлено, что соотношения величин пиков  $I_{1580}/I_{1550}$  у контрольной группы и пациентов с РШМ до ЛТ составляют 30% и не меняются после проведения ЛТ, а изменения в соотношении пиков  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ , свидетельствуют об уменьшении сродства Гб к лигандам, в основном к кислороду до ЛТ. После проведения ЛТ соотношения пиков  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$  немного увеличиваются, что, вероятно, свидетельствует об увеличении сродства к лигандам, но не достигает значения контрольного уровня. В то же время, относительное количество комплексов дГб не претерпевает значительных изменений. Установлено, что доля комплексов Гб с NO увеличивается, так, соотношение пиков  $I_{1618}/I_{1580}$  увеличивается на 20 % при сравнении

спектров образцов крови пациентов с РШМ до ЛТ и контрольной группы. После ЛТ данное соотношение уменьшается незначительно.

Соотношение  $I_{2850}/I_{2880}$ , указывающее на степень текучести мембраны клеток, возрастает при РШМ на 14% в сравнении с контрольной группой, а при ЛТ возрастает на 35% по сравнению с контрольной группой. Соотношение  $I_{2880}/I_{2930}$ , характеризующее упорядоченность и плотность упаковки аминокислотных остатков выше на 8% при РШМ до ЛТ в сравнении с контрольной группой. Данное соотношение возвращается в норму после проведения ЛТ. Полярность окружения аминокислот, характеризуемая соотношением  $I_{2930}/I_{2850}$  увеличивается при РШМ. Соотношения при РШМ меньше на 23% в сравнении с контрольной группой (чем выше соотношение, тем ниже полярность окружения).

Итак, с помощью КР спектроскопии доказано, что при РШМ способность гема гемоглобина связывать кислород (конформационные изменения) снижается, и более значительно в ходе ЛТ. О наличии данного эффекта свидетельствует то, что соотношениями пиков интенсивностей рассмотренных полос  $I_{1375}/I_{1127}$ ,  $I_{1580}/I_{1550}$  и  $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$  меняются.

Соотношение пиков  $I_{1375}/I_{1172}$ , характеризующее групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине составляет 0.87, 0.89 и 0.88 у контрольной группы, у группы с РШМ до облучения и РШМ после облучения соответственно, то есть, изменений в симметричных и ассиметричных колебаниях пиррольных полуколец не наблюдается, и следовательно, конформационных изменений пирролов обнаруживается. Относительное число комплексов дезоксигемоглобина при РШМ было незначительно меньше, чем в норме, после проведения ЛТ данный параметр незначительно увеличилось. Важно, что выявлено заметное увеличение числа комплексов гемоглобина с NO, а также заметное увеличение текучести мембраны клеток. Упорядоченность и плотность упаковки аминокислот при РШМ больше, чем в норме. Однако значения соотношений, соответствующие упорядоченности и плотности упаковки аминокислот, падает после проведения лучевой терапии. Также увеличивается полярность окружения аминокислот при РШМ и сохраняется на таком же уровне после проведения ЛТ.

Изменение конформации гема гемоглобина человека при действии ЛТ, вероятно, обусловлено действием как радиации (это доказано на обезьянах), так и наличием НРС.

### **4.3. Исследование действия ионизирующего излучения на молекулярно-клеточные структуры крови животных**

В ходе исследования влияния ЛТ на эритроциты методом СЭМ было обнаружено, что во время ЛТ происходит изменение размеров эритроцитов и увеличение количества дисморфных эритроцитов и видов дисморфии. Кроме того, были изучены образцы крови пациентов с диагнозом РШМ, проходивших ЛТ, методом ИК и КР спектроскопии. ИК и КР спектроскопия показала, что воздействие ионизирующего излучения приводит к изменениям структуры гемоглобина.

В данной серии экспериментов исследовали воздействие ионизирующего излучения (ИИ) на параметры крови обезьян (макака-резус, самцы) методом КР спектроскопии [266].

Известно, что ИИ влияет на организм млекопитающих, в том числе на кровь. Так, в крови у космонавтов после завершения длительного космического полета, так и в модельных экспериментах (антиортостатическая гипокинезия, пребывание человека в замкнутом объеме с измененной газовой средой), наблюдаются изменения числа, морфологии и свойств гемоглобина эритроцитов [267-271]. Известно, что радиационный риск — самый высокий в ходе будущего длительного полета на Марс. В преодолении этого риска рассматриваются три основных аспекта исследований — физиологический (сохранение здоровья и жизни космонавтов), эргонометрический (сохранение работоспособности экипажа) и технический (обеспечение бесперебойной работы приборов корабля) [272]. Исследования воздействия радиации на организм человека — это одна из составных частей программы "Марс-500" и для того, чтобы смоделировать на Земле действие этого фактора космической радиации было проведено несколько серий экспериментов на обезьянах» [272]. Одним из важных факторов космического полета является воздействие ионизирующего излучения (ИИ) на клетки белки и липиды крови, а также на процесс окислительного фосфорилирования и синтез АТФ и генерации свободных радикалов [273, 274].

Свойства эритроцитов зависят от состояния кровеносной системы, активности их антиоксидантных систем, общего состояния органов, а также от уровня активности клеток тканей, окружающих сосуды [275]. Нарушение нормальной работы организма приводит к изменению характеристик эритроцитов (объема, содержания гемоглобина и способности гемоглобина связывать кислород, свойств плазматической мембраны и т.д.)

[276]. Известно, действие ИО на кроветворную функцию костного мозга, приводящее к развитию анемии. В то же время изменения кислородтранспортной функции эритроцитов связанные с изменениями, происходящими на молекулярном уровне при действии ИО, остаются недостаточно изученными [274-277].

Далее представим результаты исследования фракционного воздействия ионизирующего излучения на состояние эритроцитов теплокровного животного (содержание гемоглобина и гематокрит; конформацию гема, характеризующей способность Гб связывать или сбрасывать  $O_2$ ).

Объектом исследования служила гепаринизированная (капля гепарина на 1 мл крови) кровь из вены обезьяны вида макака-резус (*Macaca mulatta*), самцы, 3,2-3.6 кг, возраст 2.5-3 года, около 40 особей). В работе проводили облучение обезьян (суммарная доза, 50 сЗв). Облучение проводилось на установке УПГД 2М с источником излучения цезий  $Cs^{137}$ . Активность источника  $7,4 \times 10^{12}$  Бк или 200 Кюри. Обезьяны облучались тотально и равномерно, в аналогичных дозах таких, какие ожидают космонавтов во время полета к Марсу. Опыты проводились параллельно с экспериментом "Марс-500», в ходе которого были проведены несколько сеансов острого облучения, но не по 15 сЗв, как в установленном для космонавтов нормативе, а по 50 сЗв [274]. В эксперименте животных облучали либо 1/10 суммарной дозы в течение 10 дней с перерывом в два дня (группа 1), либо 1/2 суммарной дозы в течение двух дней (группа 2). Далее исследовали кинетику восстановления параметров крови после 36-85 дней (группа 1) и 22-178 дней (группа 2).

Величину гематокрита (общий объем эритроцитов) контролировали при помощи микрогематокритной центрифуги Adams Readacrit СТ-3400, осаждение эритроцитов проводили в течение 5 мин при 7200 об./мин.(4750g), значения гематокрита определяли по калибровочной линейке, прилагаемой к прибору. Поскольку в работе не производили определения количества клеток, то величина гематокрита коррелирует как с изменением числа клеток, так и их объема [268,270].

Определение содержания Гб в крови проводилось спектрофотометрическим методом [268,270]. Эритроциты подвергали гемолизу, выделяя, таким образом, гемоглобин, а затем по спектрам поглощения определялась концентрацию гемоглобина. Эритроциты макак-резусов подвергали гемолизу путем 50-кратного разведения в дистиллированной воде. Полученный гемолизат разводили в 50 раз 0.06% раствором SDS (додецилсульфата натрия, Panreac) и инкубировали при комнатной температуре в течение

20 мин, затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Specol 11 (Zeiss) при длине волны 540 нм. Концентрацию гемоглобина оценивали по формуле:

$$c = (E \cdot \text{разведение} \cdot M) / (d \cdot \varepsilon) \text{ (г/л)},$$

где  $E$  — измеренное значение оптической плотности, разведение — кратность разбавления исходной крови в измеряемом образце,  $M$  — молекулярная масса мономера гемоглобина,  $d$  — длина оптического пути ячейки,  $\varepsilon$  — коэффициент молярной экстинкции.

Для оценки состояния молекул  $\beta$ -каротина в липидах или белках плазмы крови использовали спектроскопию резонансного комбинационного рассеяния (КР). Источником возбуждающего света служил аргоновый лазер, генерирующий излучение с длиной волны 473 нм, что близко к максимуму спектра поглощения  $\beta$ -каротина (450 нм). Луч лазера фокусировали на верхней части капилляра, заполненного плазмой крови макак-резусов. Мощность лазерного излучения, попадающего на образец, составляла 18–20 мВт. Рассеянное излучение собиралось системой линз на фоточувствительную матрицу. Для записи спектров и оценки параметров КР-спектра использовали программу “МОРС”. Время регистрации одного КР-спектра составляло 60 с. При обработке спектров КР производили вычитание базовой линии, используя программу, разработанную в лаборатории биофизики клетки биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, а также пакет программ Matlab 7.5. [278–281].

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) контролировали изменения конформации гема гемоглобина, свидетельствующие о доле комплексов оксигемоглобина (о-Гб), а также  $O_2$ -связывающие свойства Гб эритроцитов крови обезьян после ИИ. Источником возбуждающего света служил аргоновый лазер, генерирующий излучение с длиной волны 473 нм и мощностью 17 мВт. Луч лазера фокусировали на верхней части капилляра, заполненного кровью макак-резусов. Рассеянное излучение собиралось системой линз на фоточувствительную матрицу. Для записи спектров и установления параметров использовали программу “МОРС” (г. Троицк, РФ). Время регистрации одного спектра составляло 100с. При обработке спектров КР производили вычитание базовой линии, а также определение интенсивностей основных пиков спектров КР при помощи оригинальной программы Raman, разработанной в лаборатории биофизики клетки биологического факультета МГУ [282–285].

Известно, что гематокрит крови, характеризует долю объема крови, занимаемую форменными элементами крови (главным образом эритроцитами) и коррелирует как с изменением числа клеток, так и изменение их объема [268,270]. Снижение показателя гематокрита наблюдается при различных формах анемии, особенно после кровопотери, а увеличение гематокрита происходит при эритроцитозах [273-275]. Определение показателя гематокрита проводят в венозной или капиллярной крови с добавлением антикоагулянтов (в наших экспериментах - гепарин, 1 капля на 1 мл крови). На рисунке 4.15 представлены величины гематокрита макак-резусов до облучения (фон) и после облучения на 36, 64, 85 сутки (группа 1) и после облучения через 22, 36, 64, 85, 178 суток для группы 2.

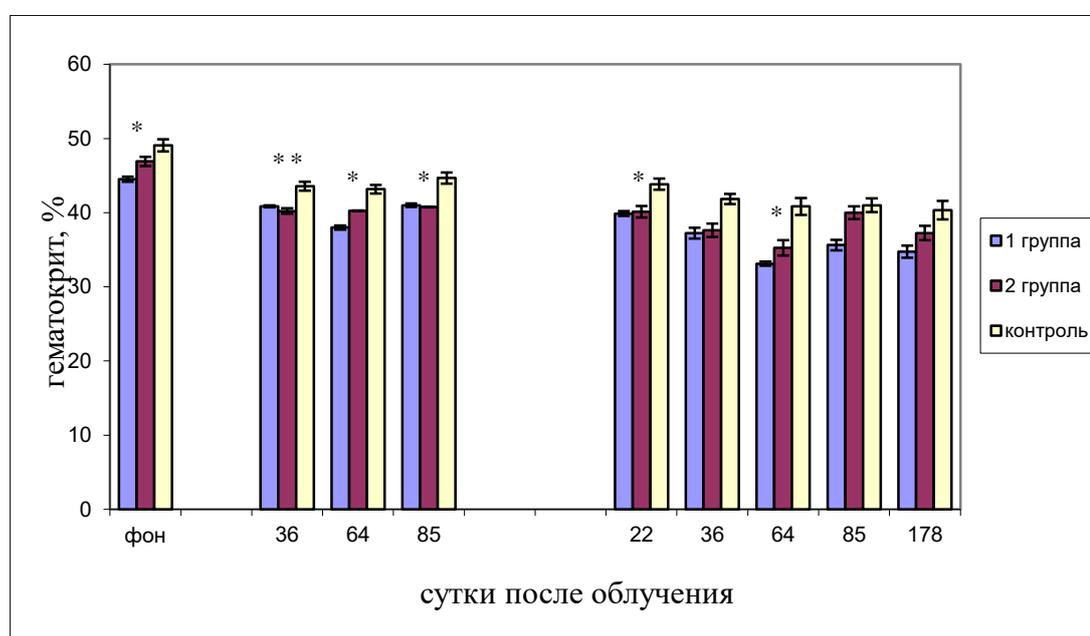


Рисунок 4.15. Динамика величины гематокрита (%) крови макак-резусов до (фон) и после облучения.

Установлено, что кровь животных исследуемых групп отличается по объемному содержанию эритроцитов (или число клеток). Так, без облучения, в группе 1 величины гематокрита были ниже, чем в контрольной группе, а на 36, 64, 85 сутки после первого облучения этот эффект сохраняется. После повторного облучения низкая величина гематокрита сохраняется на 22 и 64 сутки, в остальных случаях различия между опытом и контролем отсутствуют (Рисунок 4.15). Отметим, что, с течением времени, наблюдается снижение гематокрита во всех группах по сравнению с контролем. Установлено, что по сравнению с 36 сутками (после первого облучения) наблюдается снижение величины гематокрита на 64 сутки в группе 1, снижение величины гематокрита по сравнению с 36 сутками в группе 1 сохраняется на 85 и 178 сутки, в то время как для группы 2 такие

отличия отсутствуют. Таким образом, при облучении группы 1 снижение величины гематокрита более выражено на 36 день, а при облучении 2 группы – на 64 день.

На рисунке 4.16 представлены изменения величины концентрации гемоглобина в крови макак-резусов до облучения (фон) и после облучения на 36, 64, 85 сутки для группы 1 и после облучения через 22, 36, 64, 85, 178 суток для группы 2.

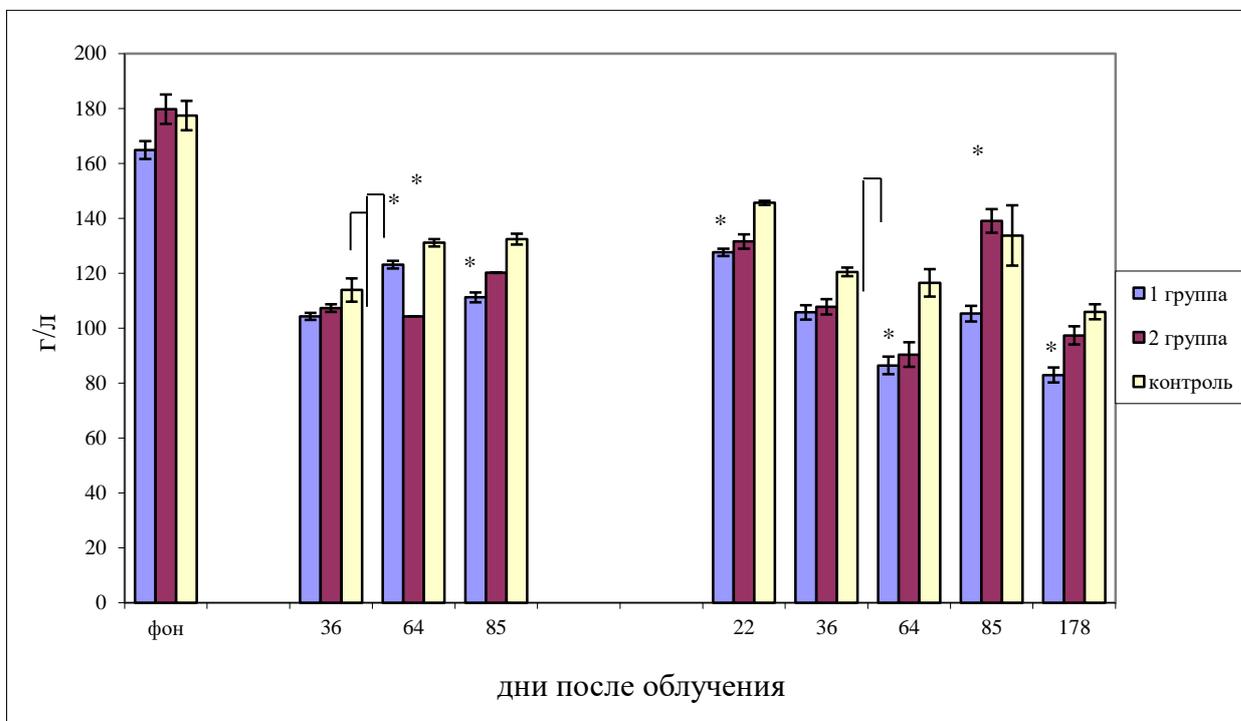


Рисунок 4.16. Динамика концентрации гемоглобина в крови макак-резусов до (фон) и после облучения.

Установлено, что исходно содержание гемоглобина у группы животных достоверно не отличаются (фон). В ходе эксперимента наблюдается тенденция к снижению содержания гемоглобина в группе 1 по сравнению с контролем. Действительно, на 36 сутки после ИИ и далее выявлено снижение содержания гемоглобина в крови всех групп животных по сравнению с контролем. Это согласуется с данными, полученными при исследовании изменений показателя гематокрита. Вероятно, в ходе ИИ у животных развивается анемия как в группах, подвергнутых облучению, так и в контроле, что может быть обусловлено как сезонными изменениями в организме животных, так и воздействием стресса, вызванного условиями эксперимента [286].

Установлено, что на 64 сутки после первого облучения наблюдается снижение содержания гемоглобина в группе 2, но на 85 сутки содержание гемоглобина в крови этих животных не меняется, хотя выявлено уменьшение содержание гемоглобина в группе 1. В эксперименте со второй группой (после второго облучения) обнаружено снижение

содержания гемоглобина по сравнению с контролем в группе 1 (на 22, 64 и 178 сутки, тенденция к снижению на 85 сутки). Вероятно, облучение животного вызывает снижение синтеза гемоглобина (или его разрушение) в крови макак-резусов.

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците была рассчитана путем деления концентрации гемоглобина в крови на показатель гематокрита. Эта величина отражает содержание гемоглобина в эритроците и не зависит от клеточного объема. Определение средней концентрации гемоглобина в эритроците важно для анализа кислородтранспортных свойств гемоглобина и их изменениях при ИИ. Снижение концентрации гемоглобина в эритроцитах может свидетельствовать как об изменении функции кроветворной системы или о наличии в кровеносных сосудах эритроцитов, содержащих меньшее количество гемоглобина, так и о увеличении объема эритроцитов, обусловленных изменениям в активности ион-транспортирующих систем мембраны эритроцитов (рисунок 4.17) [286].

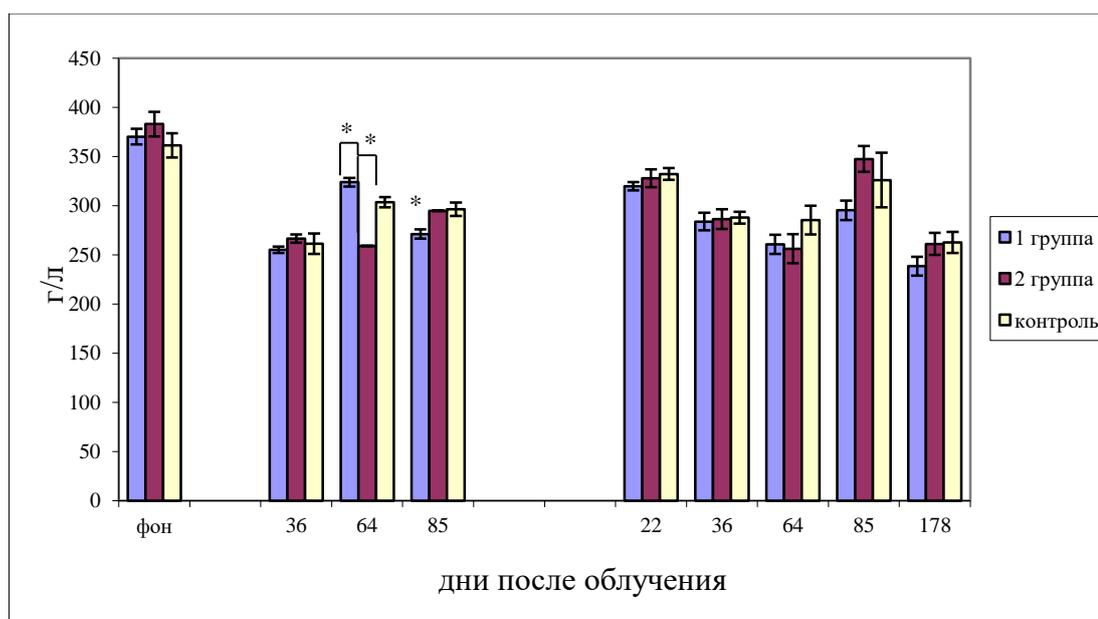


Рисунок 4.17. Динамика средней концентрации гемоглобина (г/л) в эритроцитах макак-резусов до (фон) и после облучения.

Установлено, что на 36 сутки после облучения средняя концентрация гемоглобина (г/л) в эритроцитах во всех группах снижается по сравнению с фоновыми значениями: на 64 сутки после облучения наблюдается снижение концентрации в группе 2 по сравнению с контролем, а на 85 сутки – снижение концентрации в группе 1 (рисунок 4.17). Вероятно, обнаруженные изменения свидетельствуют о нарушениях в процессе кроветворения, что может являться признаком анемии [286,287].

В следующей серии экспериментов исследовали изменения конформации гемоглобина и содержание антиоксиданта (каротиноид) в плазме крови после облучения животных. На рисунке 4.18 представлен характерный спектр РКР плазмы крови макак-резусов. Форма спектра и положение пиков соответствуют спектру РКР каротиноидов, который характеризуется наличием полос с положениями максимумов 1005, 1154 и 1523  $\text{см}^{-1}$ . Первый пик связан с колебаниями связей С–СН<sub>3</sub> боковых метильных радикалов в молекуле каротиноидов, второй и третий — с валентными колебаниями одинарных связей =СН–СН= и двойных связей –НС=СН– в углеводородной цепи каротиноидов. Полоса 1523  $\text{см}^{-1}$  является важной характеристической линией: частота колебания двойных связей и положение соответствующего пика в спектре КР является точной мерой жесткости связи и поэтому используется для оценки степени сопряженности  $\pi$ -электронной системы сопряженных двойных связей. Кроме того, положение этого пика зависит от длины молекулы каротиноида (числа атомов С) и смещается в сторону больших частот при уменьшении числа атомов углерода в цепи. Агрегация каротиноидов, в частности  $\beta$ -каротина, влияющая на положение максимума поглощения, не затрагивает положения полос спектра РКР. При цис-конформации двойных связей  $\beta$ -каротина пик 1154  $\text{см}^{-1}$  имеет два ярко выраженных плеча с положениями 1190-1193  $\text{см}^{-1}$  и 1210  $\text{см}^{-1}$ . При переходе в транс-конформацию хотя бы по одной двойной связи плечо 1210  $\text{см}^{-1}$  сдвигается в низкочастотную область и практически сливается с плечом 1193  $\text{см}^{-1}$ , в некоторых случаях оно полностью исчезает. Кроме этого, при цис-транс переходе увеличивается полуширина полосы 1523  $\text{см}^{-1}$ .

В гидрофобном окружении (липопротеиновые комплексы, мембраны, липосомы и т. д.) молекулы каротиноидов меняют конформацию при изменении упорядоченности окружающих их фосфолипидных «хвостов», что влияет на спектры РКР каротиноидов. Было доказано, что отношение интенсивностей полос  $I_{1523}/I_{1155}$  зависит от вязкости гидрофобной области липидов мембраны, мембранного потенциала, количества мембраносвязанных ионов, что обусловлено упорядоченностью фосфолипидных «хвостов» в окружении молекул  $\beta$ -каротина и может использоваться для оценки микровязкости липопротеиновых комплексов плазмы крови [288].

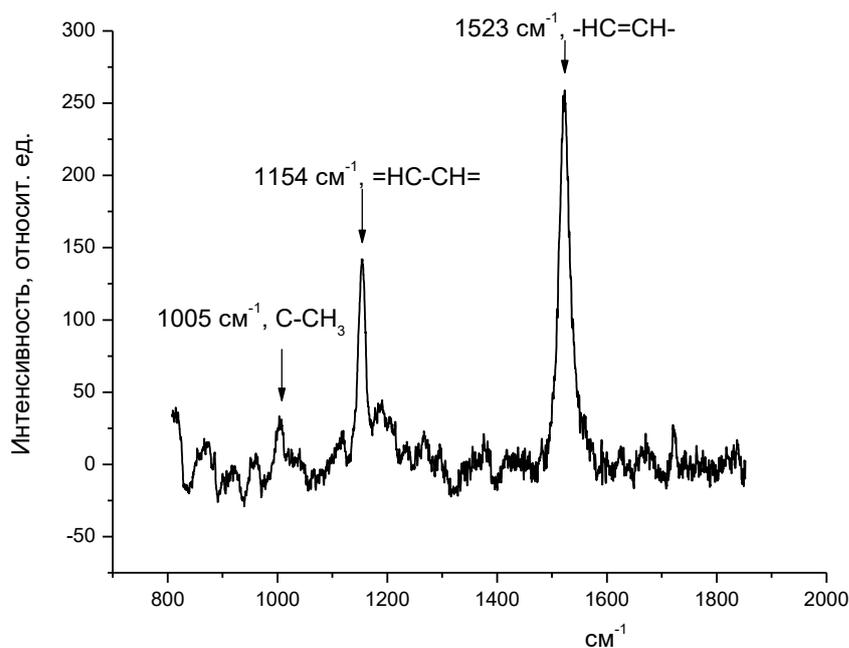


Рисунок 4.18. Спектр РКР каротиноидов плазмы крови макак-резусов.

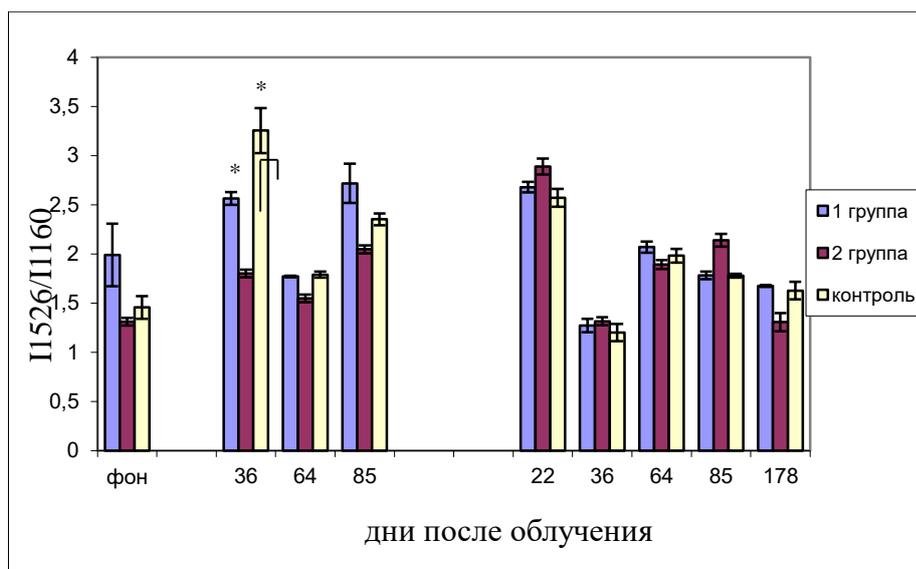


Рисунок 4.19. Динамика параметров КР спектра каротиноидов плазмы крови обезьян до (фон) и после облучения

Установлено, что конформация каротиноидов плазмы крови обезьян изменяется на 36-е сутки после первой серии облучения (рисунок 4.19). Полученные изменения свидетельствуют о том, что 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 инициированы процессы, меняющие характер белок-липидных взаимодействий в липопротеиновых комплексах или белках плазмы крови (альбумин), в которых находятся

каротиноиды. Во все последующие дни, а также после второй серии облучений изменений в вязкости микроокружения каротиноидов не выявлено.

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) была исследована способность эритроцитов переносить кислород, регистрируя изменения конформации гема, свидетельствующие о доле комплексов оксигемоглобина (о-Гб), а также о  $O_2$ -связывающих свойствах Гб у обезьян при ИИ. (Рисунок 4.20). По соотношению интенсивностей пиков оценивалась доля о-Гб, а также  $O_2$ -связывающие гемоглобина [289]:

$$I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375}) - \text{доля комплексов о-Гб};$$

$$I_{1355}/I_{1564} - \text{способность Гб связывать } O_2;$$

$$I_{1375}/I_{1588} - \text{способность Гб выделять } O_2;$$

$$(I_{1355}/I_{1564}) / (I_{1375}/I_{1588}) - \text{сродство Гб к } O_2$$

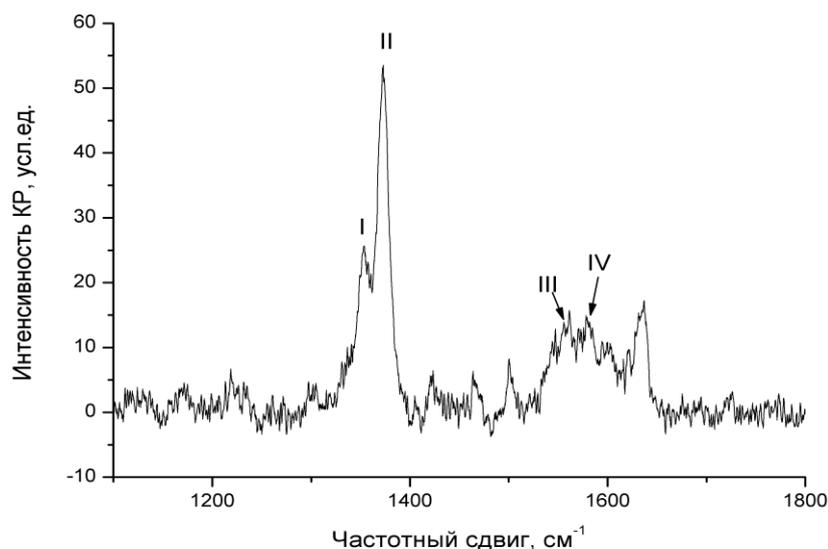


Рисунок 4.20. Спектр КР крови обезьян макак-резусов. Пики, отмеченные цифрами I ( $1355 \text{ см}^{-1}$ ) и II ( $1375 \text{ см}^{-1}$ ), соответствуют колебаниям полуколец пирролов в гемопорфирине дезоксигемоглобина (д-Гб) и оксигемоглобина (о-Гб), соответственно.

Пик под цифрой III ( $1560\text{-}1564 \text{ см}^{-1}$ ) связан с колебанием метиновых мостиков в гемопорфирине д-Гб, а также Гб с низким сродством к  $O_2$ , пик под цифрой IV ( $1580\text{-}1588 \text{ см}^{-1}$ ) – с колебанием метиновых мостиков в о-Гб и Гб с высоким сродством к  $O_2$ .

На рисунке 4.21 показана гистограмма изменений доли комплексов о-Гб в эритроцитах обезьян при воздействии ИИ.

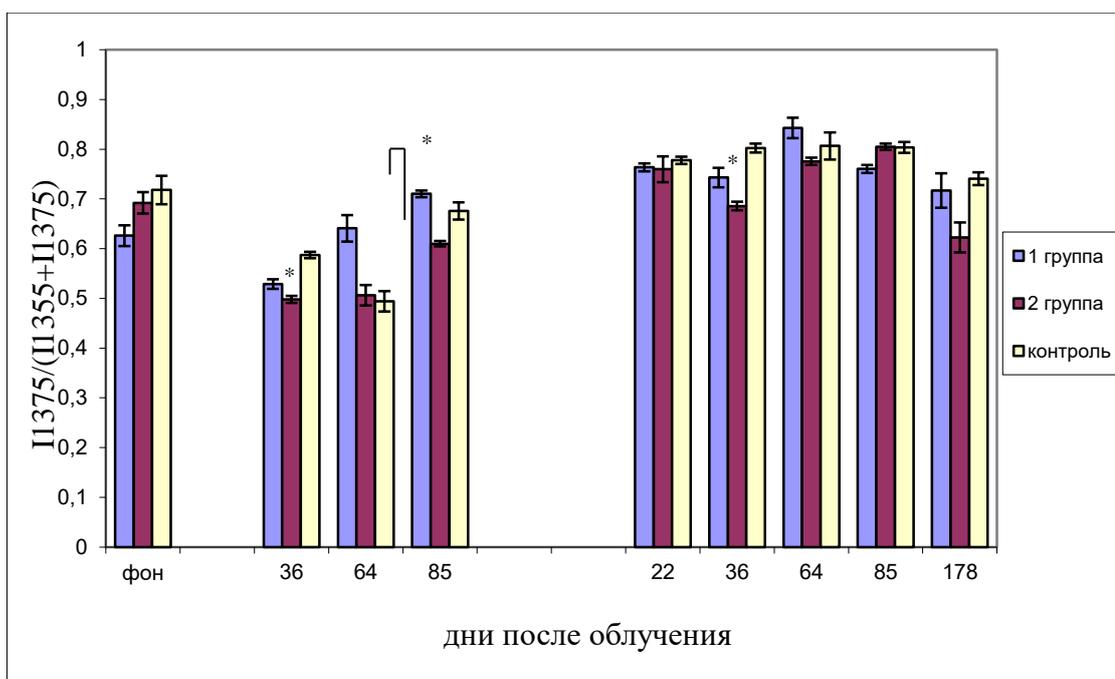


Рисунок 4.21. Динамика доли комплексов о-Гб оксигемоглобина у обезьян до (фон) и после облучения.

Установлено, что до начала экспериментов (фон) все конформация гема в гемоглобине трех групп такова, при которой доля комплексов о-Гб одинакова. Однако, в процессе первого и после повторного облучения происходят изменения в доле комплексов о-Гб в обеих группах. При исходном облучении доля комплексов о-Гб на 36 сутки уменьшается в группе 1, а на 64-е сутки – увеличивается. Отметим, что у группы 1 на 64-е сутки уменьшается показатель гематокрита, и, вероятно, увеличение содержания о-Гб может рассматриваться, как адаптация к уменьшению числа эритроцитов в крови после воздействия ИИ. На 85-е сутки после первой серии облучений доля комплексов о-Гб в группе 2 ниже, чем в группе 1, но не отличаются от контроля. После повторного облучения достоверное изменение доли комплексов о-Гб по сравнению с контролем выявлено только для группы-2 (36 дн.). В целом, отметим, что после обеих серий облучений существенных изменений доли комплексов о-Гб в гемоглобине не обнаружено. Кроме того, мы не выявили корреляций в изменении доли комплексов о-Гб с изменениями гематокрита или содержания Гб в крови и эритроцитах. Отметим, что в течение всего эксперимента у контрольной группы наблюдаются изменения доли комплексов о-Гб, что может быть отчасти обусловлено сезонными состояниями животных.

В следующей серии экспериментов контролировали изменения способности гемоглобина связывать и десорбировать кислород после воздействия ИИ. На рисунке 4.22

представлена гистограмма, характеризующая изменения конформации гема Гб при изменении способности связывать  $O_2$ . В ходе эксперимента нами не обнаружены изменения в способности Гб связывать  $O_2$  (сравнение данного параметра в крови животных группы 1 и 2 с контрольной группой). Однако, как при первом облучении, так и при повторном облучении животных на 85-е сутки наблюдаются достоверные отличия в способности Гб связывать кислород в крови группы 1 и 2. Установлено, что при облучении в группе 1 способность Гб связывать  $O_2$  ниже, чем в группе 2, а при повторном облучении – наоборот, в группе 1 способность Гб связывать  $O_2$  выше, чем в группе 1.

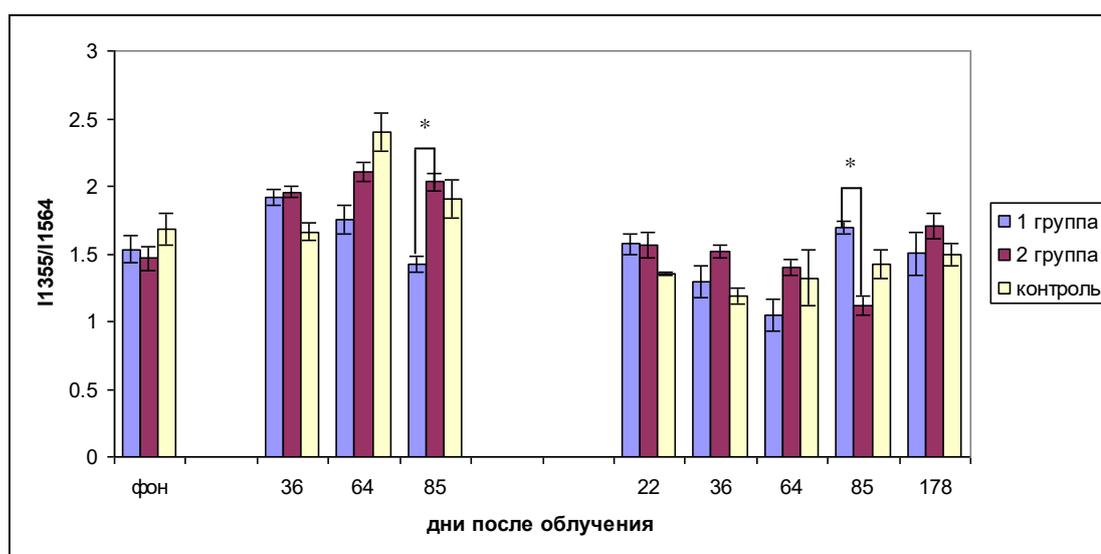


Рисунок 4.22. Динамика конформации гема, характеризующей способность Гб связывать  $O_2$  до (фон) и после облучения.

Отметим, что исследование способности гема Гб сбрасывать  $O_2$  также не выявило отличий между группами 1 и 2 по сравнению с контролем (Рисунок 4.23). Однако после облучения на 64-е сутки способность Гб сбрасывать  $O_2$  у группы 2 меньше, чем у группы 1 (рисунок 4.23).

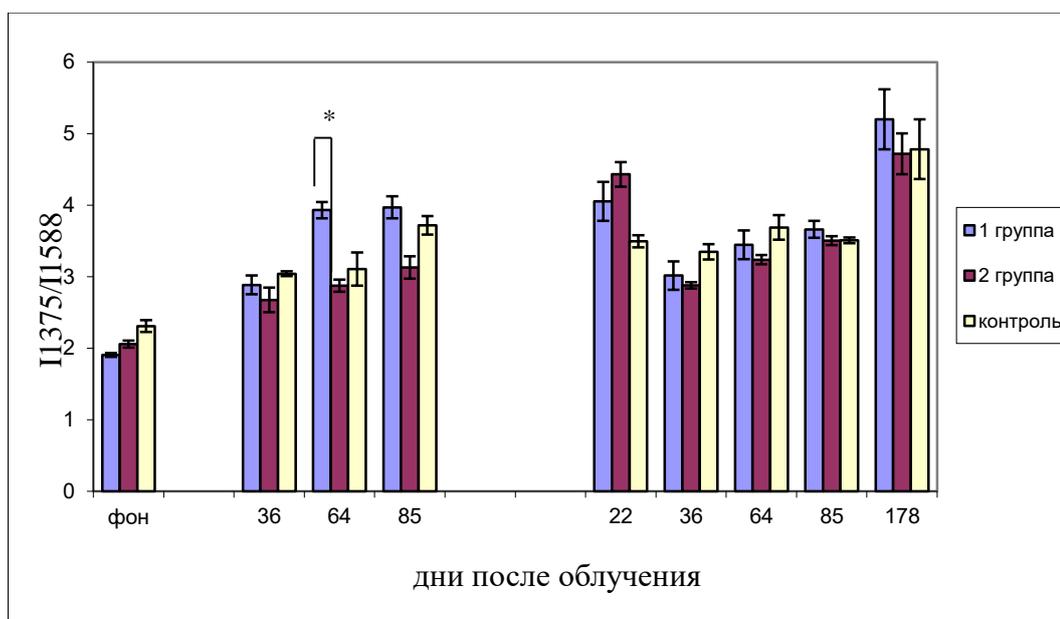


Рисунок 4.23. Динамика конформации гема, характеризующей способность Гб сбрасывать  $O_2$  до (фон) и после облучения.

Как мы отмечали, обнаруженные изменения в способностях Гб связывать и сбрасывать  $O_2$  отражают изменения в конформации д-Гб и о-Гб, что и приводит к изменению  $O_2$ -связывающих свойств Гб. Отметим, что в случаях, когда между группами нет достоверных отличий по этим параметрам, изменение сродства гемоглобина к кислороду (определяемого, как отношение способности Гб связывать и выделять кислород) более выражено на 64 и 85 сутки после первого облучения животных (рисунок 4.24).

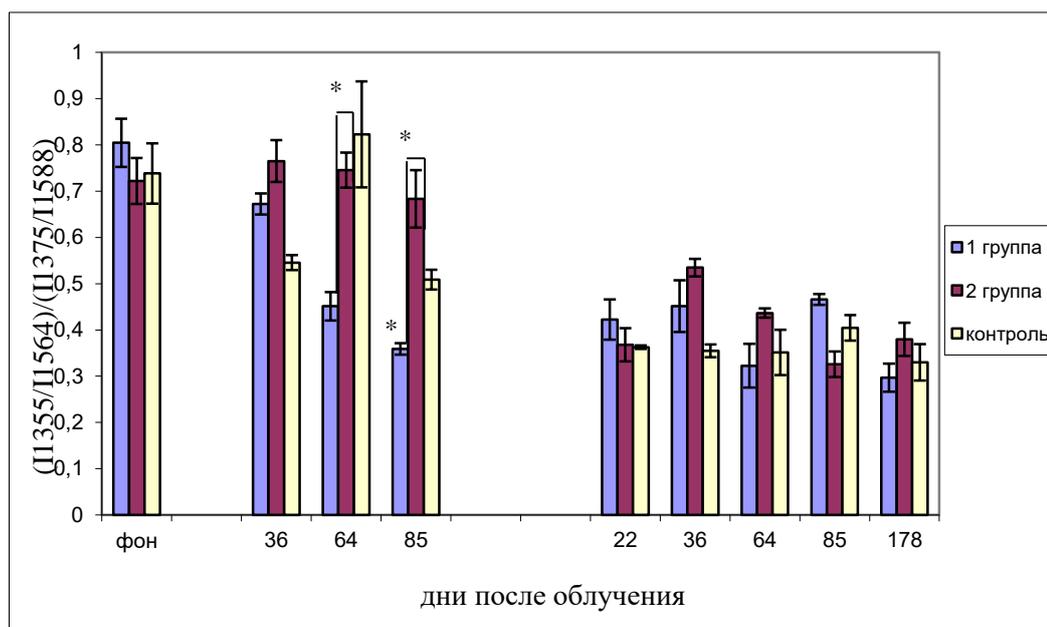


Рисунок 4.24. Динамика конформации гема, характеризующей сродство Гб к  $O_2$  до (фон) и после облучения.

Действительно, что на 64-е и 85-е сутки после облучения у обезьян группы 1 сродство Гб к  $O_2$  существенно ниже, чем у обезьян группы 2. Отметим, что различия в сродстве Гб к кислороду между группой 1 и 2 не коррелируют с изменениями в содержании Гб и гематокрита в этих группах. Вероятно, отличия в сродстве Гб к  $O_2$ , наблюдающееся для группы 1 и 2 групп после первой серии облучений, не являются адаптационными к изменению показателя гематокрита или содержания Гб в крови, а отражают другие процессы, влияющие на конформацию Гб. Возможно, это синтез другой формы Гб или изменение ионного состава плазмы крови и цитоплазмы эритроцита, а также изменение концентраций  $CO_2$  и  $NO$  в плазме крови – молекул, которые являются модуляторами для сродства Гб к кислороду [244].

Доказано, что при облучении снижение величины показателя гематокрита более выражено на 36 день, а при последующем облучении на 64 день наблюдается снижение содержания гемоглобина, что может свидетельствовать как об изменении функции кроветворной системы, так и о увеличении объема эритроцитов, обусловленных изменениями в активности ион-транспортирующих систем мембраны эритроцитов.

С помощью КР спектроскопии были впервые исследованы молекулярные изменения каротиноидов плазмы крови и гема гемоглобина эритроцитов. Доказано, что после воздействия ИИ в группе 2 микроокружение каротиноидов в липопротеиновых или белковых комплексах плазмы становится менее гидрофобным, 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 или белковых комплексах плазмы, в которых локализованы каротиноиды.

Отметим, что в определенные дни после первой серии облучений происходят достоверные изменения свойств Гб в группах 1 и 2 по сравнению друг с другом. Вероятно, что последующее облучение по-разному оказывает воздействие на Гб. По всей видимости, облучение, проводимое для группы 1, оказывает более выраженное действие на Гб, чем для группы 2. Установлено, что у группы 1 на 64-е сутки после воздействия ИИ снижается величина показателя гематокрита и, в связи с этим, вероятно, увеличение доли комплексов о-Гб может рассматриваться, как адаптация к уменьшению числа эритроцитов. Вероятно, различия в сродстве Гб к  $O_2$ , наблюдающееся для группы 1 и 2 групп после первой серии облучений, не являются адаптационными к изменениям,

выявленным в показателе гематокрита или содержания Гб в крови, а отражают другие процессы, влияющие на конформацию Гб. Возможно, это синтез другой формы Гб или изменение ионного состава плазмы крови и цитоплазмы эритроцита, а также изменение концентраций CO<sub>2</sub> и NO (молекулы, которые являются модуляторами для сродства Гб к кислороду) в плазме крови.

Полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях крови (эритроциты, каротиноиды плазмы крови) млекопитающих позвоночных животных при различных режимах воздействия ИИ. Исследование содержания или конформации молекул каротиноидов в липопротеиновых комплексах плазмы крови, возможно, позволит разработать и внедрить методологию диагностики состояния целого организма.

#### **4.4. Исследование состава наноразмерных структур на поверхности эритроцитов с помощью полимеразной цепной реакции**

В данном параграфе представляются результаты исследования, полученные методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) по определению состава НРС, которые были обнаружены до и во время проведения ЛТ методом СЭМ [290, 291]

На сегодняшний день исследование методов раннего выявления РШМ является актуальным и одним из ключевых направлений таких исследований является поиск маркеров РШМ в крови, что может значительно улучшить диагностику на ранних стадиях [292].

В этой связи учёные предлагают использовать для раннего обнаружения РШМ метод определения циркулирующей опухолевой ДНК, которая может присутствовать в крови пациенток. Существует мнение, что одним из показателей наличия опухолевой ДНК РШМ является наличие циркулирующей ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ). Считается, что эта внеклеточная ДНК, содержащая определённые копии генома ВПЧ, возникает из трансформированных клеток и может выступать в роли раннего биомаркера для выявления РШМ. Таким образом, использование данных подходов открывает новые горизонты в диагностике и повышает шансы на успешное лечение [293].

В основном циркулирующую ДНК ВПЧ для диагностики РШМ определяют в образцах плазмы и сыворотки крови с использованием ПЦР в различных её модификациях. Для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего участок белка Е7 ВПЧ

(ДНК E7 ВПЧ), применяют специальные праймеры, так как считается, что именно ДНК E7 ВПЧ представляет собой оптимальный биомаркер для выявления РШМ [294].

Исследования на кератиноцитах показали, что белок E7 способствует стимуляции репликации и клеточного деления так, что даже после дифференцировки клетки сохраняют свою способность к делению [295]. В работе [2] чувствительность метода, основанного на амплификации ДНК E7 ВПЧ с использованием капельной цифровой ПЦР (Droplet Digital PCR), составила 87%. В то же время, в исследовании [296] изначально чувствительность аналогичного метода была равна 31%, однако после его модификации увеличилась до 100%.

Итак, в данной главе рассматривается задача обнаружения специфических фрагментов циркулирующей ДНК ВПЧ в крови пациентов, что, возможно, также в дальнейшем будет позволять осуществлять диагностику на ранних стадиях заболевания. Одним из приоритетов является то, чтобы такой тест был легким в воспроизведении и доступным по стоимости для широкого использования в клинической практике.

Для решения данной задачи было решено использовать метод ПЦР-РВ, который применим на универсальном лабораторном оборудовании, распространенном в большинстве медицинских учреждений, а также был выбран набор праймеров, которые уже имеют широкое применение в клинических и лабораторных исследованиях, что обеспечивает их доступность и низкую стоимость.

В рамках исследования была проведена детекция ДНК в крови пациентки с РШМ. Для этого использовались праймеры, предназначенные для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего участок белка L1 ВПЧ. Также в крови той же пациентки была выполнена детекция фрагмента ДНК, кодирующего участок  $\beta$ -глобина генома человека, что служит контролем для подтверждения корректности процесса извлечения и амплификации ДНК.

Детекцию указанных фрагментов ДНК осуществляли во фракциях крови, практически не содержащих клеточных ядер, в частности, в плазме и эритроцитарной фракции. Плазма как компонент крови была выбрана из-за своего высочайшего содержания циркулирующей ДНК и минимальной вероятности загрязнения клеточными остатками, что делает её идеальным объектом для молекулярно-генетических исследований.

Доводы для обоснования принятых решений о совместной детекции этих фрагментов ДНК как возможного маркера РШМ в указанных фракциях крови следующие:

во-первых, хотя известно, что при развитии РШМ изменения в инфицированной клетке прерывают репликацию ВПЧ, поэтому вирионы-потомки не продуцируются [297] и экспрессия L1 плохо поддерживается [298], все-таки не все инфицированные клетки у пациентов с РШМ подвергаются раковой трансформации, соответственно репликация ВПЧ при РШМ может все-таки присутствовать;

во-вторых, есть вероятность, что ВПЧ может связываться с эритроцитами на их поверхности. На примере эксперимента с мышами показано связывание с поверхностными рецепторами их эритроцитов вирусоподобных частиц, имеющих белок L1, полученный из вируса папилломы крупного рогатого скота типа 1 [299]. К тому же рецептор ВПЧ – гепарансульфат [300] – идентифицирован на эритроцитах человека [301];

в-третьих, поскольку в исследовании [8] показано, что ДНК L1 ВПЧ может быть обнаружена в плазме женщин не только с РШМ, но и с дисплазиями шейки матки, в качестве возможного показателя малигнизации клеток шейки матки посчитан факт присутствия в безъядерных фракциях крови у пациенток с РШМ вместе с фрагментами ДНК ВПЧ также фрагментов ДНК  $\beta$ -глобина генома человека, так как известно, что ген  $\beta$ -глобина человека активно экспрессируется клетками карциномы шейки матки [302];

в-четвертых, эритроциты способны нести на своей поверхности экстрацеллюлярные везикулы [247], часть которых представлена экзосомами [240], в том числе, опухолевыми экзосомами. Имеются доказательства наличия в экзосомальной ДНК опухолевого происхождения всего генома опухолевых клеток [303]. Поэтому не исключено присутствие в эритроцитарной фракции заключенных в НРС (вирусные частицы, экзосомы) фрагментов ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагментов ДНК, кодирующих  $\beta$ -глобин генома человека;

в-пятых, эритроциты способны нести на своей поверхности ДНК, связанную с поверхностью клетки (cell-surface-bound extracellular DNA), которая, как было показано, образуется не без участия опухолевых клеток [304]. И поэтому, при РШМ не исключается возможность присутствия на поверхности эритроцитов ДНК, которая включает гены, кодирующие белок L1 ДНК ВПЧ, и гены, кодирующие  $\beta$ -глобин генома человека;

в-шестых, методом СЭМ нами были обнаружены на поверхности эритроцитов крови пациентов с РШМ НРС.

Материалом для исследования явилась венозная кровь 5 пациенток в возрасте от 45 до 55 лет (жителей Якутии) с впервые выявленным РШМ. На момент взятия крови пациенткам не проводилось никакого лечения РШМ.

Венозная кровь была забрана путем венепункции в вакуумные контейнеры для забора крови с КЗ-EDTA. Из каждой крови были подготовлены 3 вида биоматериала – образцы плазмы PI (1), эритроцитарной взвеси RBCsus (2) и эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином RBCsus-Try (3). Третий вид биоматериала служил контролем присутствия искоемых фрагментов ДНК на поверхности эритроцитов, а также контролем чистоты эритроцитарной взвеси. Если после обработки трипсином в эритроцитарной взвеси будут обнаружены фрагменты ДНК  $\beta$ -глобина генома человека, то это не будет исключать наличия в ней ядерных клеток, например нейтрофилов.

Для разделения крови на фракции ее сначала центрифугировали при 1600 об/мин в течение 10 минут. На этом этапе были получены образцы плазмы (PI) и эритроцитарная фракция. Затем эритроцитарную фракцию объемом 1 мл трижды отмыли фосфатным буфером для получения образца эритроцитарной взвеси. Образец эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, получили следующим образом: в половину объема образца эритроцитарной взвеси, приготовленной способом, который описан выше, добавили 0,25%-ный раствор трипсина в соотношении 1:1 и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 минут, после инкубации центрифугировали для получения осадка; затем нижнюю часть осадка трижды отмыли фосфатным буфером, и этот биоматериал был включен в исследование как образец эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином.

Все образцы до выделения ДНК и проведения ПЦР-РВ хранились в морозильнике при температуре -20°C.

ДНК из образцов была выделена с помощью фенол-хлороформного метода. Концентрацию и качество выделенной ДНК определяли с использованием наноспектрофотометра, следуя инструкции производителя [305].

ПЦР-РВ проводилась на амплификаторе CFX96 (Biorad) с использованием готовой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Evrogen) согласно параметрам, рекомендуемым производителем [306].

Для детекции фрагментов ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагментов ДНК, кодирующих  $\beta$ -глобин генома человека, использовались праймеры MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'/5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') и PC03/04 (5'-ACASAACTGTGTTCACTAGC-3'/5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3')

соответственно.

Длину ампликонов определяли методом электрофореза в агарозном геле.

В ходе исследования во всех 15 образцах (по 3 образца [PI, RBCsus и RBCsus-Try] от каждого из пяти пациентов с РШМ) ДНК была обнаружена и выделена в достаточных количествах (табл. 5).

Таблица 5. Концентрация ДНК (нг/мл)

	PI	RBC	RBC-Try
Пациентка 1	Высокая	Высокая	Высокая
Пациентка 2	Высокая	Высокая	Высокая
Пациентка 3	Высокая	3773	Высокая
Пациентка 4	Высокая	Высокая	Высокая
Пациентка 5	3390	2808	2753

Примечание: Концентрация «Высокая» означает, что концентрация выделенной ДНК превышает линейный диапазон спектрофотометра.

Результаты ПЦР-РВ с использованием праймеров PC03/04 и MY09/11 (табл. 6) показали совместное присутствие генов, соответствующих участку  $\beta$ -глобина человека и участку ДНК белка L1 ВПЧ, в PI от пациента №5 (20% случаев), в RBCsus от пациентов № 3–5 (60% случаев) и в RBCsus-Try от пациента № 5 (20% случаев).

Таблица 6. Результаты ПЦР-РВ с использованием праймеров PC03/04 и MY09/11

	PI		RBC		RBC-Try	
	PC03/04	MY09/11	PC03/04	MY09/11	PC03/04	MY09/11
Пациент 1	-+ (+)	-(N/A)	-+ (+)	-+ (+)	-+ (-)	-+ (-)
Пациент 2	- (-)	- (-)	-+ \ +	-+ (+)	- (-)	- (-)
Пациент 3	- (-)	- (-)	+ (+)	+ (+)	-+ (-)	-+ (-)
Пациент 4	-+ (-)	-+ (-)	+ (+)	+ (+)	-+ (-)	-+ (-)
Пациент 5	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)

Примечание: Знак "+" указывает на амплификацию, знак "-" указывает на отсутствие амплификации, знак "- +" указывает на неопределенную амплификацию. В скобках приведены результаты электрофореза с продуктами ПЦР-РВ.

Для примера приведен результат проведения ПЦР-РВ с праймерами МУ09/11 и РС03/04 у пациентки 3:

– для ДНК, извлеченной из плазмы: фрагмент ДНК, кодирующий белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагмент ДНК, кодирующий  $\beta$ -глобин генома человека, обнаружены не были (рисунок 4.25);

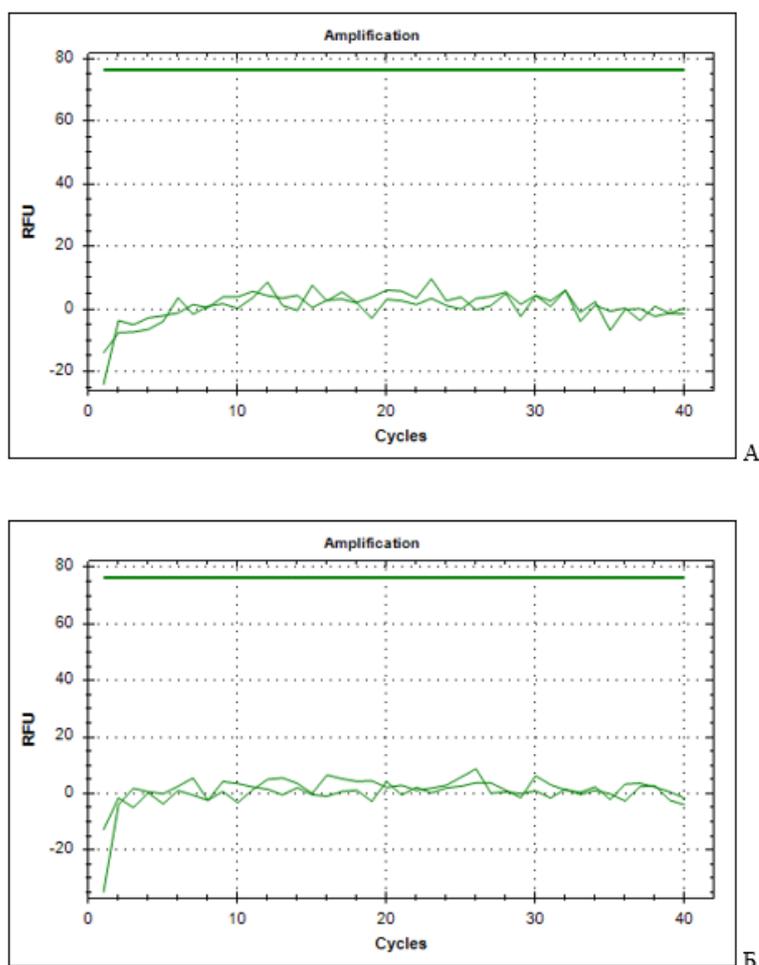
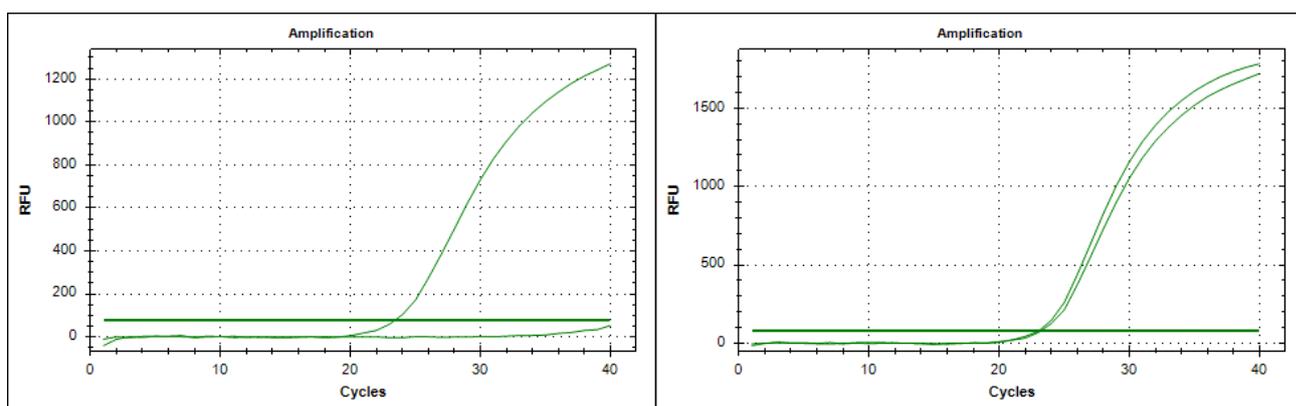


Рисунок 4.25. Графики накопления флуоресцентного сигнала амплификации фрагментов ДНК, выделенной из плазмы пациентки 3 с РШМ. а) – амплификация фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ДНК ВПЧ, и б) – кодирующего  $\beta$ -глобин генома человека – для ДНК, извлеченной из эритроцитарной взвеси.

Для фрагмента ДНК L1 ВПЧ был получен сомнительный результат амплификации, в то время как фрагмент ДНК, кодирующий  $\beta$ -глобин генома человека, был обнаружен (рисунок 4.26);

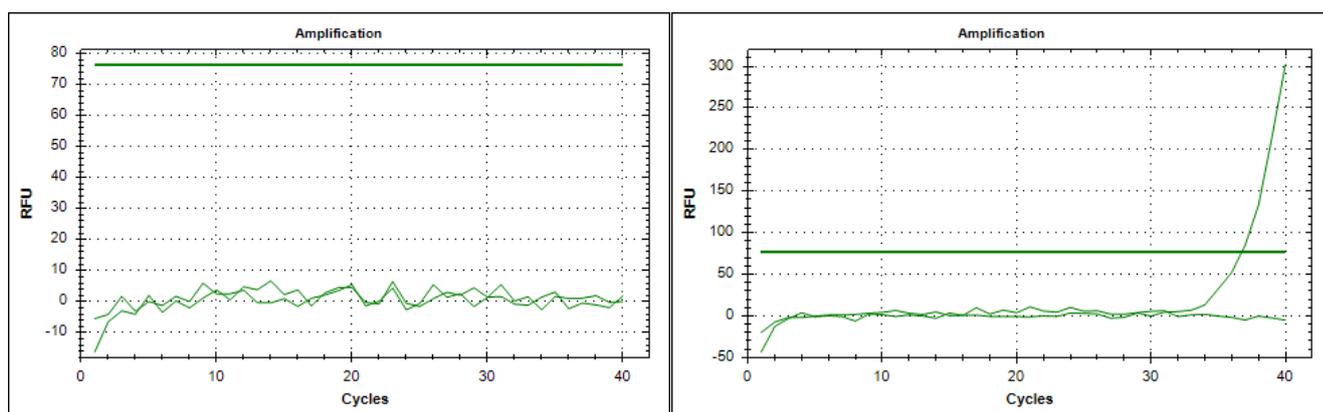


а)

б)

Рисунок 4.26. Графики накопления флуоресцентного сигнала амплификации фрагментов ДНК, выделенной из эритроцитарной взвеси пациентки 3 с РШМ. а) – амплификация фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ДНК ВПЧ, и б) – кодирующего  $\beta$ -глобин генома человека – для ДНК, извлеченной из эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином.

Фрагмент ДНК L1 ВПЧ не обнаружен, а для фрагмента ДНК, кодирующего  $\beta$ -глобин генома человека, был получен сомнительный результат амплификации (рисунок 4.27).



а)

б)

Рисунок 4.27. Графики накопления флуоресцентного сигнала амплификации фрагментов ДНК, выделенной из эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, у пациентки 3 с РШМ. а) – амплификация фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ДНК ВПЧ, и б) – кодирующего  $\beta$ -глобин генома человека.

Проведенный электрофорез подтвердил наличие продуктов амплификации в образцах, где в результате ПЦР-РВ произошла амплификация изучаемых фрагментов исходной ДНК, а также подтвердил отсутствие продуктов амплификации фрагментов ДНК, с которыми при проведении ПЦР-РВ не произошло накопления флуоресцентного сигнала. В образцах с сомнительным результатом амплификации проведенной ПЦР-РВ было выявлено следующее: электрофорез показал наличие продуктов амплификации для

извлеченного из эритроцитарной взвеси фрагмента ДНК, который кодирует L1 ДНК ВПЧ, и показал отсутствие продуктов амплификации для извлеченного из эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, фрагмента ДНК, который кодирует участок  $\beta$ -глобина генома.

С помощью электрофореза установлено, что продукты ПЦР-РВ имеют размеры от 50 пн до 200 пн. Этот размер соответствует рекомендуемым размерам ампликонов для получения последовательных и надежных результатов ПЦР-РВ [307].

Таким образом, у пациентки с впервые выявленным РШМ в эритроцитарной взвеси не наблюдалось безусловного отсутствия продуктов амплификации с праймерами для ДНК L1 ВПЧ и подтвердилось наличие генов  $\beta$ -глобина генома человека. Так как в эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, присутствие продуктов амплификации изучаемых генов исходной ДНК не было подтверждено, можно предположить, что циркулирующая ДНК, которая может быть маркером РШМ, прикреплена к поверхности эритроцитов с помощью рецепторов.

Возможность прикрепления ДНК, в том числе опухолевой ДНК, к поверхности эритроцитов была обсуждена выше. Однако в этом эксперименте ДНК, пусть даже в которой не произошла детекция изучаемых генов, была обнаружена в эритроцитарной взвеси после обработки ее трипсином. Мы упомянули в самом начале раздела, что ДНК была выявлена в этом образце в достаточной концентрации, и это будет являться предметом обсуждения для продолжения исследования. Вероятно, обнаружение ДНК в эритроцитарной взвеси после обработки ее трипсином связано с неспецифическим связыванием ДНК с поверхностью эритроцитов. Во всяком случае, на примере ядерных клеток в исследовании Д.Н. Беляева показана адсорбция фаговой и плазмидной ДНК к мышинным фибробластам и клеткам миеломы, при этом дополнительная предобработка клеток трипсином не влияла на эффективность адсорбции ДНК [50].

Начальная экспериментальная работа действительно дает основание для дальнейших исследований. Выявление фрагментов циркулирующей ДНК в безъядерных фракциях крови с использованием метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР-РВ) демонстрирует многообещающие результаты. Если такие исследования успешно продолжатся и подтвердят свою эффективность, это может привести к созданию недорогого и легко воспроизводимого молекулярно-генетического теста для раннего обнаружения РШМ.

Таким образом, методом ПЦР-РВ показано, что в эритроцитарной взвеси присутствуют фрагменты ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ НРС, которые могут быть связаны с НРС, которые были обнаружены на поверхности эритроцитов методом СЭМ.

Дальнейшие исследования в этом направлении могут принести огромную пользу как на уровне клинической практики, так и в области общественного здравоохранения. Разработка доступного теста может сделать его широко доступным для женщин, что в свою очередь может значительно снизить смертность от этого вида рака.

Проведенное исследование имеет ограничения, т.е. не исключены технические ошибки. Технические ошибки могут в значительной степени повлиять на достоверность полученных данных, что делает актуальным предложение о расширении выборки. Увеличение количества пациенток, включая как женщин с раком шейки матки (РШМ), так и тех, кто имеет преинвазивные неоплазии, а также здоровых пациенток, позволит более точно оценить диагностическую ценность выявленных маркеров.

Использование дополнительных праймеров для выделения ДНК ВПЧ и ДНК человека — ещё один ключевой аспект, который может значительно повысить чувствительность метода. Это необходимость вызвана тем, что каждый тип или штамм ВПЧ может иметь свои специфические последовательности, и различные праймеры могут лучше подходить для их обнаружения. Кроме того, это позволит исследовать не только наличие, но и количественные соотношения циркулирующей ДНК, что поможет в дальнейшей оценке стадии заболевания и прогноза.

#### **4.5. Исследование состава наноразмерных структур на поверхности эритроцитов методом иммунофлуоресцентного анализа**

В данном параграфе представлены результаты идентификация НРС на поверхности эритроцитов методом иммунофлуоресцентного анализа [308].

Для подтверждения предположения, что НРС, наблюдаемые на поверхности эритроцитов могут быть вирусными частицами, необходимы исследования природы и состава НРС эритроцитов с помощью биохимических методов (иммунофлуоресцентный анализ (МФА)). Задача данной работы заключается в исследовании НРС, локализованных на мембране эритроцита – предположительно ВПЧ 16, 18 типов, до и после проведения ЛТ, у пациентов с РШМ и РМЖ. Результаты подобного исследования,

в дальнейшем позволят оценить иммунологическую роль эритроцитов при развитии заболевания.

Несмотря на внедрение современных комплексных мер и профилактических программ в борьбе с РШМ, а также на разработку эффективных методов ранней диагностики и высокотехнологичных терапевтических подходов, ожидается дальнейший рост заболеваемости этой патологии. К тому же, все чаще фиксируются случаи рецидивов заболевания даже после радикальных методов лечения, включая лучевую терапию на ранних стадиях. Это обстоятельство, наряду с проблемой метастазирования, значительно усложняет лечебный процесс и влияет на выживаемость пациентов [309-315].

Исследования, которые позволят более детально изучить механизмы возникновения и развития заболевания на молекулярном и клеточном уровнях, помогут не только улучшить эффективность лечения, но и выявить основные причины возникновения рецидивов, что в свою очередь может привести к разработке новых терапевтических подходов и стратегий профилактики.

Предполагается, что НРС, локализованные на поверхности эритроцитов до, во время и после лечения, могут представлять собой вирусы и везикулы [247]. С точки зрения терминологии, внеклеточные везикулы (с размерами от 30 до 2000 нм) делят: на микровезикулы (или микрочастицы, или эктосомы), которые образуются в результате выпячивания плазматической мембраны от внешней стороны клеток; экзосомы, формирующиеся при высвобождении мультивезикулярных тел за счет отделения участков плазматической мембраны во внутреннюю часть клетки; апоптотические тела, которые выделяются в результате апоптоза клеток.

Отмечено, что различные экстремальные стрессовые воздействия существенно влияют на выраженность, локализацию и структуру везикул, которые секретируются клетками [316]. Внеклеточные везикулы представляют собой разнообразные липидные НРС, которые высвобождаются разными типами клеток как в нормальных, так и в патологических состояниях [317]. Экзосомы играют важную роль в процессах клеточной коммуникации [318] и были обнаружены во всех биологических жидкостях человека, таких как кровь [203], слюна [318], слезы [319] и т.д. Эти частицы достаточно малы и стабильны для проникновения в из различных тканей в биологические жидкости и клетки мишени.

С использованием методов АСМ, СЭМ и метода наноплазмонного обнаружения были обнаружены и количественно определены интактные вирусы иммунодефицита человека, не повреждая структуру и характеристики вирусов, включая их капсидную структуру [320]. В исследовании безопасности переливания доноров крови, их конкретных реципиентов и лиц, получавших компоненты крови и препараты для лечения гемофилии, были проведены исследования вероятности передачи вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши при переливании крови. Образцы сыворотки крови были протестированы методом иммунофлуоресцентного анализа на наличие антител к ядерному антигену, специфичный к клеткам, латентно инфицированным вирусом, однако передачи вирусной инфекции не было обнаружено, вероятно из-за низкой чувствительности использованного метода [321].

Известно, что вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ), который связывается с рецептором CR2 (комплементарный рецептор 2) на эритроцитах. ВЭБ известен тем, что он вызывает инфекционный мононуклеоз и связан с некоторыми видами рака, такими как лимфома Беркитта и назофарингеальный карцинома [322, 323]. Связывание ВЭБ с рецептором CR2 на эритроцитах может привести к нескольким последствиям. Во-первых, это может помочь вирусу распространиться по организму. Эритроциты, или красные кровяные клетки, обычно распространяются по всему организму через кровоток. Если вирус связывается с эритроцитами, он может использовать их как транспортное средство для перемещения по организму. Во-вторых, это может помочь вирусу уклониться от иммунной системы. Иммунная система обычно обнаруживает и уничтожает вирусы, но если вирус связывается с эритроцитами, он может быть защищен от атаки иммунной системы [324]. В-третьих, связывание ВЭБ с CR2 может способствовать развитию некоторых видов рака [325], таких как лимфома Беркитта, назофарингеальный рак, некоторые типы лимфомы, включая лимфомы Ходжкина и некоторые виды неходжкинских лимфом, рак желудка, лейкемия.

Важно отметить, что эти последствия зависят от многих факторов, включая общее состояние здоровья человека, его иммунную систему и другие факторы. Кроме того, не все люди, инфицированные ВЭБ, развивают рак или другие серьезные заболевания.

Обнаружение этих вирусов по-прежнему представляет собой значительные биологические и инженерные проблемы. Биологические проблемы возникают из-за присутствия множества подтипов вирусов, что затрудняет достижение повторяемой и

надежной эффективности их обнаружения из клинических образцов без необходимости длительных этапов подготовки.

В данном исследовании были использованы образцы венозной крови 24 пациентов Радиотерапевтического отделения Якутского республиканского онкологического диспансера, в том числе 15 и 9 пациентов с подтвержденными диагнозами РШМ и РМЖ соответственно, проходивших лучевую терапию.

В этом исследовании использовали метод иммунофлуоресцентного анализа.

Принцип работы МФА основан на взаимодействии между антителами, специфическими к антигенам, и меткой, которая обладает свойством флуоресценции (рисунок 4.28). Образец с антигенами или антителами подвергается инкубации с меткой, и затем происходит измерение флуоресцентного сигнала с помощью флуориметра или микроскопа с флуоресцентной системой.

МФА широко применяется в медицине и научных исследованиях для диагностики различных инфекционных, аутоиммунных и опухолевых заболеваний. Он может быть использован для обнаружения антител в крови пациента, таких как антитела к вирусам, бактериям или другим патогенам. Также МФА может использоваться для выявления антигенов, например, в клетках или тканях [326].

Принцип иммунофлуоресцентного анализа основан на специфичности антител для их целевых белков. Эта специфичность помогает селективно метить и визуализировать местоположение и распределение конкретных белков внутри клеток, тканей или других биологических образцов [327].

Рисунок 4.28 демонстрирует основной механизм иммунофлуоресценции. Слева изображена первичная иммунофлуоресценция, которая показывает антитело с присоединенной к нему группой флуорофора, прямо связывающееся с эпитопом антигена, для которого оно специфично. После того как антитело связывается с эпитопом, образец можно рассмотреть под флуоресцентным микроскопом, чтобы подтвердить наличие антигена в образце. С другой стороны, справа изображена вторичная иммунофлуоресценция, которая показывает, что сначала непомеченное первичное антитело связывается с эпитопом антигена в механизме, аналогичном описанному выше. Однако после того, как первичные антитела связались с целью, появляется вторичное антитело (с помеченным флуорофором).

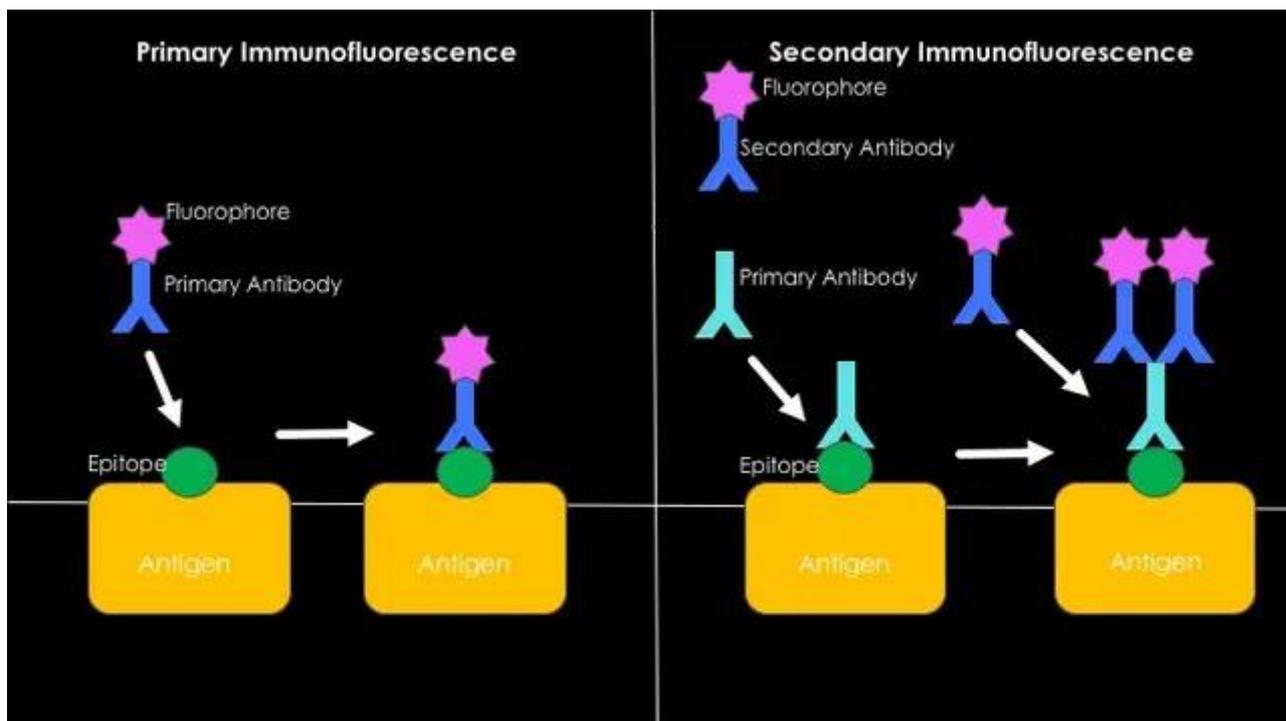


Рисунок 4.28. Основной механизм иммунофлуоресценции (ист.: Wikimedia, Westhayl618).

Связывающиеся участки этого вторичного антитела специфичны для первичного антитела, который уже связан с антигеном, и поэтому вторичное антитело связывается с первичным антителом. Этот метод позволяет большему количеству антител, помеченных флуорофором, присоединиться к своей цели, увеличивая таким образом флуоресцентный сигнал при микроскопии.

Иммунофлуоресцентная микроскопия может быть полезна в клинической диагностике для обнаружения специфических антигенов или маркеров, связанных с различными заболеваниями [328].

Основными компонентами техники иммунофлуоресцентной микроскопии являются антитела и флуоресцентные метки. Антитела — это белки, которые производит иммунная система и специфически связываются с антигенами. Иммунная система распознает антигены как чужеродные. В иммунофлуоресцентном анализе конкретные антитела направлены и присоединяются к белку или антигену интереса в биологическом образце. Флуорофоры, или флуоресцентные метки, прикрепляются к антителам. Эти метки излучают флуоресцентный свет при воздействии определенных длин волн света. Каждый флуорофор излучает свет на уникальной длине волны, что помогает идентифицировать и различать различные цели в образце [327].

В исследовании используется косвенный иммунофлуоресцентный анализ. Сначала применяется первичное антитело, специфичное для целевого антигена. Затем используется вторичное антитело, помеченное флуоресцентным красителем, специфичным для первичного антитела. Этот дополнительный этап делает процесс более чувствительным.

Для исследования поверхности эритроцитов методом СЭМ и МФА были подготовлены образцы венозной крови 18 пациентов с РШМ и 9 пациентов РМЖ в виде тонких слоев, равномерно нанесенных на сухое обезжиренное предметное стекло, которые высушивались в условиях комнатной температуры.

Для обнаружения НРС на поверхности эритроцитов методом МФА был разработан специальный протокол пробоподготовки эритроцитарной массы крови пациентов с диагнозами РШМ и РМЖ.

Для проведения эксперимента были использованы следующие растворы и антитела: 1) растворы: раствор 10xPBS (фосфатно-солевой буфер, который используется для промывки и диспергирования клеток, а также для поддержания pH и осмотического давления при проведении биологических экспериментов) по заданному протоколу: в 800 мл дистиллированной воде добавляли 80 г NaCl, 2 г KCl, 2,4 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 14,4 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1xPBS от ранее приготовленного 10xPBS соотношением 1:9; раствор FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting буфер - это раствор, используемый для обработки и анализа клеток при использовании методов цитофлуориметрии и сортировки клеток по флуоресценции) : на 245 мл 1xPBS добавляли 5 мл 2% FBS; раствор параформальдегида (PFA 1%) (фиксирует клетки крови, вызывая ковалентные поперечные связи между молекулами, эффективно склеивая их в нерастворимую сетку) : порошок параформальдегида растворяли в 1xPBS и нагревали до температуры 60°C, чтобы он полностью растворился, затем добавили немного NaOH и нейтрализовали его с помощью HCl до 7,0 pH, далее фильтровали; глутаровый эльдирид для фиксации клеток крови; 2) антитела: первичные антитела – Ms Anti-Papilloma virus antibodies — это моноклональные или поликлональные антитела, специфически направленные против папилломавирусов белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 MAB837 (Sigma-Aldrich); первичные антитела ARG56108 ARIGO— это продукт, содержащий 50 микрограмм антитела против белка HPV16 L1 с идентификатором CamVir-1; вторичные антитела Goat Anti-Mouse IgG Antibody представлены козьими поликлональными антителами против H и L цепей мышиных

иммуноглобулинов, конъюгированными с флуоресцеином (FITC) (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI)

*Пробоподготовка.* В ходе исследования были разработаны два вида протокола пробоподготовки (№1 и №2) в целях сохранности адсорбированных НРС на поверхности эритроцитов во время выделения из крови эритроцитарной массы.

*Протокол №1.* Образцы крови, собранные в пробирки содержащие ЭДТА, центрифугировали в течение 5 минут при 600g, затем сливали супернатант, а осадок помещали в 15 мл центрифужную пробирку для дальнейшей промывки фосфатным буфером (PBS). Стоит отметить, что мы старались брать в основном центральную часть осадка, не касаясь верхней границы фаз и дна пробирки, где концентрируются различные ядродержащие клетки и другие элементы крови.

После переноса эритроцитарной фракции общий объем суспензии доводился до 10 мл при помощи PBS, после чего образцы центрифугировали в течение 5 минут при 600g. Процедуру промывки фосфатным буфером повторяли 3-4 раза.

Клетки фиксировали 1% раствором параформальдегида (PFA) в PBS. Для этого к отмытому осадку добавляли фиксирующий раствор, доводя общий объем до 10 мл и далее аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки несколько раз и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре.

Фиксирующий раствор удаляли центрифугированием при тех же условиях, а осадок промывали 2 раза раствором FACS (2% телячьей сыворотки в PBS). На этом этапе образцы были готовы к иммунофлуоресцентному анализу.

*Иммунофлуоресцентный анализ.* Данный метод широко используется в современной клеточной и молекулярной биологии и достаточно подробно описан во многих работах. В нашем случае суспензия фиксированного образца была разбавлена при помощи FACS раствора в соотношении 1:3 (250:750 мкл соответственно). 100 мкл разбавленного образца переносили в чистую пробирку типа эппендорф и аккуратно добавляли 1 мкл первичных антител с последующей инкубации в течение ночи при +4°C. В качестве первичных антител были использованы мышинные моноклональные антитела против белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 MAB837 (Sigma-Aldrich).

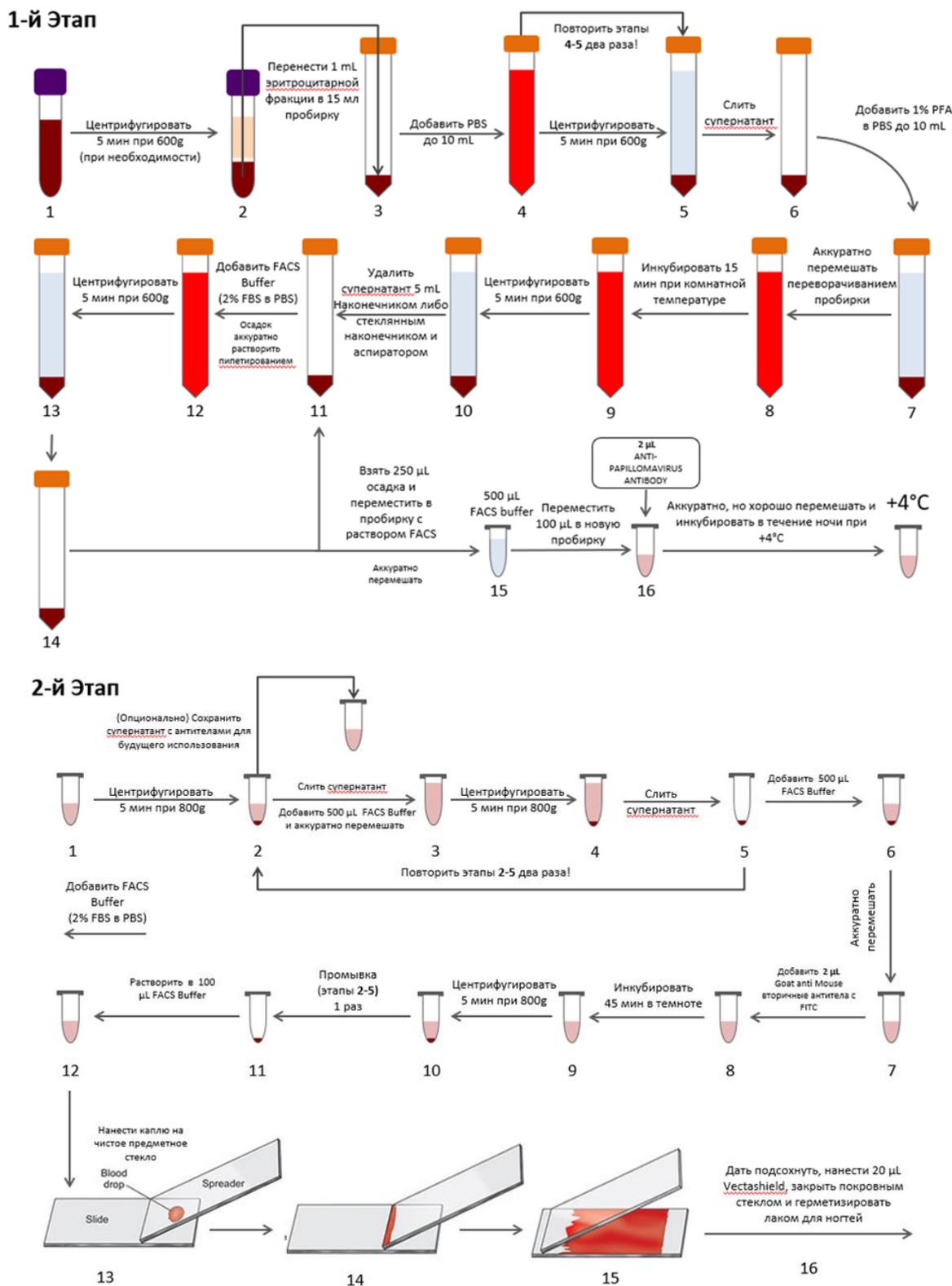


Рисунок 4.29. 1 и 2 этапы протокола пробоподготовки №1 для МФА.

После инкубации образец центрифугировали в течение 5 минут при 800g, сливали супернатант и промывали 3 раза раствором FACS, после промывки к образцу, растворенному в 500 мкл раствора FACS добавляли 2 мкл вторичных антител, которые были представлены козыми поликлональными антителами против H и L цепей мышинных

иммуноглобулинов, конъюгированными с флуоресцеином (FITC) (Stemcell Technologies, кат. # 60138FI). Сухие мазки были подготовлены после часовой инкубации образцов с антителами и визуализированы при помощи микроскопа AxioVert.A1 (Zeiss) с флуоресцентным фильтром FITC.

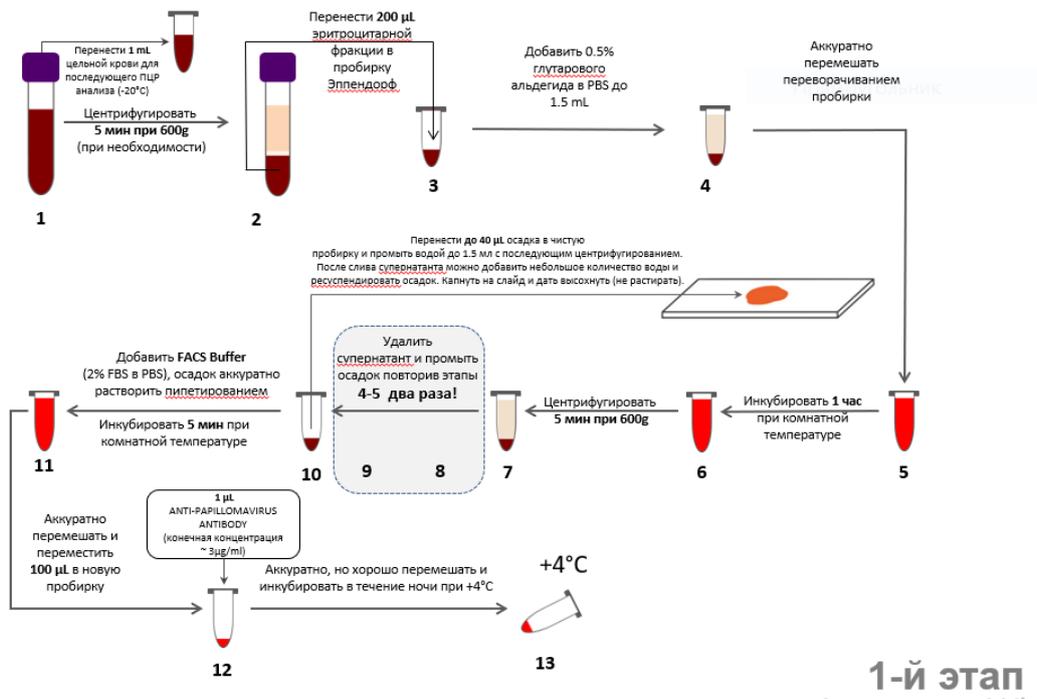
На рисунке 4.29 представлены этапы протоколов пробоподготовки первой и второй версии с двумя этапами для каждой.

Первая версия протокола пробоподготовки (были исследованы образцы крови 11 пациентов с диагнозом РШМ).

В ходе проведения исследования был изменен протокол пробоподготовки (рисунок 4.30): 1) фиксация образцов стала проводиться без промывки, чтобы исключить смыв вирусных частиц на эритроцитах; 2) использовали глутаровый альдегид вместо PFA. Кроме того, во второй версии использовали другие антитела (ARG56108 Package: 50 µg anti-HPV16 L1 antibody [CamVir-1]) и систему визуализации (Logos Celena S).

С помощью протокола пробоподготовки №2 были исследованы образцы крови 13 пациентов с диагнозом РШМ (4 пациента) и РМЖ (9 пациентов).

В данной работе использовали СЭМ для получения изображения поверхности эритроцитов крови пациентов с РШМ и РМЖ для подтверждения наличия на них НРС на поверхности эритроцитов до и после ЛТ. Для этого готовились сухие мазки венозной крови, полученные у пациентов до проведения пробоподготовки для исследований методом МФА. Мазки исследовали при ускоряющем напряжении 1,3 кВ и фокусном расстоянии 4,0 мм.



1-й этап

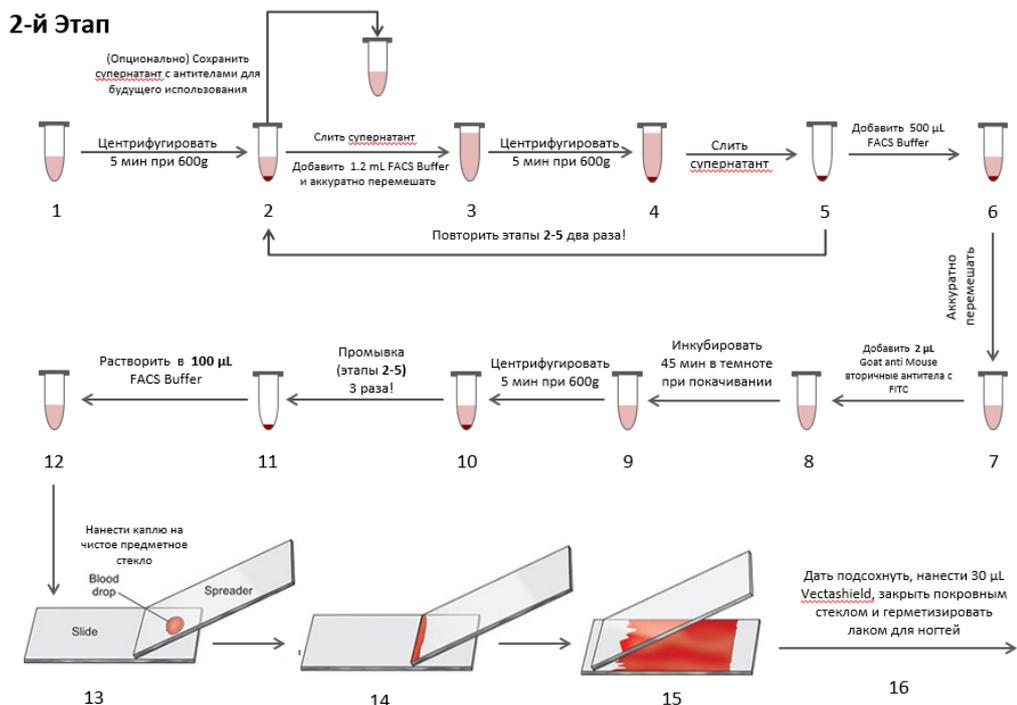
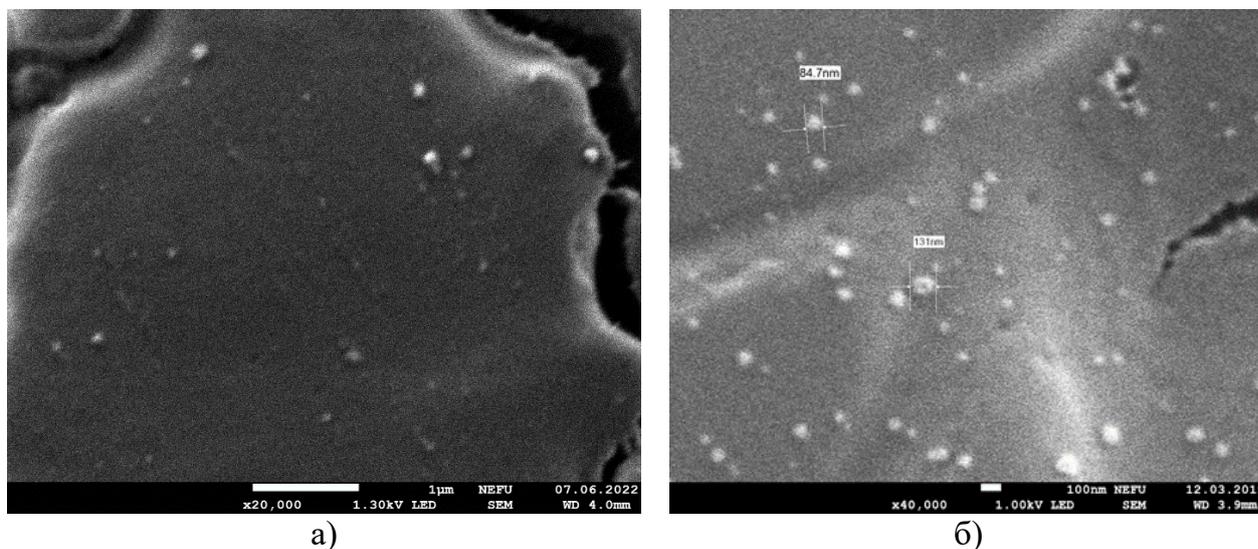


Рисунок 4.30. Схема протокола пробоподготовки №2 для проведения МФА.

В данной работе, параллельно были проведены исследования одних и тех же образцов цельной венозной крови пациентов с РШМ и РМЖ разными методами: 1) исследование морфологии эритроцитов сухих мазков методом СЭМ; 2) исследование эритроцитов методом МФА.

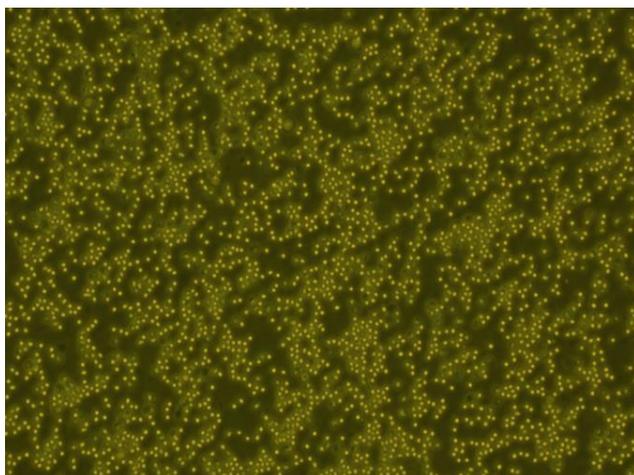
На рисунке 4.31 представлены СЭМ изображения поверхности эритроцитов сухого мазка крови пациентки с РШМ. На эритроцитах выявлены НРС, размеры которых сопоставимы с размерами ВПЧ 16,18 типов.



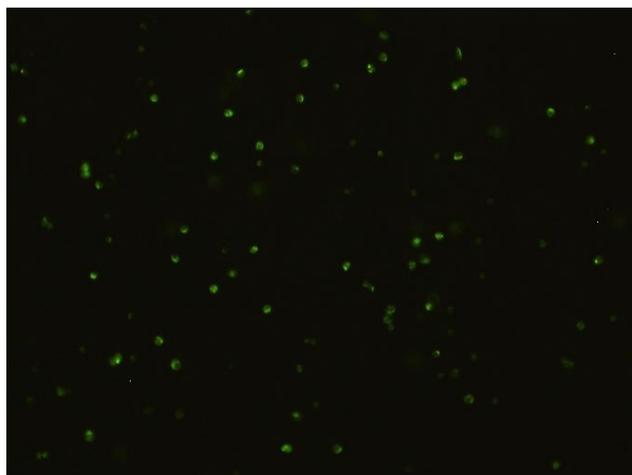
а) б)  
Рисунок 4.31. СЭМ-изображение поверхности эритроцита: а) при 20.000х; б) при 40.000х.

На рисунках 4.32 и 4.33 представлены изображения эритроцитов образцов крови – эритроцитарной массы крови, полученной на основе разработанного нами нового описанного выше протокола пробоподготовки №1 пациентов с РШМ, до лучевой терапии. Эти изображения получены с помощью флуоресцентного микроскопа при различных увеличениях и условиях проведения микрофотографирования: с фазовым контрастом и при флуоресцентном режиме. На изображениях видны светящиеся эритроциты, тем самым подтверждаются предположения, что наблюдаемые на СЭМ изображениях НРС могут являться вирусными частицами.

Для обнаружения ядросодержащих клеток образцы также были окрашены красителем Hoechst 33342, однако не было обнаружено светящихся ядер в ультрафиолетовом спектре, что также свидетельствует о том, что обнаруженные нами светящиеся элементы являются эритроцитами.

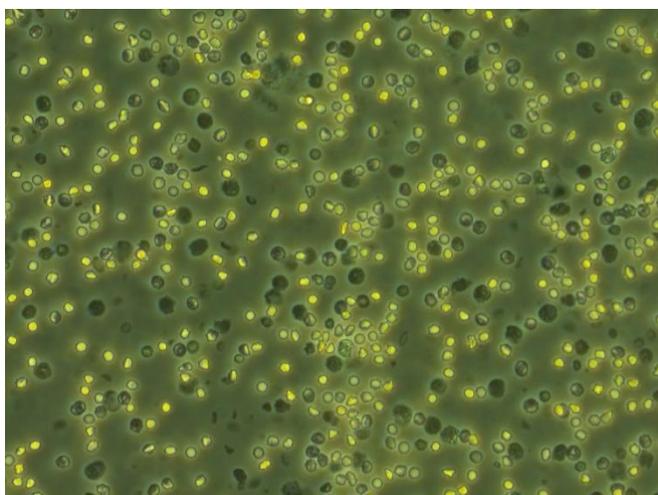


а)

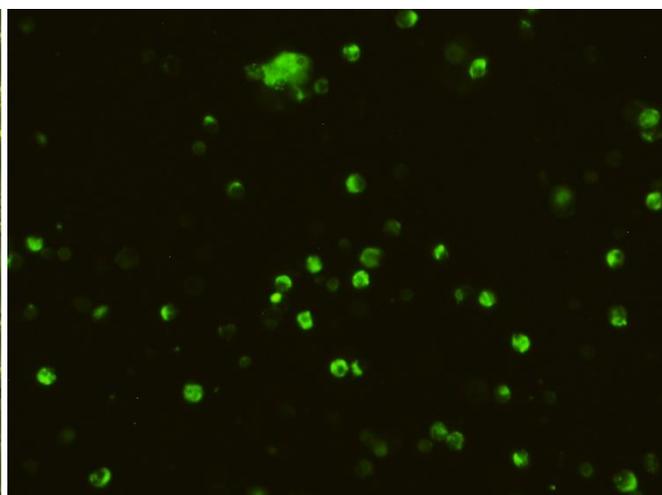


б)

Рисунок 4.32 Изображения эритроцитов пациента с РШМ (200х), полученные по протоколу №1: а) фазовый контраст; б) флуоресцентный режим.



а)



б)

Рисунок 4.33. Изображения эритроцитов пациента с РШМ (400х), полученные по протоколу №1: а) фазовый контраст; б) флуоресцентный режим.

Кроме того, было выявлено, что наблюдается наличие светящихся эритроцитов в образцах пациентов и до, и после ЛТ, т.е. эти частицы были и до проведения ЛТ и никак не связаны с воздействием ионизирующего излучения.

В обсуждениях, которые явились основополагающими для данного исследования, о необходимости дифференцировки НРС на поверхности эритроцитов (определения отличия НРС как везикул и вирусов, которые наблюдаются на поверхности эритроцитов в виде НРС) не хватало достаточных результатов исследований в пользу определения НРС на поверхности эритроцитов как вирусов. И результаты данного исследования являются тем самым необходимым звеном в определении этих НРС как вирусов.

Кроме того, группой исследователей было показано, что поверхностные рецепторы и лиганды экзосом ответственны за распределение и прикрепление экзосом к клеткам

мишеням и внеклеточному матриксу [329, 330]. Как следствие, экзосомы циркулирующие в крови и прикрепляемые к форменным элементам крови не подвергаются немедленному слиянию с клеткой, а остаются на какое-то время экзосомами, прикрепленными на поверхности клетки. Роль циркулирующих экзосом прикрепленных к поверхности эритроцитов в распространении опухоли остается неясной, однако, убедительные доказательства были получены о том, что РНК и белки входящие в состав таких частиц могут играть важную роль в диагностике раковых заболеваний [329, 203].

Размеры вириона ВПЧ составляют около 55 нм. Такие размеры были определены для НРС на поверхности эритроцитов методом СЭМ. Факт того, что НРС сходных размеров могут быть обнаружены в крови [10] и то, что в крови были обнаружены участки ДНК РШМ [203] может свидетельствовать о том, что часть из этих везикул могут являться вирусами.

Также, в последнее время были получены существенные доказательства, свидетельствующие о том, что ВПЧ может играть определенную роль в развитии рака молочной железы (РМЖ). Однако данные, связывающие РМЖ с хронической ВПЧ-инфекцией, были противоречивыми, что привело к отсутствию консенсуса [330].

Поэтому в данной работе также исследовали эритроциты крови пациентов с РМЖ, используя разработанные нами методы исследования эритроцитов для РШМ.

На рисунке 4.34 показаны примеры изображений флуоресценции эритроцитов образцов крови, подготовленных по протоколу №2, пациентов с диагнозом РМЖ до и после проведения ЛТ, что свидетельствует о наличии ВПЧ 16 типа на их поверхности.

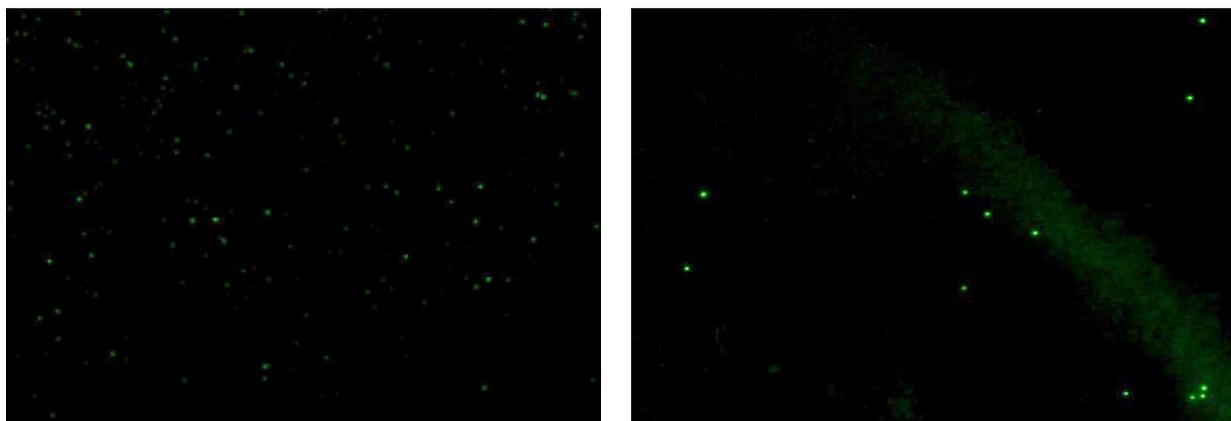


Рисунок 4.34. Изображения эритроцитов эритроцитарной массы пациента с РМЖ при флуоресцентном режиме, полученные по протоколу №2: а) до лучевой терапии; б) во время лучевой терапии.

По результатам этого исследования показано, что ЛТ не влияет на присутствие НРС на поверхности эритроцитов.

В результате комплексного подхода и совместного использования методов иммунофлуоресцентного анализа и электронной микроскопии подтверждена гипотеза о вирусной природе НРС, локализованных на поверхности эритроцита у пациентов с РШМ. С помощью данной методики установлено, что на цитоплазматической мембране эритроцитов находятся частицы ВПЧ 16 и 18 типов. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что вирусы циркулируют в крови пациента, абсорбируют на поверхности эритроцитов и это влияет на этиологию и развитие некоторых вирусных заболеваний, в первую очередь онкологических заболеваний и их рецидивов.

Данная методика также может быть использована в исследовании и диагностике других видов заболеваний, в том числе РМЖ. Кроме того, на основе данного и последующего исследований может быть выявлена роль эритроцитов в возникновении различных видов онкологических заболеваний, в том числе РШМ и РМЖ.

#### **Выводы к Главе 4**

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

## ГЛАВА 5. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ЭЛЕКТРОННЫХ ПУЧКОВ СКАНИРУЮЩИХ МИКРОСКОПОВ И ФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ, НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР

В пятой главе представлены математические модели биофизических свойств эритроцитов с учетом экспериментальных исследований, представленных в третьей и четвертой главах. А также построены математические модели эмиссионных характеристик полевых и термополевых электронных катодов, которые являются источниками электронных пучков в СЭМ.

В настоящее время интенсивно развивается применение электронных микроскопов в медицине, в том числе СЭМ, разработанных для исследования огромного количества проблем в различных областях с широким диапазоном ускоряющих электроны напряжений, энергии электронных пучков. Но, возможно, разработка СЭМ с определёнными эмиссионными характеристиками, с диапазоном более низких энергий пучков для исследования биообразцов, является актуальной задачей, т.к. модификация СЭМ для решения задач, например, в медицине позволило бы получать более качественные изображения биообразцов в диагностике и наблюдении эффективности терапии. 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.

В связи с этим одной из задач данной работы было определение размера и формы пучка, основных эмиссионных характеристик полевого электронного катода (ПЭК) СЭМ, находящегося под воздействием возбуждающего электронную эмиссию электрического поля и внешнего продольного магнитного поля путем исследования движения крайнего электрона пучка с учетом влияния пространственного заряда электронов пучка, внешнего магнитного поля.

Также на основе данной математической модели представлены модели для полевых и термополевых катодов, аппроксимированных эллипсоидом вращения. В случае термополевых катодов вместо уравнения ФН используется уравнение Ричардсона-Дэшмана  $j_0 = (1 - \bar{R})A_0T^2 \exp\left(-\frac{\phi - e\sqrt{eE_0}}{kT}\right)$  с учетом эффекта Шоттки с пренебрежением величины  $\bar{R}$  — коэффициент отталкивания электронов от потенциального барьера:

$$j_0 = A_0T^2 \exp\left(-\frac{\phi - e\sqrt{eE_0}}{kT}\right),$$

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),  $A_0 = \frac{4\pi m e k^2}{h^3} = 120.4 \frac{A}{\text{см}^2 \text{К}^2}$  — 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,  $\varphi$  — работа выхода электронов.

В этой же главе представлены математические модели биофизических свойств эритроцитов в норме и патологии. В физико-математической модели для исследования динамики эритроцитов крови в патологии, для решения задачи определения зарядов предполагаемых вирусов допускается, что вблизи поверхности эритроцита значение электрического поля поверхностного заряда измененного эритроцита, аппроксимированного эллипсоидом с другими параметрами  $a_{\text{пат}}, b_{\text{пат}}, c_{\text{пат}}$  при паталогическом состоянии, 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.

Кроме того, представлена модель динамики эритроцитов крови под воздействием внешнего электрического поля.

В данной серии численных экспериментов исследовали механизм движения эритроцита в буферной жидкости при воздействии внешнего электрического поля с учетом сопротивления жидкости.

### **5.1. Математическое моделирование электронного пучка сканирующего электронного микроскопа**

Результаты, полученные при исследовании морфологии образцов крови пациентов с РШМ, с заболеваниями почек с применением СЭМ, АСМ показали, что существует проблемы, связанные со свойствами, характеристикой эритроцитов, а также идентификацией НРС на поверхности эритроцитов, требующих применения методов математического моделирования:

- проблема улучшения качества изображения эритроцитов, получаемых с помощью СЭМ, для определения изменения морфологии эритроцитов при различных патологиях;

- проблема определения электрических свойств эритроцитов при различных патологиях;
- проблема определения природы и роли НРС, обнаруженных на поверхности эритроцитов.

*Математическое моделирование основных эмиссионных характеристик полевого и термополевого электронных катодов сканирующих электронных микроскопов при исследовании биообразцов*

В настоящее время использование электронно-оптических систем на основе ТПЭК и ПЭК является наиболее перспективным в исследованиях поверхности, морфологии биообразцов для диагностики и терапии заболеваний. Так СЭМ находит все большее применение в исследованиях причин возникновения заболеваний и молекулярно-клеточных механизмов развития патологии [167,331]. Например, в исследованиях морфологии эритроцитов крови пациентов с РШМ методом СЭМ на поверхности эритроцитов сухих мазков крови были обнаружены НРС, идентификация которых позволила бы внести вклад в решении проблемы определения причин возникновения рецидивов РШМ и явления метастазирования, а также в разработке методов ранней диагностики [159]. Идентификация НРС с помощью СЭМ требует улучшения качества изображения, которого можно было бы добиться при получении электронных пучков СЭМ с характеристиками, подходящими для исследования морфологии биологических образцов. Для этого необходимо разработать математические модели электронных устройств на основе катодов и систем управления электронным пучком с различными вольт-амперными характеристиками катода в зависимости от параметров электрического поля и электромагнитных линз с учетом формы и размеров инжекторов, пространственного заряда электронного пучка.

В данном параграфе производится расчет эмиссионных характеристик ПЭК и ТПЭК на основе результатов численных экспериментов, проводимых на основе математических моделей их основных эмиссионных характеристик.

В качестве систем инжекции чаще всего используется диодная структура, которая состоит из источника заряженных частиц (катод) и объекта воздействия (анод). Такая система представляет собой простейший электростатический ускоритель, в котором за счет приложения разности потенциалов между катодом и анодом получается поток

частиц с необходимой энергией. В СЭМ электронные пучки фокусируются магнитным полем для снижения абберации пучка. В качестве фокусирующей системы используются электромагнитные линзы, представляющие собой проволочные катушки.

В данной задаче электронной оптики для расчета эмиссионных характеристик ПЭК [332] и ТПЭК форма поверхности эмиттеров аппроксимируется поверхностями второго порядка: эллипсоидом вращения, а анод — частью эквипотенциальной поверхности. При построении физических и математических моделей полевого и термополевого диодов учитываются влияния на характеристики диодов пространственного заряда пучка. В этих моделях учитывается и влияние внешнего магнитного поля, которое управляет электронным пучком и фокусирует его. В представляемых моделях электрическое поле играет двойную роль: во-первых, в обоих случаях ускоряет электроны; во-вторых, в случае ТПЭК уменьшает работу выхода электронов, а в случае ПЭК вызывает эмиссию электронов с поверхности катода. Для моделирования также вводится понятие «крайнего» электрона, траектория движения которого определяет форму и размер пучка.

### **5.1.1. Математическое моделирование основных эмиссионных характеристик термополевого электронного катода сканирующего электронного микроскопа**

В СЭМ часто используются ТПЭК из вольфрама, которую прогревают до 1800 К. Инжекторы СЭМ — ТПЭК имеют диаметры примерно 1 мкм и эмитируют пучки заряженных частиц с энергией от 100 эВ до 30 кэВ с плотностями тока не меньше, чем  $10^6 - 10^8 \text{ А/м}^2$ . Известно, что для исследования поверхности биообразцов требуются пучки заряженных частиц с энергией от 100 эВ до 30 кэВ с плотностями тока не меньше чем  $10^6 - 10^8 \text{ А/м}^2$ . Такие характеристики свойственны для пучков заряженных частиц, эмитированных из термополевых электронных источников — ТПЭК.

В СЭМ электронные пучки фокусируются магнитным полем для снижения абберации пучка. В качестве фокусирующей системы используются электромагнитные линзы, представляющие собой проволочные катушки.

В задачах электронной оптики для расчета эмиссионных характеристик (распределения потенциала, напряженности электрического поля, плотности заряда вблизи поверхности катода) форма поверхности эмиттера обычно аппроксимируется поверхностями второго порядка — сферой, эллипсоидом вращения, параболоидом

вращения. В термополево́м диоде за катод принимают поверхность второго порядка, а за анод — часть эквипотенциальной поверхности.

При построении физической и математической моделей термополевого диода с высокоэнергетическими электронным пучком необходимо учитывать влияние на характеристики диода пространственного заряда пучка. Экспериментальные исследования эмиссионных характеристик ТПЭК, находящегося во внешнем магнитном поле, показывают существенное влияние на них магнитного поля. Также внешнее магнитное поле управляет и фокусирует пучок. Поэтому в этих моделях необходимо учитывать и влияние внешнего магнитного поля.

Для определения плотности тока термоэлектронной эмиссии с учётом эффекта Шоттки можно рассмотреть простую модификацию формулы Ричардсона-Дэшмана (РД), подставив в неё вместо работы выхода разность работы выхода и уменьшения работы выхода, зависящей от напряженности накладываемого электрического поля [332]:

$$j_0 = A_0 T^2 (1 - \bar{R}) \exp\left(-\frac{\phi - e\sqrt{eE_0}}{kT}\right).$$

В этой формуле величина  $\bar{R}$  — коэффициент отражения электронов на границе тело-вакуум, которым можно пренебречь при оценочных работах.

В настоящей работе ТПЭК моделируется поверхностью второго порядка с соответствующими криволинейными координатами  $x_1, x_2$ , а анод — эквипотенциальной поверхностью (рисунок 5.1). Предполагается, что термополевая эмиссия электронов (ТПЭЭ) происходит не со всей поверхности ТПЭК, а с некоторой ее части, ограниченной криволинейными координатами  $x_{10}, x_{20}$ . Диод имеет аксиально-симметричную структуру. На рисунке 5.1 ось симметрии диода совпадает с осью Z. Направление внешнего магнитного поля выбираем таким же, как и направление оси симметрии диода, т.е. магнитное поле  $\vec{B}$  является продольным. Таким образом, система является аксиально-симметричной. В представляемой модели рассмотрим первый этап формирования пучка электронов в СЭМ, в котором будем рассматривать воздействие электрического поля на электроны катода, который играет двоякую роль: уменьшает работу выхода электронов с поверхности катода, а также ускоряет их, и будем рассматривать воздействие магнитного поля, который фокусирует пучок.

Чтобы построить математическую модель объекта нашего исследования, вводится понятие «крайнего» электрона. Предполагаем, что пучок имеет четкие границы, и что форма и размер пучка определяются траекторией граничного («крайнего») электрона. На

рисунке 5.1 представлена физическая модель термополевого диода. На ней кривой линией показана траектория крайнего электрона пучка.

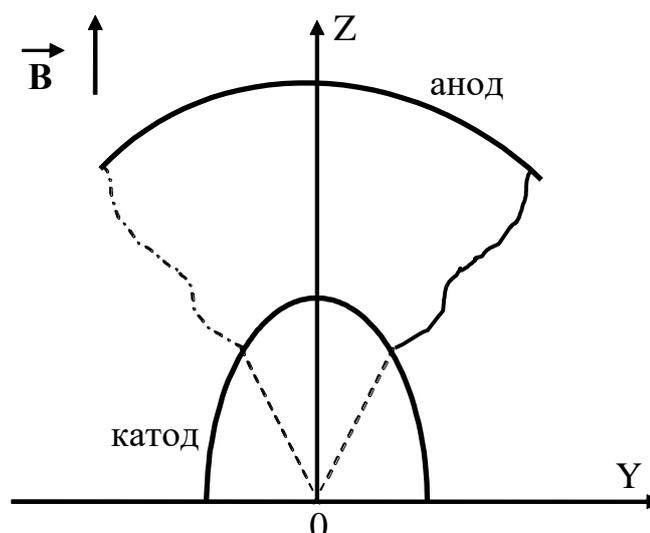


Рисунок 5.1. Термополевой электронный катод.

Так как катод аппроксимирован поверхностью второго порядка, то решение задачи ищется в соответствующих криволинейных координатах.

На основе вышеуказанного допущения задача расчета эмиссионных характеристик вдоль траектории крайнего электрона ТПЭК, находящегося под воздействием возмущающего ТПЭЭ электрического поля  $\vec{E}$  и внешнего продольного магнитного поля  $\vec{B}$ , решается с помощью математической модели 1, включающей следующие уравнения: уравнение движения крайнего электрона вне пучка:

$$m\ddot{\vec{r}}_V = e\vec{E}^V + e[\dot{\vec{r}}_V, \vec{B}], \quad (5.1)$$

соответствующие уравнения Максвелла:

$$\begin{aligned} \text{rot}\vec{E}^V &= 0, \\ \text{div}\vec{E}^V &= 0, \end{aligned} \quad (5.2)$$

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

уравнение движения крайнего электрона внутри пучка:

$$m\ddot{\vec{r}} = e\vec{E} + e[\dot{\vec{r}}, \vec{B}]; \quad (5.3)$$

соответствующие уравнения Максвелла:

$$\begin{aligned} \text{rot}\vec{E} &= 0; \\ \text{div}\vec{E} &= \frac{\rho}{\varepsilon_0}; \end{aligned} \quad (5.4)$$

уравнение непрерывности:

$$\operatorname{div} \vec{j} = 0; \quad (5.5)$$

уравнение Ричардсона-Дэшмана с учетом эффекта Шоттки с пренебрежением величины  $\bar{R}$ :

$$j_0 = A_0 T^2 \exp\left(-\frac{\phi - e\sqrt{eE_0}}{kT}\right), \quad (5.6)$$

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;

и условие на границе пучок-вакуум для крайнего электрона:

$$\frac{\dot{x}_1}{\dot{x}_2} = \frac{\dot{x}_1^V}{\dot{x}_2^V}, \quad (5.7)$$

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.

Реализация модели заключается в совместном решении всех этих уравнений системы, в результате которого определяется движение крайнего электрона.

Так как диодная система имеет аксиальную симметрию, то основные эмиссионные характеристики (напряженность электрического поля, плотность заряда, плотность тока) представляем зависимыми только от двух переменных — криволинейных координат  $x_1, x_2$ :

$$\vec{E} = \vec{E}(x_1, x_2), \quad (5.8)$$

$$\rho = \rho(x_1, x_2), \quad (5.9)$$

$$j = j(x_1, x_2). \quad (5.10)$$

### Эллипсоидальный катод в продольном магнитном поле

В настоящей работе ТПЭК моделируется вытянутым эллипсоидом вращения с поверхностной координатой  $\sigma_0$ , анод — эквипотенциальной поверхностью (рисунок 5.1).

Будем считать, что электронная эмиссия происходит с ограниченного участка, которому соответствует эллипсоидальная координата  $\tau_0$ , определяемая из условия, что угол расходимости в начале пучка  $\theta_0 = 45^\circ$ . Будем считать, что потенциал на катоде равен нулю.

На рисунке 5.1 показана физическая модель полевого эллипсоидального диода. На этом рисунке кривой линией представлена граница пучка — траектория крайнего электрона пучка.

Задача расчета эмиссионных характеристик, динамики электронного пучка вытянутого эллипсоидального полевого эмиссионного катода, находящегося под воздействием возмущающего ТПЭЭ электрического поля  $\vec{E}$  и внешнего продольного магнитного поля  $\vec{B}$ , с учетом пространственного заряда решается с помощью математической модели 1.

#### *Исходные уравнения и результаты численного эксперимента*

Так как катод моделируем с помощью вытянутого эллипсоида вращения, а анод — эквипотенциальной поверхностью, то расчет будем производить в эллипсоидальной системе координат:

$$\begin{aligned}x^2 &= a^2(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2) \cos^2 \phi, \\y^2 &= a^2(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2) \sin^2 \phi, \\z &= a\sigma\tau.\end{aligned}\tag{5.1.1}$$

В этой системе метрический тензор имеет диагональные составляющие:

$$\begin{aligned}g_{\sigma\sigma} &= a^2 \frac{\sigma^2 - \tau^2}{\sigma^2 - 1}, \\g_{\tau\tau} &= a^2 \frac{\sigma^2 - \tau^2}{1 - \tau^2}, \\g_{\phi\phi} &= a^2(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2).\end{aligned}\tag{5.1.2}$$

Представим системы вне и внутри пучка в удобном для расчетов виде. Рассмотрим систему вне пучка. Известно, что базисные вектора любой ортогональной системы связаны с базисными векторами декартовой системы координат следующим образом:

$$\vec{e}_i = \frac{1}{\sqrt{g_{ii}}} \left( \frac{\partial x}{\partial x^i} \vec{e}_x + \frac{\partial y}{\partial x^i} \vec{e}_y + \frac{\partial z}{\partial x^i} \vec{e}_z \right).$$

Тогда для эллипсоидальной системы координат:

$$\begin{aligned}\vec{e}_\sigma &= -\frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_x - \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_y + \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_z, \vec{e}_\tau = -\frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \cos \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_x - \\ &\quad \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \sin \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_y + \frac{(1-\tau^2)^{1/2} \sigma}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_z, \\ \vec{e}_\phi &= -\sin \phi \cdot \vec{e}_x + \cos \phi \cdot \vec{e}_y,\end{aligned}\tag{5.1.3}$$

и

$$\begin{aligned}\vec{e}_x &= \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\sigma - \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \cos \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\tau - \sin \phi \cdot \vec{e}_\phi, \\ \vec{e}_y &= \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\sigma - \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \sin \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\tau + \cos \phi \cdot \vec{e}_\phi, \\ \vec{e}_z &= \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\sigma + \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2}}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\tau.\end{aligned}\tag{5.1.4}$$

Радиус-вектор точки  $\vec{r}$ :

$$\begin{aligned}\vec{r} &= x\vec{e}_x + y\vec{e}_y + z\vec{e}_z = a(\sigma^2-1)^{1/2}(1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi \vec{e}_x + \\ &\quad + a(\sigma^2-1)^{1/2}(1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi \vec{e}_y + a\sigma\tau\vec{e}_z = \\ &= \frac{a\sigma(\sigma^2-1)^{1/2}}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\sigma + \frac{a\tau(1-\tau^2)^{1/2}}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \vec{e}_\tau.\end{aligned}\tag{5.1.5}$$

Запишем первую и вторую производные от радиус-вектора (5.1.5):

$$\begin{aligned}\dot{\vec{r}} &= a\left(\frac{(1-\sigma^2)^{1/2} \sigma \cos \phi}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \dot{\sigma} - \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \dot{\tau} \cos \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \right. \\ &\quad \left. - (\sigma^2-1)^{1/2}(1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi \cdot \dot{\phi}\right) \vec{e}_x + \\ &\quad + a\left(\frac{(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \sin \phi}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \dot{\sigma} - \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \dot{\tau} \sin \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} + \right. \\ &\quad \left. + (\sigma^2-1)^{1/2}(1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi \cdot \dot{\phi}\right) \vec{e}_y + \\ &\quad + a(\dot{\sigma}\tau + \sigma\dot{\tau}) \vec{e}_z.\end{aligned}\tag{5.1.6}$$

Найдем компоненты вектора  $\ddot{\vec{r}}$ :

$$\begin{aligned}\ddot{x} &= \frac{a(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \cos \phi}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \ddot{\sigma} - \frac{2a\sigma\dot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \left( \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \cos \phi \dot{\tau} + (1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi \dot{\phi} \right) - \\ &\quad - a(\sigma^2-1)^{1/2} \left( \frac{\tau \cos \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} \ddot{\tau} - \frac{2\tau \sin \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau} \dot{\phi} + \right. \\ &\quad \left. + \cos \phi (1-\tau^2)^{1/2} \left( \frac{\dot{\sigma}^2}{(\sigma^2-1)^2} + \frac{\dot{\tau}^2}{(1-\tau^2)^2} + \dot{\phi}^2 \right) + (1-\tau^2)^{1/2} \sin \ddot{\phi} \right), \\ \ddot{y} &= \frac{a(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \sin \phi}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \ddot{\sigma} - \frac{2a\sigma\dot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \left( \frac{\sin \phi \tau \dot{\tau}}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \cos \phi \dot{\phi} (1-\tau^2)^{1/2} \right) -\end{aligned}\tag{5.1.7}$$

$$\begin{aligned}
& -a(\sigma^2 - 1)^{1/2} \left( \frac{\tau \sin \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} \ddot{\tau} + \frac{2\tau\dot{\phi} \cos \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} + \right. \\
& \left. + \sin \phi (1 - \tau^2)^{1/2} \left( \frac{\dot{\sigma}^2}{(\sigma^2-1)^2} + \frac{\dot{\tau}^2}{(1-\tau^2)^2} + \dot{\phi}^2 \right) - (1 - \tau^2)^{1/2} \cos \phi \ddot{\phi} \right),
\end{aligned} \tag{5.1.8}$$

$$\ddot{z} = a(\tau\ddot{\sigma} + 2\dot{\sigma}\dot{\tau} + \sigma\ddot{\tau}). \tag{5.1.9}$$

В модели предполагается, что ось симметрии диода и магнитное поле имеют одинаковое направление. Поэтому рассматриваемая система является аксиально-симметричной:

$$\vec{E} = E_\sigma(\sigma, \tau)\vec{e}_\sigma + E_\tau(\sigma, \tau)\vec{e}_\tau, \tag{5.1.10}$$

$$\vec{j} = j_\sigma(\sigma, \tau)\vec{e}_\sigma + j_\tau(\sigma, \tau)\vec{e}_\tau. \tag{5.1.11}$$

Для физических координат напряженности электрического поля имеем:

$$E_x = \frac{\partial x}{\partial x_i} \frac{\hat{E}_i}{\sqrt{g_{ii}}},$$

$$E_y = \frac{\partial y}{\partial x_i} \frac{\hat{E}_i}{\sqrt{g_{ii}}},$$

$$E_z = \frac{\partial z}{\partial x_i} \frac{\hat{E}_i}{\sqrt{g_{ii}}}.$$

Компоненты напряженности электрического поля в эллипсоидальных координатах имеют вид:

$$\begin{aligned}
\vec{E} = & \vec{e}_x \left( \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} E_\sigma - \frac{(\sigma^2 - 1)^{1/2} \tau \cos \phi}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} E_\tau \right) + \\
& + \vec{e}_y \left( \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} E_\sigma - \frac{(\sigma^2 - 1)^{1/2} \tau \sin \phi}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} E_\tau \right) + \\
& + \vec{e}_z \left( \frac{(\sigma^2 - 1)^{1/2} \tau}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} E_\sigma + \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2}}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} E_\tau \right).
\end{aligned} \tag{5.1.12}$$

Векторное произведение в уравнении (1.3)  $[\dot{\vec{r}}, \vec{B}]$ :

$$[\dot{\vec{r}}, \vec{B}] = \begin{vmatrix} \vec{e}_x & \vec{e}_y & \vec{e}_z \\ \dot{x} & \dot{y} & \dot{z} \\ 0 & 0 & B \end{vmatrix} = \dot{y}B\vec{e}_x - \dot{x}B\vec{e}_y \tag{5.1.13}$$

представляем в эллипсоидальных координатах:

$$[\dot{\vec{r}}, \vec{B}] = a \left( \frac{(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \sin \phi}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} \dot{\sigma} - \frac{(\sigma^2 - 1)^{1/2} \tau \sin \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau} + \right) B\vec{e}_x -$$

$$-a \left( \frac{(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \cos \phi}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \dot{\sigma} - \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \cos \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau} - \right) B \vec{e}_y. \quad (5.1.14)$$

Таким образом, учитывая направление вектора напряженности электрического поля и заряд электрона, уравнение движения (5.1) представляем в следующем виде:

$$\frac{a(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \cos \phi \ddot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{a(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \cos \phi \ddot{\tau}}{(1-\tau^2)^{1/2}} - a(\sigma^2-1)^{1/2} (1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi \ddot{\phi} = f_1, \quad (5.1.15)$$

$$\frac{a(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \sin \phi \ddot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{a(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \sin \phi \ddot{\tau}}{(1-\tau^2)^{1/2}} - a(\sigma^2-1)^{1/2} (1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi \ddot{\phi} = f_2, \quad (5.1.16)$$

$$a\tau\ddot{\sigma} + a\dot{\tau}\sigma = f_3, \quad (5.1.17)$$

где

$$f_1 = \frac{2a\sigma\dot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \left( \frac{\tau \cos \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau} + (1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi \dot{\phi} \right) - a(\sigma^2-1)^{1/2} \left( 2 \frac{\tau \sin \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau} \dot{\phi} - \cos \phi (1-\tau^2)^{1/2} \left( \frac{\dot{\sigma}^2}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \frac{\dot{\tau}^2}{(1-\tau^2)^{1/2}} + \dot{\phi}^2 \right) \right) + \frac{e}{m} \left( \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} E_\sigma - \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \cos \phi E_\tau}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \right) + \frac{eB}{m} \left( \frac{a(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \sin \phi \dot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{a(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \dot{\tau} \sin \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} + a(\sigma^2-1)^{1/2} (1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi \dot{\phi} \right), \quad (5.1.18)$$

$$f_2 = \frac{2a\sigma\dot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \left( \frac{\sin \phi \tau \dot{\tau}}{(1-\tau^2)^{1/2}} - (1-\tau^2)^{1/2} \cos \phi \dot{\phi} \right) + a(\sigma^2-1)^{1/2} \left( 2 \frac{\tau \cos \phi \dot{\tau} \dot{\phi}}{(1-\tau^2)^{1/2}} + \sin \phi (1-\tau^2)^{1/2} \left( \frac{\dot{\sigma}^2}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \frac{\dot{\tau}^2}{(1-\tau^2)^{1/2}} + \dot{\phi}^2 \right) \right) + \frac{e}{m} \left( \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} E_\sigma - \frac{(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \sin \phi}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} E_\tau \right) - \frac{eB}{m} \left( \frac{a(1-\tau^2)^{1/2} \sigma \cos \phi \dot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{a(\sigma^2-1)^{1/2} \tau \dot{\tau} \cos \phi}{(1-\tau^2)^{1/2}} - a(\sigma^2-1)^{1/2} (1-\tau^2)^{1/2} \sin \phi \dot{\phi} \right), \quad (5.1.19)$$

$$f_3 = -2a\dot{\sigma}\dot{\tau} + \frac{e}{m} \left( \frac{\tau(\sigma^2-1)^{1/2}}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} E_\sigma + \frac{\sigma(1-\tau^2)^{1/2}}{(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} E_\tau \right). \quad (5.1.20)$$

Решая систему относительно членов со вторыми производными получаем:

$$a(\sigma^2 - \tau^2)\ddot{\sigma} = (\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}\sigma(\cos \phi \cdot f_1 + \sin \phi \cdot f_2) + (\sigma^2 - 1)^{1/2}\tau \cdot f_3, \quad (5.1.21)$$

$$a(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}\ddot{\tau} = -(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}\tau(\cos \phi \cdot f_1 + \sin \phi \cdot f_2) + (1 - \tau^2)^{1/2}\sigma \cdot f_3, \quad (5.1.22)$$

$$a(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}\ddot{\phi} = -f_1 \sin \phi + f_2 \cos \phi. \quad (5.1.23)$$

В уравнения (5.1.21) – (5.1.23) подставляем выражения (5.1.18) – (5.1.20) и, упрощая полученные выражения, имеем:

$$a(\sigma^2 - \tau^2)\ddot{\sigma} = a\sigma \left( \frac{1-\tau^2}{\sigma^2-1} \dot{\sigma}^2 + \frac{\sigma^2-1}{1-\tau^2} \dot{\tau}^2 \right) + a(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2)\sigma\dot{\phi} \left( \dot{\phi} + \frac{eB}{m} \right) + 2a\tau\dot{\sigma}\dot{\tau} + \frac{e}{m}(\sigma^2 - 1)^{1/2}(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}E_\sigma, \quad (5.1.24)$$

$$a(\sigma^2 - \tau^2)\ddot{\tau} = -a\tau \left( \frac{1-\tau^2}{\sigma^2-1} \dot{\sigma}^2 + \frac{\sigma^2-1}{1-\tau^2} \dot{\tau}^2 \right) - a(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2)\tau\dot{\phi} \left( \dot{\phi} + \frac{eB}{m} \right) - 2a\sigma\dot{\sigma}\dot{\tau} + \frac{e}{m}(1 - \tau^2)^{1/2}(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}E_\tau, \quad (5.1.25)$$

$$(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}\ddot{\phi} = \left( 2\dot{\phi} + \frac{eB}{m} \right) \left( -\frac{(1-\tau^2)^{1/2}\sigma\dot{\sigma}}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \frac{(\sigma^2-1)^{1/2}\tau\dot{\tau}}{(1-\tau^2)^{1/2}} \right). \quad (5.1.26)$$

Рассмотрим уравнение (5.1.26). Его можно представить в виде:

$$(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}\ddot{\phi} = -\left( 2\dot{\phi} + \frac{eB}{m} \right) \frac{d}{dt} \left( (\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2} \right),$$

отсюда:

$$(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}\ddot{\phi} + 2\dot{\phi} \frac{d}{dt} \left( (\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2} \right) = -\frac{eB}{m} \frac{d}{dt} \left( (\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2} \right),$$

$$(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2} = \alpha(t), \text{ т.к. } \sigma = \sigma(t), \tau = \tau(t).$$

$$\alpha(t)\ddot{\phi} + 2\dot{\phi} \frac{d}{dt} (\alpha(t)) = -\frac{eB}{m} \frac{d}{dt} (\alpha(t)). \quad (5.1.27)$$

Полученное уравнение (5.1.27) умножаем на  $\alpha(t)$ :

$$\alpha^2(t)\ddot{\phi} + 2\dot{\phi}\alpha(t) \frac{d}{dt} (\alpha(t)) = -\frac{eB}{m} \alpha(t) \frac{d}{dt} (\alpha(t)) = -\frac{eB}{m} 2\alpha(t) \frac{d}{dt} (\alpha(t)). \quad (5.1.28)$$

Интегрируя полученное уравнение (5.1.28), получаем:

$$\dot{\phi}(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2) = -\frac{eB}{2m}(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2) + c. \quad (5.1.29)$$

При  $\sigma = \sigma_0, \tau = \tau_0$ :

$$\dot{\phi}_0 = W, \quad (5.1.30)$$

отсюда:  $c = \left(W + \frac{eB}{2m}\right)(\sigma_0^2 - 1)(1 - \tau_0^2)$ .

Таким образом, угловая скорость электрона равна:

$$\dot{\phi} = \frac{eB}{2m} \left( \left( \frac{2m}{eB} W + 1 \right) \frac{(\sigma_0^2 - 1)(1 - \tau_0^2)}{(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2)} - 1 \right). \quad (5.1.31)$$

Обозначим:

$$K = \dot{\phi} \left( \dot{\phi} + \frac{eB}{m} \right), \quad (5.1.32)$$

тогда уравнения (5.1.23) и (5.1.24) перепишем в виде:

$$\begin{aligned} a(\sigma^2 - \tau^2)\ddot{\sigma} = a\sigma \left( \frac{1 - \tau^2}{\sigma^2 - 1} \dot{\sigma}^2 + \frac{\sigma^2 - 1}{1 - \tau^2} \dot{\tau}^2 \right) + Ka(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2)\sigma + \\ + 2a\tau\dot{\sigma}\dot{\tau} + \frac{e}{m}(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}E_\sigma, \end{aligned} \quad (5.1.33)$$

$$\begin{aligned} a(\sigma^2 - \tau^2)\ddot{\tau} = -a\tau \left( \frac{1 - \tau^2}{\sigma^2 - 1} \dot{\sigma}^2 + \frac{\sigma^2 - 1}{1 - \tau^2} \dot{\tau}^2 \right) + Ka(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2)\tau - \\ - 2a\sigma\dot{\sigma}\dot{\tau} + \frac{e}{m}(\sigma^2 - 1)^{1/2}(1 - \tau^2)^{1/2}E_\tau. \end{aligned} \quad (5.1.34)$$

Для того, чтобы понизить порядок дифференциальных уравнений (5.1.33) и (5.1.34) второго порядка, введем новые переменные:

$$\xi = \tau\dot{\sigma} + \sigma\dot{\tau}, \quad (5.1.35)$$

$$\eta = \frac{\sigma\dot{\sigma}}{\sigma^2 - 1} - \frac{\tau\dot{\tau}}{1 - \tau^2}. \quad (5.1.36)$$

И тогда уравнения движения вне пучка перепишутся в виде:

$$\dot{\xi}_V = \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} (\tau_V(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}E_\sigma^V + \sigma_V(1 - \tau_V^2)^{1/2}E_\tau^V), \quad (5.1.37)$$

$$\dot{\eta}_V = K_V + \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} \left( \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} E_\sigma^V - \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} E_\tau^V \right), \quad (5.1.38)$$

$$\dot{\sigma}_V = \frac{(\sigma_V^2 - 1)\tau_V\xi}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} + \frac{(\sigma_V^2 - 1)(1 - \tau_V^2)\sigma_V\eta_V}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)}, \quad (5.1.39)$$

$$\dot{\tau}_V = \frac{(1 - \tau_V^2)\sigma_V\xi}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} - \frac{(\sigma_V^2 - 1)(1 - \tau_V^2)\tau_V\eta_V}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)}. \quad (5.1.40)$$

В первом приближении рассмотрим диодную структуру без учета пространственного заряда, тогда  $E = E_\sigma$  и

$$\dot{E}_\sigma = \frac{E_\sigma}{(\sigma^2 - \tau^2)} \left( -\frac{(2\sigma^2 - \tau^2 - 1)\sigma\dot{\sigma}}{(\sigma^2 - 1)} + \tau\dot{\tau} \right), \quad (5.1.41)$$

уравнения движения будут выглядеть следующим образом:

$$\dot{\xi} = \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} (\tau(\sigma^2 - 1)^{1/2} E_\sigma), \quad (5.1.42)$$

$$\dot{\eta} = K + \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)} \frac{\sigma E_\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} - \eta^2, \quad (5.1.43)$$

$$\dot{\sigma} = \frac{\sigma^2 - 1}{\sigma^2 - \tau^2} (\tau\xi + (1 - \tau^2))\sigma\xi, \quad (5.1.44)$$

$$\dot{\tau} = \frac{1 - \tau^2}{\sigma^2 - \tau^2} (\sigma\xi - (\sigma^2 - 1)\tau\eta). \quad (5.1.45)$$

Вне пучка поле удовлетворяет уравнениям Максвелла (5.2).

В эллипсоидальной системе координат из (5.2) получаем:

$$\nabla \cdot \vec{E}^V = \frac{1}{\sqrt{g}} \left( \frac{\partial}{\partial \sigma} \left( E_\sigma^V \sqrt{\frac{g}{g_{\sigma\sigma}}} \right) + \frac{\partial}{\partial \tau} \left( E_\tau^V \sqrt{\frac{g}{g_{\tau\tau}}} \right) \right),$$

где  $g = g_{\sigma\sigma}g_{\tau\tau}g_{\phi\phi} = a^3(\sigma^2 - \tau^2)^2$ , поэтому

$$\begin{aligned} & (\sigma_V^2 - 1)^{1/2} (\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2} \frac{\partial E_\sigma^V}{\partial \sigma_V} + E_\sigma^V \frac{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2} \sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} + E_\sigma^V \frac{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} \sigma_V = \\ & = -(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2} (1 - \tau_V^2)^{1/2} \frac{\partial E_\tau^V}{\partial \tau_V} + E_\tau^V \frac{(1 - \tau_V^2)^{1/2} \tau_V}{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} + E_\tau^V \frac{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}}{(1 - \tau_V^2)^{1/2} \tau_V}, \end{aligned} \quad (5.1.46)$$

$$\nabla \times \vec{E}^V = \frac{1}{a^3(\sigma_V^2 - \tau_V^2)}.$$

$$\cdot \begin{vmatrix} a \frac{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} \vec{e}_\sigma & a \frac{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} \vec{e}_\tau & a(\sigma_V^2 - 1)^{1/2} (1 - \tau_V^2) \vec{e}_\phi \\ \frac{\partial}{\partial \sigma} & \frac{\partial}{\partial \tau} & \frac{\partial}{\partial \phi} \\ E_\sigma^V \frac{a(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} & E_\tau^V a \frac{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} & 0 \end{vmatrix},$$

$$\frac{\partial}{\partial \sigma_V} \left( E_\tau^V \frac{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} \right) - \frac{\partial}{\partial \tau_V} \left( E_\sigma^V \frac{(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} \right) = 0. \quad (5.1.47)$$

Напряженность электрического поля ищем в виде:

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

Тогда уравнения (5.1.45) и (5.1.46) переписутся в виде:

$$G_{\sigma}^V (\sigma_V^2 - 1)^{1/2} \frac{\partial F_{\sigma}^V}{\partial \sigma_V} + G_{\sigma}^V F_{\sigma}^V \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} +$$

$$+ F_{\sigma}^V (1 - \tau_V^2)^{1/2} \frac{\partial G_{\tau}^V}{\partial \tau_V} - F_{\tau}^V G_{\tau}^V \frac{\tau_V^2}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} = 0, \quad (5.1.48)$$

$$\frac{G_{\tau}^V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} \frac{\partial F_{\tau}^V}{\partial \sigma_V} - \frac{F_{\sigma}^V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} \frac{\partial G_{\sigma}^V}{\partial \tau_V} = 0. \quad (5.1.49)$$

Рассмотрим уравнение (5.1.49). Уравнение делим на  $F_{\sigma}^V G_{\tau}^V$ , тогда:

$$\frac{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}}{F_{\sigma}^V} \frac{\partial F_{\tau}^V}{\partial \sigma_V} = \frac{1}{G_{\tau}^V} (1 - \tau_V^2)^{1/2} \frac{\partial G_{\sigma}^V}{\partial \tau_V}. \quad (5.1.50)$$

В уравнении (5.1.50) левая часть зависит только от  $\sigma_V$ , а правая — от  $\tau_V$ . Они могут быть равны только тогда, когда обе части уравнения равны некоторой постоянной величине  $c_2$ .

В каждой части уравнения частные производные можно заменить на полные, т.е.  $\frac{\partial F_{\tau}^V}{\partial \sigma_V} =$

$\frac{dF_{\tau}^V}{d\sigma_V}$ , т.к.  $F_{\tau}^V = F_{\tau}^V(\sigma_V)$  и  $\frac{\partial G_{\sigma}^V}{\partial \tau_V} = \frac{dG_{\sigma}^V}{d\tau_V}$ , т.к.  $G_{\sigma}^V = G_{\sigma}^V(\tau_V)$ .

Таким образом, получаем два уравнения следующего вида:

$$\frac{dF_{\tau}^V}{d\sigma_V} = \frac{c_2}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_{\sigma}^V, \quad (5.1.51)$$

$$\frac{dG_{\sigma}^V}{d\tau_V} = \frac{c_2}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_{\tau}^V. \quad (5.1.52)$$

Уравнение (5.1.51) умножаем на  $\dot{\sigma}_V$ , и (5.1.52) умножаем на  $\dot{\tau}_V$ , тогда:

$$\dot{F}_{\tau}^V = \frac{c_2}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_{\sigma}^V \dot{\sigma}_V, \quad (5.1.53)$$

$$\dot{G}_{\sigma}^V = \frac{c_2}{(1 - \sigma_{\tau}^2)^{1/2}} G_{\tau}^V \dot{\tau}_V$$

$$\frac{d\sigma}{d\tau} = \frac{d\sigma_V}{d\tau_V}. \quad (5.1.54)$$

Уравнение (5.1.48) умножаем на  $F_{\tau}^V G_{\sigma}^V$ , и получаем:

$$\frac{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}}{F_{\tau}^V} \frac{\partial F_{\sigma}^V}{\partial \sigma_V} + \frac{F_{\sigma}^V}{F_{\tau}^V} \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} = - \frac{(1 - \tau_V^2)^{1/2}}{G_{\sigma}^V} \frac{\partial G_{\tau}^V}{\partial \tau_V} + \frac{G_{\tau}^V}{(1 - \tau_V^2)} \frac{\tau_V}{G_{\sigma}^V}. \quad (5.1.55)$$

Так как левая часть есть функция только от  $\sigma_V$ , а правая — только от  $\tau_V$ , то уравнение (5.1.55) приравняем к некоторой постоянной величине  $c_3$ . И также получаем два уравнения:

$$(\sigma_V^2 - 1)^{1/2} \frac{dF_\sigma^V}{d\sigma_V} + F_\sigma^L \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} = c_3 F_\tau^V, \quad (5.1.56)$$

$$\frac{dG_\tau^V}{d\tau_V} (1 - \tau_V^2)^{1/2} + G_\tau^V \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} = -c_3 G_\sigma^V. \quad (5.1.57)$$

Уравнение (5.1.56) умножаем на  $\dot{\sigma}_V$ , уравнение (5.1.57) соответственно на  $\dot{\tau}_V$ , и получаем:

$$\dot{F}_\sigma^V = \left( \frac{c_3}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_\tau^V - \frac{\sigma_V}{\sigma_V^2 - 1} F_\sigma^V \right) \dot{\sigma}_V, \quad (5.1.58)$$

$$\dot{G}_\tau^V = \left( -\frac{c_3}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_\sigma^V + \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_\tau^V \right) \dot{\tau}_V. \quad (5.1.59)$$

Таким образом, вне пучка для исследования динамики пучка эллипсоидального диода, используя уравнения Максвелла (5.2), получаем систему из восьми обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка:

$$\begin{aligned} \dot{\sigma}_V &= \frac{\xi_V(\sigma_V^2 - 1)\tau_V}{\sigma_V^2 - \tau_V^2} + \frac{\xi_V\sigma_V(\sigma_V^2 - 1)(1 - \tau_V^2)}{\sigma_V^2 - \tau_V^2}, \\ \dot{\tau}_V &= \frac{\xi_V(1 - \tau_V^2)\sigma_V}{\sigma_V^2 - \tau_V^2} - \frac{\eta_V\tau_V(\sigma_V^2 - 1)(1 - \tau_V^2)}{\sigma_V^2 - \tau_V^2}, \\ \dot{\xi}_V &= \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} (\tau_V(\sigma_V^2 - 1)^{1/2} E_\sigma^V + \sigma_V(1 - \tau_V^2)^{1/2} E_\tau^V), \\ \dot{\eta}_V &= K_V + \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^{1/2}} \left( \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} E_\sigma^V - \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} E_\tau^V \right) - \eta_V^2, \\ \dot{F}_\tau^V &= \frac{c_2}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_\sigma^V \dot{\sigma}_V, \\ \dot{G}_\sigma^V &= \frac{c_2}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_\tau^V \dot{\tau}_V, \\ \dot{F}_\sigma^V &= \left( \frac{c_3}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_\tau^V - \frac{\sigma_V}{\sigma_V^2 - 1} F_\sigma^V \right) \dot{\sigma}_V, \\ \dot{G}_\tau^V &= \left( -\frac{c_3}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_\sigma^V + \frac{\tau_V}{1 - \tau_V^2} G_\tau^V \right) \dot{\tau}_V, \end{aligned} \quad (5.1.60)$$

где  $E_\sigma^V = \frac{F_\sigma^V G_\sigma^V}{\sqrt{\sigma_V^2 - \tau_V^2}}$ ,  $E_\tau^V = \frac{F_\tau^V G_\tau^V}{\sqrt{\sigma_V^2 - \tau_V^2}}$ .

Аналогично первой части уравнения движения (5.3) для крайнего электрона внутри пучка приводятся к виду:

$$\begin{aligned} \dot{\sigma} &= \frac{\xi(\sigma^2 - 1)\tau}{\sigma^2 - \tau^2} + \frac{\sigma(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2)}{\sigma^2 - \tau^2}, \\ \dot{\tau} &= \frac{\xi(1 - \tau^2)\sigma}{\sigma^2 - \tau^2} + \frac{\tau(\sigma^2 - 1)(1 - \tau^2)}{\sigma^2 - \tau^2}, \\ \dot{\xi} &= \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} (\tau(\sigma^2 - 1)^{1/2} E_\sigma + \sigma(1 - \tau^2)^{1/2} E_\tau), \end{aligned}$$

$$\dot{\eta} = K + \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} \left( \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} E_\sigma - \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} E_\tau \right) - \eta^2. \quad (5.1.61)$$

Рассмотрим уравнение непрерывности (5.5) в стационарном режиме работы диода. Так как диодная система аксиально-симметричная, то будем считать, что  $j = j(\sigma, \tau)$ ,  $\vec{j} = j_\sigma(\sigma, \tau)\vec{e}_\sigma + j_\tau(\sigma, \tau)\vec{e}_\tau$ .

В эллипсоидальной системе координат

$$\operatorname{div} \vec{j} = \frac{\partial (j_\sigma(\sigma^2 - 1)^{1/2}(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2})}{\partial \sigma} + \frac{\partial (j_\tau(1 - \tau^2)^{1/2}(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2})}{\partial \tau} = 0. \quad (5.1.62)$$

В уравнении (5.1.62) введем следующие выражения для координатных составляющих плотности тока:

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

Тогда

$$\begin{aligned} g_\sigma(\sigma^2 - 1)^{1/2} \frac{\partial f_\sigma}{\partial \sigma} + f_\sigma g_\sigma \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} + \\ + f_\tau(1 - \tau^2)^{1/2} \frac{\partial g_\tau}{\partial \tau} - f_\tau g_\tau \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} = 0. \end{aligned} \quad (5.1.63)$$

Уравнение (5.1.63) умножаем на  $\frac{1}{f_\tau g_\tau}$ :

$$\frac{(\sigma^2 - 1)^{1/2} \partial f_\sigma}{f_\tau \partial \sigma} + \frac{f_\sigma}{f_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} = - \frac{(1 - \tau^2)^{1/2} \partial g_\tau}{g_\sigma \partial \tau} + \frac{g_\tau \tau}{(1 - \tau^2)^{1/2} g_\sigma}. \quad (5.1.64)$$

Так как левая часть уравнения (5.1.64) зависит только от  $\sigma$ , а правая часть — только от  $\tau$ , то его можно приравнять к некоторой постоянной величине  $c_1$ :

$$\frac{(\sigma^2 - 1)^{1/2} \partial f_\sigma}{f_\tau \partial \sigma} + \frac{f_\sigma}{f_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} = c_1, \quad (5.1.65)$$

$$- \frac{(1 - \tau^2)^{1/2} \partial g_\tau}{g_\sigma \partial \tau} + \frac{g_\tau \tau}{(1 - \tau^2)^{1/2} g_\sigma} = c_1. \quad (5.1.66)$$

Так как  $f_\sigma$  и  $g_\tau$  являются функциями только от  $\sigma$  и  $\tau$  соответственно, то частные производные от них заменяются на полные:

$$\frac{\partial f_\sigma(\sigma)}{\partial \sigma} = \frac{df_\sigma(\sigma)}{d\sigma}, \quad \frac{\partial g_\tau}{\partial \tau} = \frac{dg_\tau}{d\tau}.$$

Тогда

$$(\sigma^2 - 1)^{1/2} \frac{df_\sigma}{d\sigma} = c_1 f_\tau - \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} f_\sigma, \quad (5.1.67)$$

$$(1 - \tau^2)^{1/2} \frac{dg_\tau}{d\tau} = -c_1 g_\sigma + \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} g_\tau. \quad (5.1.68)$$

Полученное выражение (5.1.67) умножаем на  $\dot{\sigma}(\sigma^2 - 1)^{1/2}$ :

$$\dot{f}_\sigma = \left( \frac{c_1}{(\sigma^2-1)^{1/2}} f_\tau - \frac{\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} f_\sigma \right) \dot{\sigma}. \quad (5.1.69)$$

Уравнение (5.1.68) умножаем на  $\dot{\tau}(\tau^2 - 1)^{1/2}$ :

$$\dot{g}_\tau = \left( -\frac{c_1}{(1-\tau^2)^{1/2}} g_\sigma + \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} g_\tau \right) \dot{\tau}. \quad (5.1.70)$$

Найдем уравнения для функций  $f_\tau$ ,  $g_\sigma$ . Исходя из уравнения  $\vec{j} = \rho \vec{v}$ , где  $\vec{v}$ — скорость электрона:

$$\begin{aligned} \vec{v} &= \sqrt{g_{ii}} \frac{dx^i}{dt} \vec{v}_i, \\ \rho &= \frac{j_\sigma(\sigma^2-1)^{1/2}}{\dot{\sigma}a(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} = \frac{j_\tau(1-\tau^2)^{1/2}}{\dot{\tau}a(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \end{aligned} \quad (5.1.71)$$

или

$$\frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2-1)^{1/2}}{\dot{\sigma}} = \frac{f_\tau g_\tau (1-\tau^2)^{1/2}}{\dot{\tau}}. \quad (5.1.72)$$

Отсюда находим выражение для  $f_\tau$ :

$$f_\tau = \frac{f_\sigma g_\sigma \dot{\tau} (\sigma^2-1)^{1/2}}{(1-\tau^2)^{1/2} g_\tau \dot{\sigma}}. \quad (5.1.73)$$

На поверхности катода по закону Ричардсона-Дэшмана (РД)

$$j_0 = A_0 T^2 (1 - \bar{R}) \exp\left(-\frac{\phi - e\sqrt{eE_0}}{kT}\right) \text{ и исходя, что}$$

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

имеем:

$$g_\sigma(\tau) = \frac{A_0 T^2}{f_\sigma(\sigma_0)} \exp\left(-\frac{\phi(\sigma_0^2-\tau^2)^{1/4} - e\sqrt{eF_\sigma(\sigma_0)G_\sigma(\tau)}}{(\sigma_0^2-\tau^2)^{1/4} kT}\right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} \quad (5.1.74)$$

Подставляем (5.1.73) и (5.1.74) в (5.1.69) и (5.1.70):

$$\dot{f}_\sigma = \frac{c_1 f_\sigma \dot{\tau}}{g_\tau (1-\tau^2)^{1/2}} \frac{A_0 T^2}{f_\sigma(\sigma_0)} \exp\left(-\frac{\phi(\sigma_0^2-\tau^2)^{1/4} - e\sqrt{eF_\sigma(\sigma_0)G_\sigma(\tau)}}{(\sigma_0^2-\tau^2)^{1/4} kT}\right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} - \frac{\sigma}{\sigma^2-1} f_\sigma \dot{\sigma}, \quad (5.1.76)$$

$$\dot{g}_\tau = \left( -\frac{c_1}{(1-\tau^2)^{1/2}} \frac{A_0 T^2}{f_\sigma(\sigma_0)} \exp\left(-\frac{\phi(\sigma_0^2-\tau^2)^{1/4} - e\sqrt{eF_\sigma(\sigma_0)G_\sigma(\tau)}}{(\sigma_0^2-\tau^2)^{1/4} kT}\right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} + \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} g_\tau \right) \dot{\tau}. \quad (5.1.77)$$

Теперь рассмотрим уравнения Максвелла:

$$\operatorname{div} \vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0}, \quad (5.1.78)$$

$$\operatorname{grad} U = -\vec{E}. \quad (5.1.79)$$

Понижаем его порядок. Уравнение (5.1.79) представляем в эллипсоидальной системе координат:

$$\operatorname{grad} U = \frac{(\sigma^2-1)^{1/2}}{a(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \frac{\partial U}{\partial \sigma} \vec{e}_\sigma + \frac{(1-\tau^2)^{1/2}}{a(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \frac{\partial U}{\partial \tau} \vec{e}_\tau,$$

т.к. диодная система аксиально-симметричная, то  $U = U(\sigma, \tau)$ .

Тогда уравнение (5.1.79) переписется в виде:

$$\frac{(\sigma^2-1)^{1/2}}{a(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \frac{\partial U}{\partial \sigma} \vec{e}_\sigma + \frac{(1-\tau^2)^{1/2}}{a(\sigma^2-\tau^2)^{1/2}} \frac{\partial U}{\partial \tau} \vec{e}_\tau = -E_\sigma \vec{e}_\sigma - E_\tau \vec{e}_\tau. \quad (5.1.80)$$

Приравнивая компоненты в правой и левой частях уравнения (5.1.80) получаем:

$$\frac{\partial U}{\partial \sigma} = -\frac{aF_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}}, \quad (5.1.81)$$

$$\frac{\partial U}{\partial \tau} = -\frac{aF_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}}. \quad (5.1.82)$$

Уравнение (5.1.81) продифференцируем по  $\tau$ , а уравнение (5.1.82) продифференцируем по  $\sigma$ , получая при этом в левых частях уравнений одинаковые выражения:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial \tau \partial \sigma} = -\frac{aF_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \frac{\partial G_\sigma}{\partial \tau}, \quad (5.1.83)$$

$$\frac{\partial^2 U}{\partial \tau \partial \sigma} = -\frac{aG_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \frac{\partial F_\tau}{\partial \sigma}. \quad (5.1.84)$$

Приравниваем правые части полученных уравнений (5.1.83), (5.1.84) и, умножая полученное равенство на  $\frac{1}{G_\tau F_\sigma} (1-\tau^2)^{1/2} (\sigma^2-1)^{1/2}$ , получаем:

$$\frac{(1-\tau^2)^{1/2}}{G_\tau} \frac{\partial G_\sigma}{\partial \tau} = \frac{(\sigma^2-1)^{1/2}}{F_\sigma} \frac{\partial F_\tau}{\partial \sigma}. \quad (5.1.85)$$

Левая часть уравнения (5.1.85) зависит от  $\tau$ , правая часть — от  $\sigma$ . Поэтому приравниваем их некоторой постоянной величине  $c_4$ :

$$\frac{(1-\tau^2)^{1/2}}{G_\tau} \frac{\partial G_\sigma}{\partial \tau} = \frac{(\sigma^2-1)^{1/2}}{F_\sigma} \frac{\partial F_\tau}{\partial \sigma} = c_4. \quad (5.1.86)$$

Рассмотрим

$$\frac{(1-\tau^2)^{1/2}}{G_\tau} \frac{\partial G_\sigma}{\partial \tau} = c_4. \quad (5.1.87)$$

Так как  $G_\sigma$  зависит только от  $\tau$ , то частную производную  $\frac{\partial G_\sigma}{\partial \tau}$  можно заменить на полную:  $\frac{dG_\sigma}{d\tau}$ .

Также выражение (5.1.87) умножаем на  $\frac{G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau}$ , и получаем при этом уравнение:

$$\frac{\partial G_\sigma}{\partial \tau} \dot{\sigma} = \dot{G}_\sigma = \frac{c_4 G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau}. \quad (5.1.88)$$

Аналогично для другого выражения:

$$\dot{F}_\tau = \frac{c_4 F_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \dot{\sigma}. \quad (5.1.89)$$

Рассмотрим уравнение (5.1.78) в эллипсоидальной системе координат:

$$\begin{aligned} G_\sigma (\sigma^2 - 1)^{1/2} \frac{\partial F_\sigma}{\partial \sigma} + G_\sigma F_\sigma \frac{\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \\ + F_\tau (1 - \tau^2)^{1/2} \frac{\partial G_\tau}{\partial \tau} - F_\tau G_\tau \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} = \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2-1)^{1/2}}{\varepsilon_0 \dot{\sigma}}. \end{aligned} \quad (5.1.90)$$

Умножаем уравнение (5.1.90) на  $\frac{1}{G_\sigma F_\tau}$ , и получаем:

$$\begin{aligned} \frac{(\sigma^2-1)^{1/2}}{F_\tau} \frac{\dot{F}_\sigma}{\dot{\sigma}} + \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \\ + \frac{(1-\tau^2)^{1/2}}{G_\sigma} \frac{\dot{G}_\tau}{\dot{\tau}} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} = \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2-1)^{1/2}}{G_\sigma F_\tau \varepsilon_0 \dot{\sigma}}. \end{aligned} \quad (5.1.91)$$

Таким образом, для крайнего электрона внутри пучка получаем еще 9 обыкновенных дифференциальных уравнений 1-го порядка относительно переменных  $\sigma, \tau, \xi, \eta, F_\sigma, G_\sigma, F_\tau, G_\tau, f_\sigma, g_\tau$ :

$$\dot{\sigma} = \frac{\sigma^2-1}{\sigma^2-\tau^2} (\xi\tau + \eta\sigma(1-\tau^2)),$$

$$\dot{\tau} = \frac{1-\tau^2}{\sigma^2-\tau^2} (\xi\sigma - \eta\tau(\sigma^2-1)),$$

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

$$\dot{\eta} = K + \frac{e}{am(\sigma^2-\tau^2)} \left( \frac{\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} F_\sigma G_\sigma - \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} F_\tau G_\tau \right) - \eta^2,$$

$$\dot{f}_\sigma = \frac{c_1 f_\sigma \dot{\tau}}{g_\tau (1-\tau^2)^{1/2}} \frac{A_0 T^2}{f_\sigma(\sigma_0)} \exp \left( - \frac{\phi(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} - e\sqrt{eF_\sigma(\sigma_0)G_\sigma(\tau)}}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} kT} \right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} - \frac{\sigma}{\sigma^2-1} f_\sigma \dot{\sigma},$$

$$\dot{g}_\tau = \left( -\frac{c_1}{(1-\tau^2)^{1/2}} \frac{A_0 T^2}{f_\sigma(\sigma_0)} \exp\left(-\frac{\phi(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} - e\sqrt{eF_\sigma(\sigma_0)G_\sigma(\tau)}}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/4} kT}\right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} + \right. \\ \left. + \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} g_\tau \right) \dot{t},$$

$$\frac{(\sigma^2 - 1)^{1/2}}{F_\tau} \frac{\dot{F}_\sigma}{\dot{\sigma}} + \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} + \frac{(1-\tau^2)^{1/2}}{G_\sigma} \frac{\dot{G}_\tau}{\dot{\tau}} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} = \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2 - 1)^{1/2}}{G_\sigma F_\tau \varepsilon_0 \dot{\sigma}},$$

$$\dot{G}_\sigma = \frac{c_4 G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{t},$$

$$\dot{F}_\tau = \frac{c_4 F_\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} \dot{\sigma}. \quad (5.1.92)$$

В итоге решения первой и второй частей математической модели 1 получили всего 17 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка для 18 неизвестных:  $\sigma, \tau, \xi, \eta, F_\sigma, G_\sigma, F_\tau, G_\tau, f_\sigma, g_\tau, \sigma_L, \tau_L, \xi_L, \eta_L, F_\sigma^V, G_\sigma^V, F_\tau^V, G_\tau^V$ .

Восемнадцатое уравнение системы получаем из условия на границе пучок-вакуум (5.7). По условию (5.7) траектории крайнего электрона вне и внутри пучка должны совпасть, т.е.

$$\left(\frac{d\sigma}{d\tau}\right)_V = \left(\frac{d\sigma}{d\tau}\right)_P, \quad (5.1.93)$$

где значки  $V$  и  $P$  указывает, что траектории получены вне (вакуум) и внутри пучка соответственно. Значок  $P$  будем опускать.

Из уравнения (5.1.93) следует:

$$\frac{\dot{\sigma}_V}{\dot{\tau}_V} = \frac{\dot{\sigma}}{\dot{\tau}}. \quad (5.1.94)$$

Из (5.1.94) с учетом уравнений (5.1.34), (5.1.35) можно получить:

$$\frac{\xi}{\eta} = \frac{\xi_V}{\eta_V}. \quad (5.1.95)$$

Берем вторую производную из уравнения (5.1.95):

$$\dot{\xi}_V \eta + \xi_V \dot{\eta} = \dot{\xi} \eta_V + \xi \dot{\eta}_V, \quad (5.1.96)$$

$$\ddot{\xi}_V \eta + 2\dot{\xi}_V \dot{\eta} + \xi_V \ddot{\eta} = \ddot{\xi} \eta_V + 2\dot{\xi} \dot{\eta}_V + \xi \ddot{\eta}_V, \quad (5.1.97)$$

$$\xi_V \ddot{\eta} = \ddot{\xi} \eta_V + A, \quad (5.1.98)$$

где  $A = \xi \ddot{\xi}_V + 2(\dot{\xi} \dot{\eta}_V - \dot{\xi}_V \dot{\eta}) - \dot{\xi}_V \dot{\eta}$ .

Берем первые производные от уравнений движения (5.1.60):

$$\ddot{\xi} = -\frac{e(2\sigma\dot{\sigma} - 2\tau\dot{\tau})}{am(\sigma^2 - \tau^2)^2} (\tau(\sigma^2 - 1)^{1/2} F_\sigma G_\sigma + \sigma(1 - \tau^2)^{1/2} F_\tau G_\tau) + \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)} \cdot \\ \cdot \left( \frac{\sigma\dot{\sigma}\tau F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} + \tau(\sigma^2 - 1)^{1/2} \dot{F}_\sigma G_\sigma + (\sigma^2 - 1)^{1/2} F_\sigma G_\sigma \dot{\tau} + \tau(\sigma^2 - 1)^{1/2} F_\sigma \dot{G}_\sigma + \right.$$

$$\begin{aligned}
& +\dot{\sigma}(1-\tau^2)^{1/2}F_\tau G_\tau - \frac{\sigma\tau\dot{\tau}}{(1-\tau^2)^{1/2}}F_\tau G_\tau + \sigma(1-\tau^2)^{1/2}\dot{F}_\tau G_\tau + \sigma(1-\tau^2)^{1/2}F_\tau \dot{G}_\tau), \\
\dot{\eta} = & \dot{K} + \frac{e}{am(\sigma^2-\tau^2)} \cdot \left( \frac{\dot{\sigma}F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \frac{\sigma\dot{F}_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \frac{\sigma F_\sigma \dot{G}_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{\sigma^2\dot{\sigma}F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{3/2}} - \right. \\
& \left. - \frac{\dot{\tau}F_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \frac{\tau\dot{F}_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \frac{\tau F_\tau \dot{G}_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \frac{\tau^2\dot{\tau}F_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{3/2}} \right) - \\
& - 2\eta\dot{\eta} - \frac{e(2\sigma\dot{\sigma}-2\tau\dot{\tau})}{am(\sigma^2-\tau^2)^2} \left( \frac{\sigma F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{\tau F_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \right)
\end{aligned}$$

или

$$\ddot{\xi} = \frac{e}{am(\sigma^2-\tau^2)} (\tau(\sigma^2-1)^{1/2}\dot{F}_\sigma G_\sigma + \sigma(1-\tau^2)^{1/2}F_\tau \dot{G}_\tau) + B_1, \quad (5.1.99)$$

$$\dot{\eta} = \frac{e}{am(\sigma^2-\tau^2)} \left( \frac{\sigma\dot{F}_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{\tau F_\tau \dot{G}_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \right) + B_2, \quad (5.1.100)$$

где

$$\begin{aligned}
B_1 = & -\frac{e(2\sigma\dot{\sigma}-2\tau\dot{\tau})}{am(\sigma^2-\tau^2)} (\tau(\sigma^2-1)^{1/2}F_\sigma G_\sigma + \sigma(1-\tau^2)^{1/2}F_\tau G_\tau) + \frac{e}{am(\sigma^2-\tau^2)} \cdot \\
& \cdot \left( \frac{\sigma\tau\dot{\sigma}F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + (\sigma^2-1)^{1/2}F_\sigma G_\sigma \dot{\tau} + \tau(\sigma^2-1)^{1/2}F_\sigma \dot{G}_\sigma \right) + \\
& + \frac{e}{am(\sigma^2-\tau^2)} \left( \dot{\sigma}(1-\tau^2)^{1/2}F_\tau G_\tau - \frac{\sigma\tau\dot{\tau}}{(1-\tau^2)^{1/2}}F_\tau G_\tau + \sigma(1-\tau^2)^{1/2}\dot{F}_\tau G_\tau \right), \quad (5.1.101)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
B_2 = & \dot{K} + \frac{e}{am(\sigma^2-\tau^2)} \cdot \\
& \cdot \left( \frac{\dot{\sigma}F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} + \frac{\sigma F_\sigma \dot{G}_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{\sigma^2\dot{\sigma}F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{3/2}} - \frac{\dot{\tau}F_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \frac{\tau\dot{F}_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \frac{\tau^2\dot{\tau}F_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{3/2}} \right) - \\
& - \frac{e(2\sigma\dot{\sigma}-2\tau\dot{\tau})}{am(\sigma^2-\tau^2)^2} \left( \frac{\sigma F_\sigma G_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{\tau F_\tau G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \right) - 2\eta\dot{\eta}, \quad (5.1.102)
\end{aligned}$$

где

$$\dot{K} = -\frac{e^2 B^2}{m^2} \left( \frac{2m}{eB} W + 1 \right)^2 \frac{(\sigma_0^2-1)^2(1-\tau_0^2)^2}{(\sigma^2-1)^2(1-\tau^2)^2} \eta. \quad (5.1.103)$$

Аналогично находим, беря первые производные от (5.1.37) и (5.1.38),  $\ddot{\xi}_V$  и  $\dot{\eta}_V$  в (5.1.98):

$$\ddot{\xi}_V = \frac{e}{am(\sigma_V^2-\tau_V^2)} (\tau_V(\sigma_V^2-1)^{1/2}\dot{F}_\sigma^V G_\sigma^V + \sigma_V(1-\tau_V^2)^{1/2}F_\tau^V \dot{G}_\tau^V) + B_1^V, \quad (5.1.104)$$

$$\dot{\eta}_V = \frac{e}{am(\sigma_V^2-\tau_V^2)} \left( \frac{\sigma_L\dot{F}_\sigma^V G_\sigma^V}{(\sigma_V^2-1)^{1/2}} - \frac{\tau_V F_\tau^V \dot{G}_\tau^V}{(1-\tau_V^2)^{1/2}} \right) + B_2^V, \quad (5.1.105)$$

где

$$B_1^V = -\frac{e(2\sigma_V\dot{\sigma}_V - 2\tau_V\dot{\tau}_V)}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} (\tau_V(\sigma_V^2 - 1)^{1/2} F_\sigma^V G_\sigma^V + \sigma_V(1 - \tau_V^2)^{1/2} F_\tau^V G_\tau^V + \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} \cdot \left( \frac{\sigma_V\tau_V\dot{\sigma}_V F_\sigma^V G_\sigma^V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} + (\sigma_V^2 - 1)^{1/2} F_\sigma^V G_\sigma^V \dot{\tau}_V + \tau_V(\sigma_V^2 - 1)^{1/2} F_\sigma^V \dot{G}_\sigma^V + \dot{\sigma}_V(1 - \tau_V^2)^{1/2} F_\tau^V G_\tau^V \right) - \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} \cdot \left( \frac{\sigma_V\tau_V\dot{\tau}_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} F_\tau^V G_\tau^V + \sigma_V(1 - \tau_V^2)^{1/2} \dot{F}_\tau^V G_\tau^V \right), \quad (5.1.106)$$

$$B_2^V = \dot{K}_V + \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} \cdot \left( \dot{\sigma}_V F_\sigma^V G_\sigma^V + \sigma_V F_\sigma^V \dot{G}_\sigma^V - \frac{\sigma_V^2 \dot{\sigma}_V F_\sigma^V G_\sigma^V}{(\sigma_V^2 - 1)^{3/2}} \right) - \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} \cdot \left( \frac{\dot{\tau}_V F_\tau^V G_\tau^V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} - \frac{\tau_V \dot{F}_\tau^V G_\tau^V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} - \frac{\tau_V^2 \dot{\tau}_V F_\tau^V G_\tau^V}{(1 - \tau_V^2)^{3/2}} \right) - \frac{e(2\sigma_V\dot{\sigma}_V - 2\tau_V\dot{\tau}_V)}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)^2} \left( \frac{\sigma_V F_\sigma^V G_\sigma^V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} - \frac{\tau_V F_\tau^V G_\tau^V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} \right) - 2\eta_V \dot{\eta}_V, \quad (5.1.107)$$

$$\dot{K}_V = -\frac{e^2 B^2}{m^2} \left( \frac{2m}{eB} W + 1 \right)^2 \frac{(\sigma_0^2 - 1)^2 (1 - \tau_0^2)^2}{(\sigma_V^2 - 1)^2 (1 - \tau_V^2)^2} \eta_V. \quad (5.1.108)$$

Используя полученные уравнения, устанавливаем зависимость  $\dot{F}_\sigma$  от  $\dot{G}_\tau$ :

$$(\sigma^2 - 1)^{1/2} \frac{\dot{F}_\sigma}{F_\tau} = (1 - \tau^2)^{1/2} \frac{\dot{G}_\tau \dot{\sigma}}{G_\sigma \dot{\tau}} + B_3, \quad (5.1.109)$$

где

$$B_3 = \frac{am(A + B_1\eta_V - B_2\xi_V) \eta(\sigma^2 - \tau^2)}{eF_\tau G_\sigma \eta_V \frac{\xi_\sigma}{\sigma^2 - 1} - \tau\eta}. \quad (5.1.110)$$

Полученное выражение (5.1.109) подставляем в первую часть уравнения (5.1.91) и получаем:

$$\dot{G}_\tau = \frac{G_\sigma \dot{\tau}}{2(1 - \tau^2)^{1/2}} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2 - 1)^{1/2}}{\varepsilon_0 \dot{\sigma} F_\tau G_\sigma} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} + \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} - \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \quad (5.1.111)$$

$$\dot{F}_\sigma = \frac{F_\tau \dot{\sigma}}{2(\sigma^2 - 1)^{1/2}} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2 - 1)^{1/2}}{\varepsilon_0 \dot{\sigma} F_\tau G_\sigma} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} + \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} + \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right). \quad (5.1.112)$$

Таким образом, получена замкнутая система из 18 обыкновенных дифференциальных уравнений с 18-ю неизвестными:  $\sigma, \tau, \xi, \eta, F_\sigma, G_\sigma, F_\tau, G_\tau, f_\sigma, g_\tau, \sigma_V, \tau_V, \xi_V, \eta_V, F_\sigma^V, G_\sigma^V, F_\tau^V, G_\tau^V$ :

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

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

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

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

$$\begin{aligned}
\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} kT} \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} kT} \right) (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2} + \right. \\
&\quad \left. + \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} g_\tau \right) \dot{\tau} \quad (5.1.113)
\end{aligned}$$

Полученная система (5.113) дифференциальных уравнений первого порядка решается с помощью численного метода Рунге-Кутты 4 порядка. В результате получаются траектория крайнего электрона (рисунок 5.2), определяющая форму и размер пучка, распределения плотности заряда и напряженности электрического поля.

В результате получаются траектории крайних электронов (рисунок 5.2), определяющие формы и размер пучков. На основе полученных данных из системы уравнений также можно определить ВАХ эмиттера.

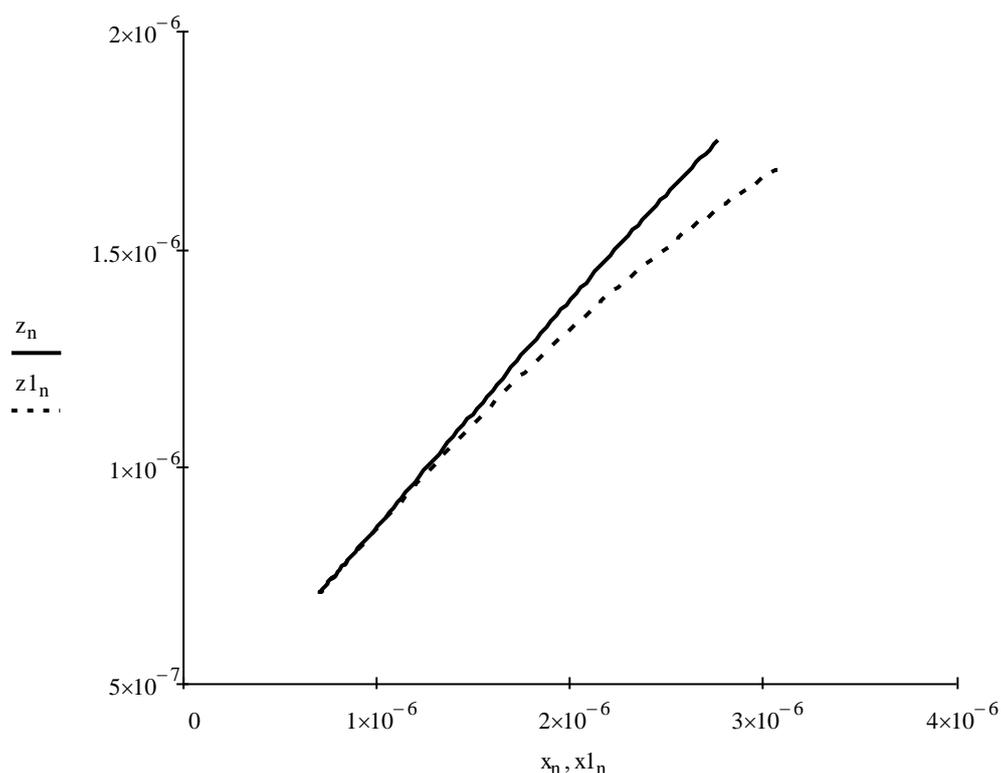


Рисунок 5.2. Траектории крайних электронов пучка под воздействием электрического поля при различных магнитных полях с учетом пространственного заряда пучка (все начальные значения искомых величин и условия одинаковые кроме значений индукции магнитного поля:  $B_1 > B_2$  сплошная траектория – 1, пунктирная траектория – 2).

По мнению авторов, предлагаемая модель может быть использована для построения физико-математических моделей с определенными эмиссионными параметрами и ВАХ ТПК в разработке модификаций СЭМ для повышения качества изображений биологических объектов и снижения количества артефактов при использовании режимов с низкими ускоряющими напряжениями без применения напыления поверхностей проводящими покрытиями.

### 5.1.2. Математическое моделирование основных эмиссионных характеристик полевого электронного катода сканирующего электронного микроскопа

В отличие от математической модели основных эмиссионных характеристик ТПЭЖ в модели ПЭЖ (математическая модель 2) вместо уравнения РД используется для определения плотности тока на поверхности катода уравнение 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.

Таким образом, в данной модели используются следующие уравнения, которые решаются в эллипсоидальной и параболоидальной системах координат при соответствующих аппроксимациях форм катодов эллипсоидом вращения и параболоидом:

1) уравнение движения крайнего электрона:

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

2) соответствующие 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:

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

6) уравнение 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;

7) и 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 данной модели проводятся аналогичные первой модели преобразования дифференциальных уравнений в частных производных первого и второго порядка в обыкновенные дифференциальные уравнения первого порядка. Различие от первой модели заключается в формулах, связанных с плотностью тока, т.к. для ПЭК используется формула Фаулера-Нордгейма (ФН).

Для эллипсоидального ПЭК на поверхности катода по закону ФН имеем:

$$g_{\sigma}(\tau) = \frac{a_0}{f_{\sigma}(\sigma_0)} \frac{F_{\sigma}^2(\sigma_0) G_{\sigma}^2(\tau)}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_0(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}}{F_{\sigma}(\sigma_0) G_{\sigma}(\tau)}\right) \quad (5.2.1)$$

или

$$g_{\sigma}(\tau) = \frac{a_1 G_{\sigma}^2(\tau)}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}}{G_{\sigma}(\tau)}\right), \quad (5.2.2)$$

где  $a_1 = \frac{a_0 F_{\sigma}^2(\sigma_0)}{f_{\sigma}(\sigma_0)}$ ,  $b_1 = \frac{b_0}{F_{\sigma}(\sigma_0)}$ .

Подставляем (5.2.1) и (5.2.2) в (5.1.69) и (5.1.70):

$$\dot{f}_{\sigma} = \frac{c_1 f_{\sigma} \dot{\tau}}{g_{\tau}(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} \frac{a_1 G_{\sigma}^2}{(1 - \tau^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}}{G_{\sigma}}\right) - \frac{\sigma}{\sigma^2 - 1} f_{\sigma} \dot{\sigma}, \quad (5.2.3)$$

$$\dot{g}_{\tau} = \left(-\frac{c_1}{(1 - \tau^2)^{1/2}} \frac{a_1 G_{\sigma}^2}{(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1(\sigma^2 - \tau^2)^{1/2}}{G_{\sigma}}\right) + \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} g_{\tau}\right) \dot{\tau}. \quad (5.2.4)$$

В итоге также получаются 18 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка с 18-ю неизвестными

$$\begin{aligned} & \sigma, \tau, \xi, \eta, F_{\sigma}, G_{\sigma}, F_{\tau}, G_{\tau}, f_{\sigma}, g_{\tau}, \sigma_V, \tau_V, \xi_V, \eta_V, F_{\sigma}^V, G_{\sigma}^V, F_{\tau}^V, G_{\tau}^V: \\ & \dot{\sigma}_V = \frac{\sigma_V^2 - 1}{\sigma_V^2 - \tau_V^2} (\xi_V \tau_V + \eta_V \sigma_V (1 - \tau_V^2)), \\ & \dot{\tau}_V = \frac{1 - \tau_V^2}{\sigma_V^2 - \tau_V^2} (\xi_V \sigma_V - \eta_V \tau_V (\sigma_V^2 - 1)), \\ & \dot{\xi}_V = \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} (\tau_V (\sigma_V^2 - 1)^{1/2} F_{\sigma}^V G_{\sigma}^V + \sigma_V (1 - \tau_V^2)^{1/2} F_{\tau}^V G_{\tau}^V), \\ & \dot{\eta}_V = K_V + \frac{e}{am(\sigma_V^2 - \tau_V^2)} \left( \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_{\sigma}^V G_{\sigma}^V - \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} F_{\tau}^V G_{\tau}^V \right) - \eta_V^2, \\ & \dot{F}_{\tau}^V = \frac{c_2}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_{\sigma}^V \dot{\sigma}_V, \\ & \dot{G}_{\sigma}^V = \frac{c_2}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_{\tau}^V \dot{\tau}_V, \\ & \dot{F}_{\sigma}^V = \left( \frac{c_3}{(\sigma_V^2 - 1)^{1/2}} F_{\tau}^V - \frac{\sigma_V}{\sigma_V^2 - 1} F_{\sigma}^V \right) \dot{\sigma}_V, \\ & \dot{G}_{\tau}^V = \left( -\frac{c_3}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_{\sigma}^V + \frac{\tau_V}{(1 - \tau_V^2)^{1/2}} G_{\tau}^V \right) \dot{\tau}_V, \\ & \dot{\sigma} = \frac{\sigma^2 - 1}{\sigma^2 - \tau^2} (\xi \tau + \eta \sigma (1 - \tau^2)), \\ & \dot{\tau} = \frac{1 - \tau^2}{\sigma^2 - \tau^2} (\xi \sigma - \eta \tau (\sigma^2 - 1)), \\ & \dot{\xi} = \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)} (\tau (\sigma^2 - 1)^{1/2} F_{\sigma} G_{\sigma} + \sigma (1 - \tau^2)^{1/2} F_{\tau} G_{\tau}), \\ & \dot{\eta} = K + \frac{e}{am(\sigma^2 - \tau^2)} \left( \frac{\sigma}{(\sigma^2 - 1)^{1/2}} F_{\sigma} G_{\sigma} - \frac{\tau}{(1 - \tau^2)^{1/2}} F_{\tau} G_{\tau} \right) \eta^2, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \dot{G}_\sigma &= \frac{c_4 G_\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} \dot{\tau}, \\ \dot{F}_\tau &= \frac{c_4 F_\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} \dot{\sigma}, \\ \dot{G}_\tau &= \frac{G_\sigma \dot{\tau}}{2(1-\tau^2)^{1/2}} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2-1)^{1/2}}{\varepsilon_0 \dot{\sigma} F_\tau G_\sigma} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} - \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \\ \dot{F}_\sigma &= \frac{F_\tau \dot{\sigma}}{2(\sigma^2-1)^{1/2}} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma (\sigma^2-1)^{1/2}}{\varepsilon_0 \dot{\sigma} F_\tau G_\sigma} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{\sigma}{(\sigma^2-1)^{1/2}} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{\tau}{(1-\tau^2)^{1/2}} + \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \\ \dot{f}_\sigma &= \frac{c_1 f_\sigma \dot{\tau}}{g_\tau (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}} \frac{a_1 G_\sigma^2}{(1-\tau^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1 (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}}{G_\sigma}\right) - \frac{\sigma}{\sigma^2-1} f_\sigma \dot{\sigma}, \\ \dot{g}_\tau &= \left( -\frac{c_1}{(1-\tau^2)^{1/2}} \frac{a_1 G_\sigma^2}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1 (\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}}{G_\sigma}\right) + \frac{\tau}{1-\tau^2} g_\tau \right) \dot{\tau}. \end{aligned} \quad (5.2.5)$$

Полученная система (5.2.5) дифференциальных уравнений первого порядка решается с помощью численного метода Рунге-Кутты 4 порядка. В результате получаются траектории крайних электронов (рисунок 5.3), определяющих формы и размеры пучков, распределения плотности заряда и напряженности электрического поля.

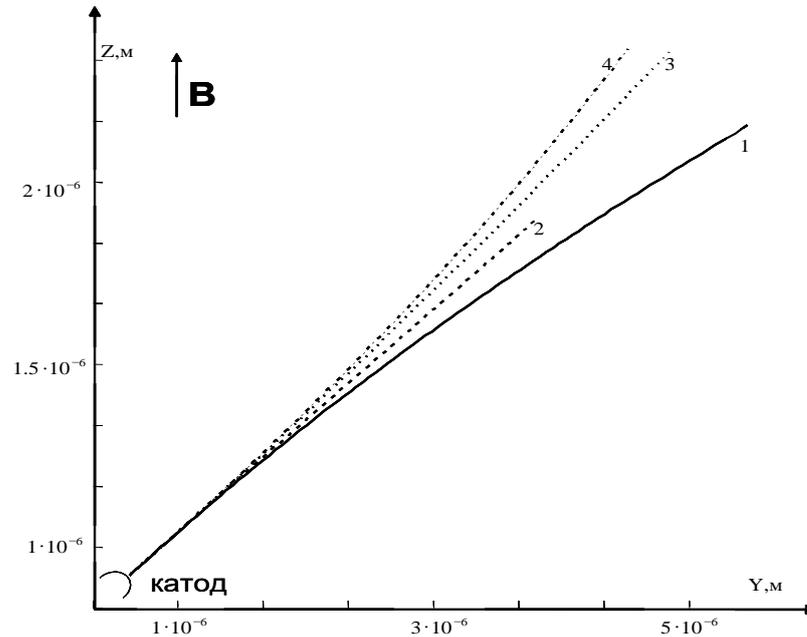


Рисунок 5.3. Сравнение траекторий крайнего электрона эллипсоидального катода с учетом и без учета пространственного заряда во внешнем магнитном поле  $B = 15\text{Тл}$  и без него: 1 — с учетом пространственного заряда без внешнего магнитного поля; 2 — с учетом пространственного заряда во внешнем магнитном поле; 3 — без учета пространственного заряда и внешнего магнитного поля; 4 — без учета пространственного заряда во внешнем магнитном поле.

По результатам исследования видно, что продольное внешнее магнитное поле оказывает на пучок фокусирующее воздействие, что соответствует физической сущности; учет пространственного заряда пучка расширяет пучок.

Также приведены зависимости эмиссионных характеристик (рисунки 5.4–5.7). Из (рисунок 5.6) видно, что чем больше магнитное поле, тем с меньшей скоростью достигает анод краевой электрон пучка. Зависимость радиуса анодного пятна от внешнего магнитного поля показывает, что чем больше  $B$ , тем меньше анодное пятно (рисунок 5.7).

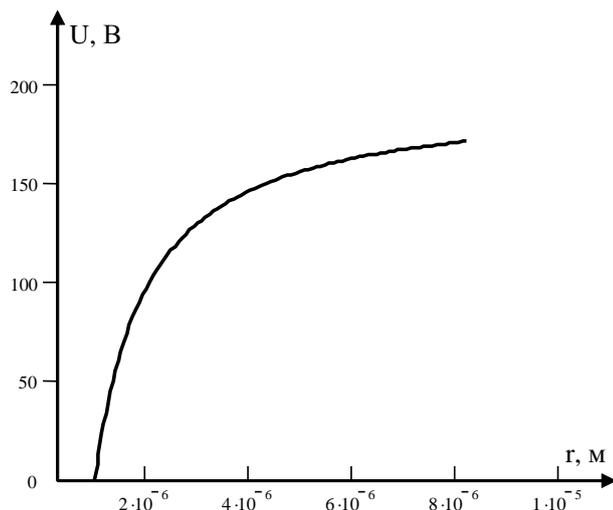


Рисунок 5.4. Распределение потенциала  $U$  внутри пучка по  $r$  — расстоянию от катода.

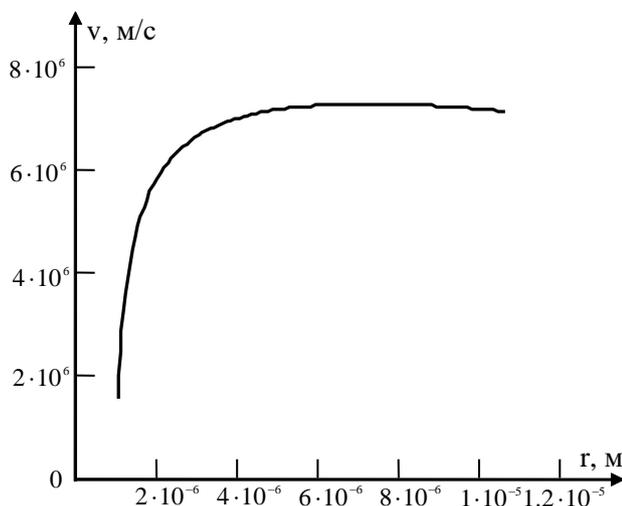


Рисунок 5.5. Зависимость скорости  $v$  крайнего электрона от  $r$  — расстояния от катода.

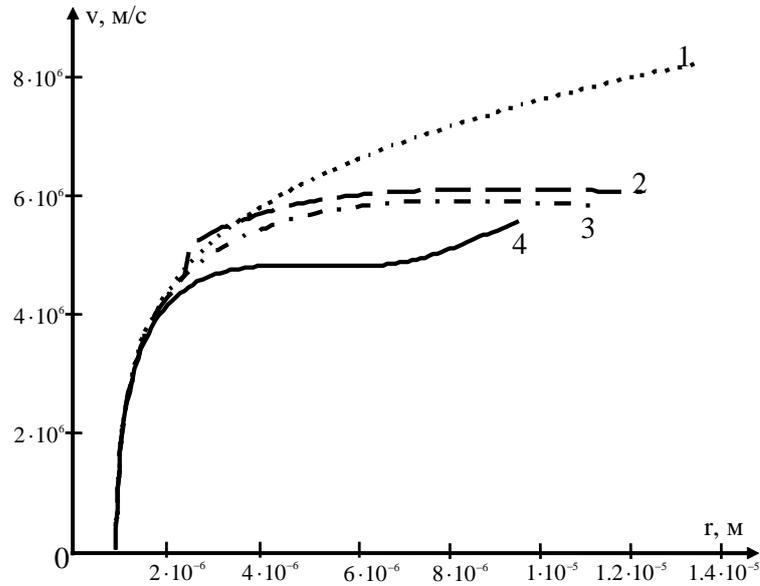


Рисунок 5.6. Зависимость скорости  $v$  крайнего электрона от  $r$  — расстояния от катода — в зависимости от величины внешнего магнитного поля: 1 —  $B = 0$  Тл; 2 —  $B = 5$  Тл; 3 —  $B = 10$  Тл; 4 —  $B = 15$  Тл.

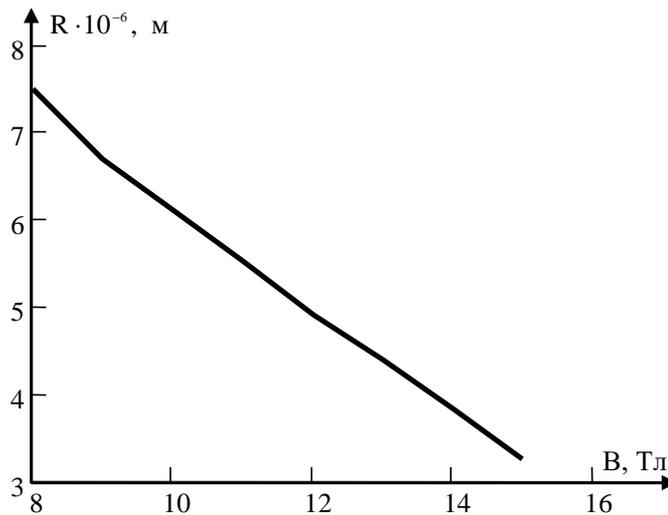


Рисунок 5.7. Зависимость радиуса  $R$  анодного пятна от величины внешнего магнитного поля  $B$ .

### Вольт-амперная характеристика эллипсоидального полевого электронного катода

Распределение потенциала находим как:

$$U = \frac{-aG_{\sigma}F_{\tau}}{c_2} + c. \quad (5.2.6)$$

На поверхности катода потенциал равен нулю:

$$0 = \frac{-aG_{\sigma}(\tau_0)F_{\tau}(\sigma_0)}{c_2} + c. \quad (5.2.7)$$

При  $\sigma = \sigma_1$  потенциал на аноде равен  $U_0$ :

$$U_0 = \frac{-aG_\sigma(\tau_1)F_\tau(\sigma_1)}{c_2} + c. \quad (5.2.8)$$

Из закона сохранения энергии имеем:

$$\frac{mv_1^2}{2} = eU_0. \quad (5.2.9)$$

Зная конечную скорость, отсюда можно найти  $U_0$ :

$$U_0 = \frac{mv_1^2}{2e}.$$

Тогда, используя уравнения (5.2.6) – (5.2.9), найдем распределение потенциала:

$$U = \frac{(G_\sigma(\tau_0)F_\tau(\sigma_0) - G_\sigma(\tau)F_\tau(\sigma))U_0}{(G_\sigma(\tau_0)F_\tau(\sigma_0) - G_\sigma(\tau_1)F_\tau(\sigma_1))}. \quad (5.2.10)$$

Полный ток диода находится интегрированием плотности тока по поверхности катода:

$$J = \int_{s_0} j_\sigma(\sigma_0, \tau) ds,$$

$$ds = \frac{\sqrt{g}}{g_{\sigma\sigma}} d\tau d\phi,$$

$$ds = a(\sigma^2 - 1)d\tau d\phi,$$

$$J = \int_0^{\tau_0} \int_0^{2\pi} \frac{f_\sigma(\sigma_0)g_\sigma(\tau)}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}} a(\sigma_0^2 - 1)d\tau d\phi$$

или с учетом (5.1.75)

$$J = 2\pi a(\sigma_0^2 - 1)f_\sigma(\sigma_0)a_1 \int_0^{\tau_0} \frac{(G_\sigma(\tau))^2}{(\sigma_0^2 - \tau^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1\sqrt{\sigma_0^2 - \tau^2}}{G_\sigma(\tau)}\right) d\tau. \quad (5.2.11)$$

С учетом (5.2.10) и (5.2.11) построена ВАХ эллипсоидального полевого катода, находящегося под воздействием фокусирующего пучок магнитного поля (рисунок 5.8).

В результате исследования явления ПЭЭ в эллипсоидальном диоде во внешнем магнитном поле, с учетом пространственного заряда также наблюдается отклонение ВАХ от прямой в области больших токов. Как упоминали выше, отклонение ВАХ от прямой в режиме отбора больших токов наблюдается в экспериментальных исследованиях.

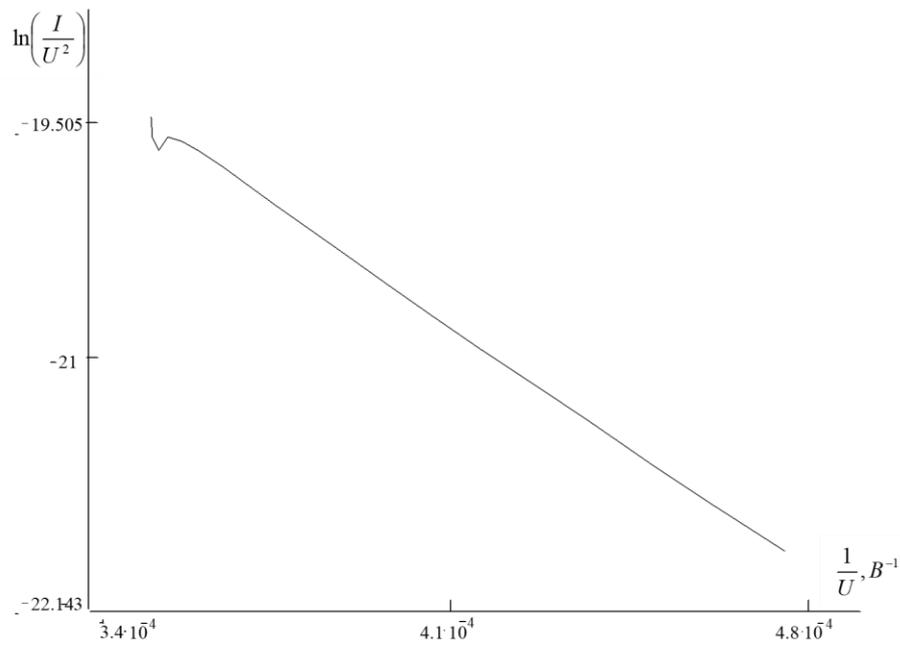


Рисунок 5.8. ВАХ эллипсоидального ПЭК в координатах ФН: зависимость  $\ln\left(\frac{I}{U^2}\right)$  от  $\frac{1}{U}$ , где  $I$  — сила тока,  $U$  — напряжение.

### 5.1.3. Параболоидальный катод сканирующего электронного микроскопа в продольном магнитном поле

В математической модели 3 исследуются основные эмиссионные характеристики острейного ПЭК (рисунок 5.9), который моделируется параболоидом вращения с поверхностной координатой  $\sigma_0$ , а анод моделируется эквипотенциальной поверхностью.

Направление магнитного поля совпадает с направлением оси симметрии диода — осью  $Z$ . Будем считать, что электронная эмиссия происходит с ограниченного участка, которому соответствует параболоидальная координата  $\tau_0$ , определяемая из условия, что угол расходимости пучка  $\theta_0$ .

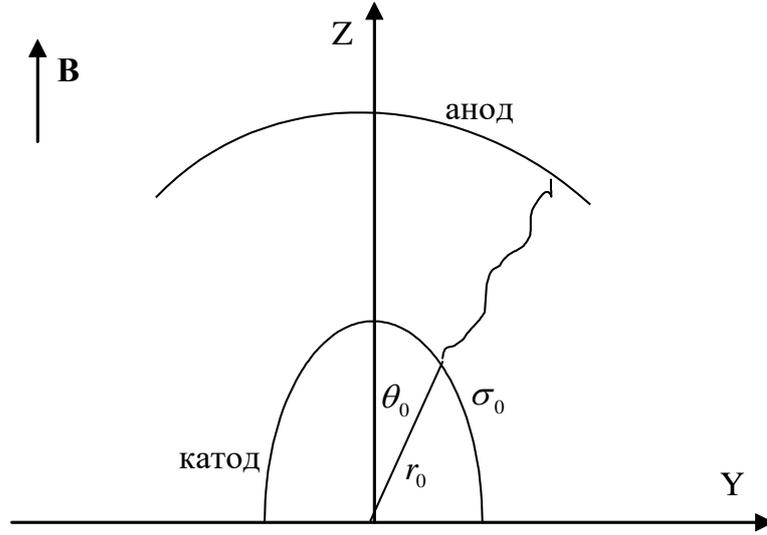


Рисунок 5.9. Параболоидальный катод.

Диодная система является аксиально-симметричной, поэтому решение ищем в виде:

$$\vec{E} = E_\sigma(\sigma, \tau)\vec{e}_\sigma + E_\tau(\sigma, \tau)\vec{e}_\tau, \quad (5.3.1)$$

$$j = j(\sigma, \tau). \quad (5.3.2)$$

Чтобы решить задачу определения основных эмиссионных характеристик данного ПЭК воспользуемся математической моделью 1. Решение будем искать, используя следующее представление:

$$\vec{E} = \frac{F_\sigma(\sigma)G_\sigma(\tau)}{(\sigma^2 + \tau^2)^{1/2}}\vec{e}_\sigma + \frac{F_\tau(\sigma)G_\tau(\tau)}{(\sigma^2 + \tau^2)^{1/2}}\vec{e}_\tau, \quad (5.3.3)$$

$$\vec{j} = \frac{f_\sigma(\sigma)g_\sigma(\tau)}{(\sigma^2 + \tau^2)^{1/2}}\vec{e}_\sigma + \frac{f_\tau(\sigma)g_\tau(\tau)}{(\sigma^2 + \tau^2)^{1/2}}\vec{e}_\tau. \quad (5.3.4)$$

Исследуется движение крайнего электрона вне пучка под воздействием электрического поля  $\vec{E}$  и продольного магнитного поля  $\vec{B}$ , с учетом пространственного заряда. Движение описывается уравнениями движения (5.1), а напряженность электрического поля как (5.2), которые позволяют получить восемь дифференциальных уравнений с восемью неизвестными ( $\sigma_V, \tau_V, \xi_V, \eta_V, F_\sigma^V, G_\sigma^V, F_\tau^V, G_\tau^V$ ):

$$\begin{aligned} \dot{\xi}_V &= \frac{e}{m} \left( \frac{\sigma_V}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} E_\sigma^V - \frac{\tau_V}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} E_\tau^V \right), \\ \dot{\eta}_V &= K^V + \frac{e}{m} \left( \frac{1}{\sigma_V} \frac{E_\sigma^V}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} + \frac{1}{\tau_V} \frac{E_\tau^V}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} \right) - \eta_V^2, \\ \dot{\sigma}_V &= \frac{\sigma_V \xi_V + \sigma_V \tau_V^2 \eta_V}{\sigma_V^2 + \tau_V^2}, \\ \dot{\tau}_V &= -\frac{\tau_V \xi_V + \sigma_V^2 \tau_V \eta_V}{\sigma_V^2 + \tau_V^2}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\dot{F}_\sigma^V &= c_3 F_\tau^V \dot{\sigma}_V - \frac{F_\sigma^V}{\sigma_V} \dot{\sigma}_V, \\
\dot{G}_\tau^V &= -c_3 G_\sigma^V \dot{\tau}_V - \frac{G_\tau^V}{\tau_V} \dot{\tau}_V, \\
\dot{F}_\tau^V &= c_2 F_\sigma^V \dot{\sigma}_V, \\
\dot{G}_\sigma^V &= c_2 G_\tau^V \dot{\tau}_V,
\end{aligned} \tag{5.3.5}$$

где были введены обозначения:

$$\begin{aligned}
\xi_V &= \sigma_V \dot{\sigma}_V - \tau_V \dot{\tau}_V, \\
\eta_V &= \frac{\dot{\sigma}_V}{\sigma_V} + \frac{\dot{\tau}_V}{\tau_V},
\end{aligned} \tag{5.3.6}$$

$$K^V = \dot{\phi}_V \left( \phi_V + \frac{eB}{m} \right), \tag{5.3.7}$$

$$\dot{\phi}_V = -\frac{eB}{2m} + \left( W + \frac{eB}{2m} \right) \frac{\sigma_0^2 \tau_0^2}{\sigma_V^2 \tau_V^2}, \tag{5.3.8}$$

где  $W = \dot{\phi}_0$ .

Внутри пучка исследование траектории крайнего электрона производится с использованием уравнений (5.3) – (5.6), приводящее к девяти уравнениям с десятью неизвестными ( $\xi, \eta, \sigma, \tau, F_\sigma, G_\sigma, F_\tau, G_\tau, f_\sigma, g_\tau$ ):

$$\begin{aligned}
\dot{\xi} &= \frac{e}{m} \left( \frac{\sigma F_\sigma G_\sigma}{\sigma^2 + \tau^2} - \frac{\tau F_\tau G_\tau}{\sigma^2 + \tau^2} \right), \\
\dot{\eta} &= K + \frac{e}{m} \left( \frac{1}{\sigma} \frac{F_\sigma G_\sigma}{\sigma^2 + \tau^2} + \frac{1}{\tau} \frac{F_\tau G_\tau}{\sigma^2 + \tau^2} \right) - \eta^2, \\
\dot{\sigma} &= \frac{\sigma \xi + \sigma \tau^2 \eta}{\sigma^2 + \tau^2}, \\
\dot{\tau} &= \frac{-\tau \xi + \sigma^2 \tau \eta}{\sigma^2 + \tau^2}, \\
\dot{G}_\sigma &= c_2 G_\tau \dot{\tau}, \\
\dot{F}_\tau &= c_2 F_\sigma \dot{\sigma}, \\
\dot{f}_\sigma &= c_1 a_1 \frac{F_\tau^2 \dot{\sigma}}{(\sigma^2 + \tau_0^2)^{1/2}} \exp \left( -\frac{b_1 (\sigma^2 + \tau_0^2)^{1/2}}{F_\tau} \right) - \frac{1}{\sigma} f_\sigma \dot{\sigma}, \\
\dot{g}_\tau &= -c_1 \frac{g_\tau \dot{\sigma}}{f_\sigma} a_1 \frac{F_\tau^2}{(\sigma^2 + \tau_0^2)^{1/2}} \exp \left( -\frac{b_1 (\sigma^2 - \tau_0^2)^{1/2}}{F_\tau} \right) - \frac{1}{\tau} g_\tau \dot{\tau} + \frac{1}{F_\tau} \frac{\dot{F}_\sigma}{\dot{\sigma}} + \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{1}{\sigma} + \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{1}{\tau} + \frac{1}{G_\sigma} \frac{\dot{G}_\tau}{\dot{\tau}} = \\
& \frac{f_\sigma g_\sigma}{\varepsilon_0 (\sigma^2 + \tau^2) G_\sigma F_\tau \sigma \tau \dot{\sigma}}, \tag{5.3.9}
\end{aligned}$$

где

$$a_1 = \frac{a}{g_\tau(\tau_0)} G_\tau^2(\tau_0), \quad b_1 = \frac{b}{G_\tau(\tau_0)}, \quad (5.3.10)$$

$$K = \dot{\phi} \left( \dot{\phi} + \frac{eB}{m} \right), \quad (5.3.11)$$

$$\dot{\phi} = -\frac{eB}{2m} + \left( W + \frac{eB}{2m} \right) \frac{\sigma_0^2 \tau_0^2}{\sigma^2 \tau^2}, \quad (5.3.12)$$

где  $W = \dot{\phi}_0$  при  $\sigma = \sigma_0, \tau = \tau_0$ .

Использование задания условия на границе пучок-вакуум позволяет связать полученные две системы и найти недостающее десятое уравнение. Решая совместно уравнение

$$\frac{1}{F_\tau} \frac{\dot{F}_\sigma}{\dot{\sigma}} + \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{1}{\sigma} + \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{1}{\tau} + \frac{1}{G_\sigma} \frac{\dot{G}_\tau}{\dot{\tau}} = \frac{f_\sigma g_\sigma}{\varepsilon_0(\sigma^2 + \tau^2) G_\sigma F_\tau \sigma \tau \dot{\sigma}} \quad (5.3.13)$$

при условии

$$\frac{\dot{\sigma}_V}{\dot{\tau}_V} = \frac{\dot{\sigma}}{\dot{\tau}}, \quad (5.3.14)$$

найдем следующие уравнения для  $G_\tau$  и  $F_\sigma$ :

$$\dot{G}_\tau = \frac{G_\sigma \dot{\tau}}{2} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma}{\varepsilon_0(\sigma^2 + \tau^2) G_\sigma F_\tau \sigma \tau \dot{\sigma}} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{1}{\sigma} - \frac{1}{\tau} \frac{G_\tau}{G_\sigma} - \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \quad (5.3.15)$$

$$\dot{F}_\tau = \frac{F_\tau \dot{\sigma}}{2} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma}{\varepsilon_0(\sigma^2 + \tau^2) G_\sigma F_\tau \sigma \tau \dot{\sigma}} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{1}{\sigma} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{1}{\tau} + \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right). \quad (5.3.16)$$

Представляем всю систему:

$$\dot{\xi} = \frac{e}{m} \left( \frac{\sigma F_\sigma G_\sigma}{\sigma^2 + \tau^2} - \frac{\tau F_\tau G_\tau}{\sigma^2 + \tau^2} \right),$$

$$\dot{\eta} = K + \frac{e}{m} \left( \frac{1}{\sigma} \frac{F_\sigma G_\sigma}{\sigma^2 + \tau^2} + \frac{1}{\tau} \frac{F_\tau G_\tau}{\sigma^2 + \tau^2} \right) - \eta^2,$$

$$\dot{\sigma} = \frac{\sigma \xi + \sigma \tau^2 \eta}{\sigma^2 + \tau^2},$$

$$\dot{\tau} = \frac{-\tau \xi + \sigma^2 \tau \eta}{\sigma^2 + \tau^2},$$

$$\dot{\xi}_V = \frac{e}{m} \left( \frac{\sigma_L}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} E_\sigma^V - \frac{\tau_V}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} E_\tau^V \right),$$

$$\dot{\eta}_V = K^V + \frac{e}{m} \left( \frac{1}{\sigma_V} \frac{E_\sigma^V}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} + \frac{1}{\tau_V} \frac{E_\tau^V}{(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^{1/2}} \right) - \eta_V^2,$$

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

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

$$\begin{aligned}
\dot{F}_\sigma^V &= c_3 F_\tau^V \dot{\sigma}_V - \frac{F_\sigma^V}{\sigma_V} \dot{\sigma}_V, \\
\dot{G}_\tau^V &= -c_3 G_\sigma^V \dot{\tau}_V - \frac{G_\tau^V}{\tau_V} \dot{\tau}_V, \\
\dot{F}_\tau^V &= c_2 F_\sigma^V \dot{\sigma}_V, \\
\dot{G}_\sigma^V &= c_2 G_\tau^V \dot{\tau}_V, \\
\dot{f}_\sigma &= c_1 a_1 \frac{F_\tau^2 \dot{\sigma}}{(\sigma^2 + \tau_0^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1(\sigma^2 + \tau_0^2)^{1/2}}{F_\tau}\right) - \frac{1}{\sigma} f_\sigma \dot{\sigma}, \\
\dot{g}_\tau &= -c_1 \frac{g_\tau \dot{\sigma}}{f_\sigma} a_1 \frac{F_\tau^2}{(\sigma^2 + \tau_0^2)^{1/2}} \exp\left(-\frac{b_1(\sigma^2 + \tau_0^2)^{1/2}}{F_\tau}\right) - \frac{1}{\tau} g_\tau \dot{\tau}, \\
\dot{G}_\sigma &= c_2 G_\tau \dot{\tau}, \\
\dot{F}_\tau &= c_2 F_\sigma \dot{\sigma}, \\
\dot{G}_\tau &= \frac{G_\sigma \dot{\tau}}{2} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma}{\varepsilon_0(\sigma^2 + \tau^2) G_\sigma F_\tau \sigma \tau \dot{\sigma}} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{1}{\sigma} - \frac{1}{\tau} \frac{G_\tau}{G_\sigma} - \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \\
\dot{F}_\tau &= \frac{F_\tau \dot{\sigma}}{2} \left( \frac{f_\sigma g_\sigma}{\varepsilon_0(\sigma^2 + \tau^2) G_\sigma F_\tau \sigma \tau \dot{\sigma}} - \frac{F_\sigma}{F_\tau} \frac{1}{\sigma} - \frac{G_\tau}{G_\sigma} \frac{1}{\tau} + \frac{B_3}{\dot{\sigma}} \right), \quad (5.3.17)
\end{aligned}$$

где

$$B_3 = \frac{m(\eta_V B_1 - \xi_V B_2 + A)(\sigma^2 + \tau^2)\eta}{e \left(\frac{\xi}{\sigma} - \sigma\eta\right) F_\tau G_\sigma \eta_V}, \quad (5.3.18)$$

$$\begin{aligned}
B_1 &= \frac{e}{m \sigma^2 + \tau^2} (\dot{\sigma} F_\sigma G_\sigma + \sigma F_\sigma \dot{G}_\sigma - \dot{\tau} F_\tau G_\tau - \tau \dot{F}_\tau G_\tau) - \\
&\quad - \frac{2e(\sigma\dot{\sigma} - \tau\dot{\tau})}{m(\sigma^2 + \tau^2)^2} (\sigma F_\sigma G_\sigma - \tau F_\tau G_\tau), \quad (5.3.19)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
B_2 &= \frac{e}{m} \frac{\left(-\frac{\dot{\sigma}}{\sigma^2} F_\sigma G_\sigma + \frac{1}{\sigma} F_\sigma \dot{G}_\sigma - \frac{\dot{\tau}}{\tau^2} F_\tau G_\tau + \frac{1}{\tau} \dot{F}_\tau G_\tau\right)}{\sigma^2 + \tau^2} - \\
&\quad - \frac{2e(\sigma\dot{\sigma} + \tau\dot{\tau})}{m(\sigma^2 + \tau^2)^2} \left(\frac{1}{\sigma} F_\sigma G_\sigma + \frac{1}{\tau} F_\tau G_\tau\right) - 2\eta\dot{\eta} + \dot{K}, \quad (5.3.20)
\end{aligned}$$

$$\dot{K} = -\left(\frac{eB}{m}\right)^2 \left(\frac{\sigma_0 \tau_0}{\sigma \tau}\right)^4 \eta \left(\frac{2m}{eB} W + 1\right)^2, \quad (5.3.21)$$

$$A = \xi \ddot{\eta}_V + 2(\dot{\xi} \dot{\eta}_V - \dot{\xi}_V \dot{\eta}) - \dot{\xi}_V \eta, \quad (5.3.22)$$

$$\dot{\xi}_V = \frac{e}{m} \frac{1}{\sigma_V^2 + \tau_V^2} (\sigma_V \dot{F}_\sigma^V G_\sigma^V - \tau_V F_\tau^V \dot{G}_\tau^V) + B_1^V, \quad (5.3.23)$$

$$\begin{aligned}
B_1^V &= \frac{e}{m} \frac{(\dot{\sigma}_V F_\sigma^V G_\sigma^V + \sigma_V F_\sigma^V \dot{G}_\sigma^V - \dot{\tau}_V F_\tau^V G_\tau^V - \tau_V \dot{F}_\tau^V G_\tau^V)}{\sigma^2 + \tau^2} - \\
&\quad - \frac{2e(\sigma_V \dot{\sigma}_V + \tau_V \dot{\tau}_V)}{m(\sigma_V^2 + \tau_V^2)} (\sigma_V F_\sigma^V G_\sigma^V - \tau_V F_\tau^V G_\tau^V), \quad (5.3.24)
\end{aligned}$$

$$\dot{\eta}_V = \frac{e}{m} \left(\frac{1}{\sigma_V} \dot{F}_\sigma^V G_\sigma^V + \frac{1}{\tau_V} F_\tau^V \dot{G}_\tau^V\right) + B_2^V, \quad (5.3.25)$$

$$B_2^V = \dot{K}_V + \frac{e}{m} \frac{\left( -\frac{\dot{\sigma}_V}{\sigma_V^2} F_\sigma^V G_\sigma^V + \frac{1}{\sigma_V} F_\sigma^V \dot{G}_\sigma^V - \frac{\dot{\tau}_V}{\tau_V^2} F_\tau^V G_\tau^V + \frac{1}{\tau_V} \dot{F}_\tau^V G_\tau^V \right)}{\sigma_V^2 + \tau_V^2} - \frac{2e(\sigma_V \dot{\sigma}_V + \tau_V \dot{\tau}_V)}{m(\sigma_V^2 + \tau_V^2)^2} \left( \frac{1}{\sigma_V} F_\sigma^V G_\sigma^V + \frac{1}{\tau_V} F_\tau^V G_\tau^V \right) - 2\eta_V \dot{\eta}_V, \quad (5.3.26)$$

$$\dot{K}_V = - \left( \frac{eB}{m} \right)^2 \left( \frac{\sigma_0 \tau_0}{\sigma_V \tau_V} \right)^4 \eta_V \left( \frac{2m}{eB} W + 1 \right)^2. \quad (5.3.27)$$

В итоге решения системы методом Рунге-Кутта получаем траекторию крайнего электрона.

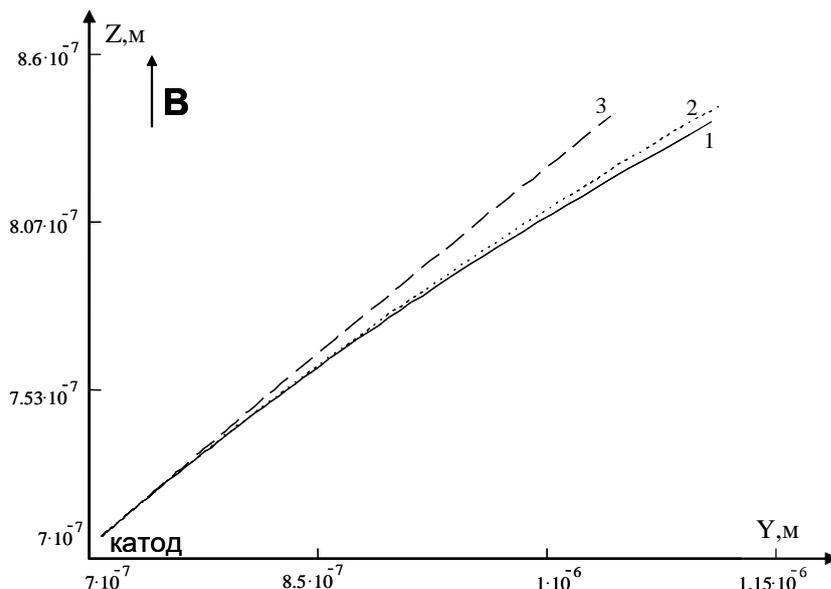


Рисунок 5.10. Сравнение траекторий крайнего электрона параболоидного катода с учетом пространственного заряда во внешнем магнитном поле при его различных значениях: 1 — без влияния внешнего магнитного поля  $B_1 = 0$  Тл; 2 — во внешнем магнитном поле  $B_2$ ; 3 — во внешнем магнитном поле  $B_3$  ( $B_3 > B_2$ ).

Сравнение траекторий крайних электронов параболоидного диода при различных условиях (рисунок 5.10), показывает, что учет пространственного заряда приводит к расширению пучка, а внешнее продольное магнитное поле фокусирует пучок.

В этом параграфе были разработаны три математических модели ТПЭК и ПЭК, аппроксимированные различными поверхностями второго порядка, которые представляют собой системы уравнений в частных производных первого и второго порядков. Для решения данных систем уравнений они были приведены к трем системам обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка путем проведения преобразований с использованием метода разделения переменных. Полученные системы, каждая из которых состоит из 18 дифференциальных уравнений первого порядка, были

рассчитаны с помощью численного метода Рунге—Кутта 4 порядка. Численный расчет был произведен с помощью MathCad 15.

В ходе численного эксперимента были получены координаты движения крайнего электрона, определяющие форму и размер пучка, значения напряженности электрического поля, плотности тока при различных условиях: с учетом пространственного заряда; без влияния внешнего магнитного поля и при разных значениях индукции внешнего магнитного поля. Сравнение траекторий крайних электронов параболоидного диода при различных условиях, показывает, что учет пространственного заряда приводит к расширению пучка, а внешнее продольное магнитное поле фокусирует пучок.

Полученные 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, позволяют определить эмиссионные характеристики ТПЭК и ПЭК электронно-оптической системы с уточнением формы и размеров ТПЭК и ПЭК, производить выбор оптимального режима работы СЭМ и т.д. Кроме того, на основе этих исследований, возможно, можно говорить о целесообразности производства СЭМ с определенными эмиссионными характеристиками для исследований биообразцов в медицине для разработки новых и развития уже применяемых методов диагностики и терапии, в междисциплинарных научно-исследовательских работах с улучшением качества изображения.

## **5.2. Математическое моделирование физических свойств эритроцитов в патологии на основе экспериментальных данных при исследовании морфологии эритроцитов методом сканирующей электронной микроскопии**

В настоящее время математическое моделирование биологических процессов в норме и при патологии является актуальным направлением биомедицины.

Исследования морфологии эритроцитов при РШМ, заболеваниях почек у детей с синдромом гематурии показывают, что при этих патологиях наблюдаются существенные изменения форм и размеров эритроцитов [159,167,333] в образцах и венозной, и капиллярной крови.

Микрососудистое русло является терминальным отделом сердечно-сосудистой системы, которое первым реагирует и подвергается значительным морфофункциональным изменениям при различных патологических состояниях, в том числе при раковых заболеваниях и патологиях почек. В связи с этим изучение процессов системы микроциркуляции на клеточном и молекулярном уровнях является актуальной проблемой в плане ранней диагностики и лечения заболеваний. Микроциркуляция и состояние клеток крови, в том числе эритроцитов, определяет состояние клеточного метаболизма, который зависит от степени гипоксии, которая способствует развитию метаболических, функциональных и морфологических нарушений в организме [334,335]. Микроциркуляторное русло является звеном сосудистой системы, которое испытывает наибольшее сопротивление кровотоку (до 70% общего сосудистого сопротивления) за счет его архитектоники, реологического поведения крови, и в частности эритроцитов, как наиболее многочисленных клеток микрокровотока [336]. Функционирование микроциркуляторной системы зависит от взаимодействия между клетками крови, в том числе в большей степени эритроцитов, плазмы и неизменного эндотелия сосудов, которое может нарушаться в условиях патологии [337].

Основной газообмен происходит в микрососудистом русле. Эффективность доставки кислорода в органы и ткани зависит от вязкости цельной крови, которая определяется вязкостью плазмы, уровнем гематокрита (концентрацией эритроцитов), деформируемостью и степенью агрегатообразования эритроцитов, их поверхностным зарядом [337, 338]. Т.е. агрегационные свойства эритроцитов и состояние их мембран имеют важное значение в сохранении или изменении текучих свойств крови. Эритроциты - самая многочисленная масса микрососудистого кровотока в наибольшей степени определяют эффективное кровоснабжение всех органов и тканей, сосудов через систему *vasa vasorum* [339]. Изменение состояния мембраны эритроцитов может способствовать изменению вязкости крови, развитию синдрома гипервязкости крови [340], например, во многом способствуя развитию сердечно-сосудистой патологии [341,342]. Реологические свойства крови в системах макроциркуляции и микроциркуляции играют незначительную и значимую роли соответственно вследствие того, что: диаметры сосудов в них отличаются достаточно сильно: размер кровеносных сосудов варьируется от 25 мм (диаметр аорты) до восьми мкм (диаметр капилляров); в крупных сосудах в отличие от мелких высока скорость кровотока и неньютоновские свойства не выражены

[343, 344]. Клеточные факторы микроциркуляции определяют формирование гемореологических расстройств, и в первую очередь эритроцитов, составляющих 98% от общего объема форменных элементов крови [345]. В связи с тем, что такие функциональные свойства красных кровяных клеток, как их агрегационная активность, деформируемость и суммарный поверхностный заряд являются важнейшими компонентами микроциркуляции и определяют текучесть крови на уровне микрососудов, изучение состояния мембраны эритроцитов представляется весьма актуальным. Кроме того, эритроцит как клетка является удобной моделью для изучения действия различных эндо- и экзогенных факторов, например, хронических сосудистых заболеваний, что позволяет использовать его в качестве объекта патологически измененного организма, а также в норме [346, 347]. Так, прогрессирование ряда заболеваний сопровождаются морфофункциональными изменениями форменных элементов крови, в частности, эритроцитов [348]. Например, нарушение функционального состояния мембран эритроцитов, в том числе их суммарный поверхностный заряд, можно рассматривать как один из патогенетических механизмов развития метаболического синдрома с его последующими сердечно-сосудистыми осложнениями [349]. Как известно, агрегационные свойства, эритроцитов определяются двумя основными внутрисосудистыми факторами: содержанием плазменных компонентов крови (ХС, ЛПНП, ТГ, ФГ и др.) и состоянием мембран самих эритроцитов [340,349]. Повышение агрегации эритроцитов происходит при патологических изменениях качественно-количественного состава плазмы крови и при биофизических и биохимических изменениях на уровне эритроцитарных мембран [350-352]. Выраженная патологическая агрегация эритроцитов затрудняет кровоток по мелким сосудам вплоть до их полной закупорки.

Деформируемость эритроцитов – это совокупность определенных физических свойств форменных элементов крови, придающих клетке механическую устойчивость по отношению к окружающей среде [340]. Известно, что в норме эритроциты движутся по сосуду быстрее, чем плазма. Геометрия эритроцита соответствует его назначению переносчика и передатчика кислорода [337]. Диаметры эритроцита и «жесткого капилляра» соизмеримы, поэтому деформируемость красных клеток является наиболее важным свойством для обеспечения микроциркуляции [353]. Форма эритроцитов в норме представляет собой двояковогнутый диск, благодаря которой эритроцит может свободно

передвигаться по микроциркуляторному руслу. Он может принимать любую конфигурацию и приспособливаться к форме сосуда за счет механических свойств мембраны, состоящей из двух структур – мембраны (липидный бислой и интегральные белки) и мембранного каркаса, находящегося внутри бислоя и состоящего из 5% актина, 75% спектрина и некоторых других белков [353]. Причинами снижения деформируемости мембраны эритроцитов могут быть повышенное накопление холестерина на наружном бислое мембраны и изменение содержания насыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембраны [354], истощение АТФ и значительное увеличение содержания цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , которые также могут способствовать увеличению степени агрегации эритроцитов. Известно, что АТФ поддерживает дисковидную форму эритроцитов и эластичность клеточной мембраны. Снижение АТФ-азной и  $K^+/Na^+$  активности эритроцитарной мембраны приводит к нарушению катионного баланса, в клетках накапливается  $Na$  и снижается содержание ионов  $K$ , что в свою очередь приводит к изменению осмотической и механической стойкости эритроцитов. При этом форма эритроцитов становится двояко выпуклой или сферической, создавая условия гиперкоагуляции. Вместе с этим происходят изменения электрического заряда эритроцитов, возрастает агрегационное свойство. Эритроциты с повышенной жесткостью обладают резко сниженной деформируемостью, что затрудняет их прохождение по капиллярам и измененным сосудам и ведет к разрушению в них красных клеток крови под воздействием высоких напряжений сдвига. Выявлено, что в условиях патологии в кровотоке наблюдаются эритроциты с диаметром более 7,5 мкм со сниженной деформируемостью и повышенной микровязкостью их мембран. При этом наблюдается явление микрогемолиза эритроцитов с увеличением содержания в крови свободных  $Hb$  и АДФ [355, 356]. Т.к. суммарный объем Эр в сосудистом русле примерно в 50 раз превышает объем лейкоцитов и тромбоцитов, то патологические нарушения их мембран оказывают первостепенное влияние на агрегационные свойства и свойства текучести крови. В условиях патологии возникают различные морфологические изменения мембран эритроцитов с пониженными деформационными свойствами, которые способствуют существенному замедлению внутрисосудистой микроциркуляции [357]. Образовавшиеся при этом малоподвижные эритроцитарные агрегаты увеличивают вязкость крови в микрососудах.

Пониженная деформируемость эритроцитов, повышающая их агрегационные свойства, играет основную роль в нарушении кровотока в микрососудах, что приводит к недостаточному транспорту питательных веществ в клетки организма. Кроме оценки риска осложнений исследование показателей морфологических свойств эритроцитов имеет и прогностическое значение. Например, было показано, что изменение пластичности эритроцитов, которая во многом зависит от электрического заряда их мембраны, происходит за несколько лет до регистрации повышенных цифр артериального давления [358]. Поэтому авторы предположили первичность изменений эритроцитов с последующими компенсаторными гемодинамическими изменениями (включающими повышение артериального давления). Повышение вязкости крови и агрегации эритроцитов способствуют увеличению общего периферического сосудистого сопротивления, что может увеличивать вероятность развития артериальной гипертензии [359].

Известно, что функциональное состояние эритроцитов зависит от значения поверхностного заряда их мембраны. В норме при физиологическом значении pH эритроциты на своей поверхности несут избыточный отрицательный заряд, обуславливающий электростатическое отталкивание клеток и обеспечивающий эффективное функционирование эритроцитов в кровотоке (Golub, Pittman, 2008). 60-90% отрицательного заряда эритроцита образовывается сиаловыми кислотами, остальная часть – некоторыми видами  $\alpha$ -карбокисильных групп и слабых основных групп [359].

Снижение поверхностного заряда эритроцита может произойти при изменении его мембранных свойств (при отщеплении сиаловых кислот) [359-361], под влиянием факторов внутрисосудистой микроциркуляции – pH крови, ее вязкостью, абсорбцией на мембране некоторых плазменных факторов и т.д. Так, при взаимодействии фибриногена с мембранами эритроцитов снижается их электрофоретическая подвижность [362]. Снижение поверхностного заряда эритроцитов способствует абсорбции на его мембранной поверхности белков [363]. Выявлены определенные корреляции изменений электрических характеристик эритроцита – зависимость суммарного поверхностного заряда эритроцитов от клинических проявлений при различных заболеваниях: артериальной гипертензии [364], сахарном диабете 2 типа [365], неалкогольном стеатогепатите [366]. Наблюдается повышение содержания обратимо и необратимо измененных форм эритроцитов на фоне нарастания их способности к

агрегатообразованию у больных с повышенной массой тела, что имеет место при метаболическом синдроме [354]. Создаются условия для развития сердечно-сосудистой патологии при повышении агрегации эритроцитов, в основном обусловленных их дисформией, т.е. увеличением в крови обратимо и необратимо измененных по форме эритроцитов с измененными электрическим потенциалом [367, 368]. В связи с этим есть основания полагать, что на поверхности эритроцитов происходит снижение количества отрицательных зарядов, ответственных за нахождение клеток в дезагрегированном состоянии. Зависимость величин суммарного поверхностного заряда эритроцитов от клинических признаков хронических сосудистых заболеваний были выявлены: в исследованиях Суриковой Т.П. и соавторов (1999 г.): высокая степень корреляционной связи у больных сахарным диабетом между уровнем электрического потенциала эритроцитов и декомпенсацией углеводного обмена, а также выраженностью диабетических ангиопатий и длительностью заболевания [365]; в работе Громова А.А. (2012 г.) прогрессивное снижение поверхностного заряда эритроцитов в зависимости от увеличения степени артериальной гипертонии [364]; патогенетическая роль электрического заряда эритроцитов и их деформируемости в развитии артериальной гипертензии [369]; зависимость уровня заряда эритроцитов от некоторых плазменных факторов микроциркуляции при хронических воспалительных заболеваниях, обусловленных прогрессированием воспалительного процесса, а именно с усилением перекисного окисления липидов и повышением уровня сиаловых кислот [361].

Таким образом, сведения о плазменно-клеточных взаимоотношениях и функциональном состоянии эритроцитов, а именно об агрегации, деформируемости и поверхностном заряде их мембраны, в системе микроциркуляции позволяют расширить представление о патогенезе сосудистых нарушений, определить наиболее прогностически неблагоприятные функциональные нарушения эритроцитов с целью применения этих знаний в более ранней диагностике заболеваний, обеспечения их профилактики и мониторинге за индивидуальной реакцией организма пациента при проведении лучевой терапии для обеспечения безопасного и эффективного лечения на основе знаний влияния ионизирующих излучений на красные клетки крови.

Итак, на сегодняшний день существует необходимость построения физико-математических моделей, описывающих явления и процессы в организме человека в норме и в патологии, в том числе моделей для исследования клеток крови. Задача

определения поверхностного заряда эритроцитов крови для исследования эритроцитов крови человека, приобретающих определенные формы, их взаимодействия друг с другом с учетом их поверхностных зарядов при определенных заболеваниях, является значимой, т.к. известно, что эритроциты имеют свойство менять свои параметры в зависимости от заболевания.

Такие модели могут быть включены в комплексный метод исследования особенностей заболеваний на клеточном уровне, имеющего экспериментальный и теоретический подходы к решению проблемы, и результаты которого могут быть применены в формировании системного дифференциального метода диагностики комплексных заболеваний. Особенно это важно для диагностики заболеваний, методы выявления которых в настоящее время являются травматичными, не вполне достоверными и могут привести к некоторым осложнениям состояния исследуемых органов. Итак, в связи с этим существует необходимость создания более совершенных и менее затратных новых методов диагностики путем применения методов медицинской биофизики. Целью данной работы является построение физико-математической модели для определения зависимости поверхностного заряда эритроцита от его формы и линейных размеров, а также исследование динамики эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля.

Эритроциты могут находиться в состоянии с различными геометрическими формами в зависимости в норме они или при патологии. Часто их формы можно аппроксимировать с помощью геометрических фигур, таких как сфероид, эллипсоид, параболоид, тороид, в зависимости от того какие формы эритроцитов наблюдаются в крови при том или ином заболевании. В норме эритроциты могут быть наиболее близко смоделированы эллипсоидом вращения, хотя эритроциты меняют свою форму или объем при движении по сосудам.

Известно, что наличие кулоновского взаимодействия эритроцитов [370], возникающего благодаря наличию на их поверхностях отрицательного заряда, обуславливает то, что эритроциты в норме находятся на безопасных расстояниях друг от друга. Но при патологических состояниях изменяются поверхностный заряд эритроцитов, их формы и размеры. В данной работе предполагается, что изменение формы и размеров эритроцитов приводит к стабилизации электрического поля, обеспечивающего нормальное кулоновское отталкивание. Т.е. предполагается, что эритроциты изменяются

таким образом, чтобы величина электростатического поля оставалась без изменения, и чтобы расстояние между эритроцитами обуславливало отсутствие конгломераций из эритроцитов, так называемых «монетных столбиков».

Исследование изменений величины поверхностного заряда эритроцита может позволить определить заряд сиаловой кислоты эритроцита, т.к. считается, что отрицательный приповерхностный заряд эритроцита в основном определяется зарядом сиаловой кислоты [371]. Таким образом, решение проблемы определения поверхностного заряда является важной для исследования зависимости заряда сиаловой кислоты от вида заболевания и применение этой зависимости свойств поверхности мембраны в проведении комплексного метода диагностики заболевания.

Для экспериментального определения некоторых физических свойств крови проводятся эксперименты, в которых исследуются скорости движения эритроцитов крови под воздействием внешнего электрического поля в моделях внеклеточных взаимодействий, результаты которых могут применяться при проведении диагностики и лечения разных видов заболеваний. Результаты данного численного эксперимента могут быть использованы для интерпретации и прогнозах этих экспериментальных исследований.

При исследовании эритроцитов пациентов с диагнозом РШМ с помощью СЭМ нами были обнаружены дисморфные эритроциты, на поверхности которых локализованы НРС. На основе этого с учетом того, что причиной возникновения РШМ, являются ВПЧ типа 16, 18 типов, предполагается, что НРС могут прикрепляться на мембране эритроцита, меняя их электрические свойства.

Очевидно, что для понимания физических свойств эритроцитов и НРС при патологии, необходимо сформулировать и реализовать физико-математическую модель. Такие модели могут быть включены в комплексный метод исследования особенностей заболеваний на клеточном уровне, имеющего экспериментальный и теоретический подходы к решению проблемы, и результаты которого могут быть применены в формировании системного дифференциального метода диагностики заболеваний.

Итак, на сегодняшний день задача определения поверхностного заряда эритроцита крови человека является значимой с учетом того, что эритроцит имеют свойство менять свои параметры в зависимости от заболевания. Таким образом, в данном параграфе

рассматривается построение математической модели (ММ) контроля за изменениями поверхностного заряда эритроцита с учетом изменений формы и связывания НРС, а также влияния изменения электрического заряда эритроцита на их электрофоретическую подвижность.

В представленной модели рассматривается задача определения поверхностного заряда дисморфных эритроцитов при прикреплении к ним НРС в патологии. Для построения модели было выдвинуто предположение, что изменения формы и размеров эритроцитов при связывании НРС необходимы для стабилизации исходной величины напряженности электрического поля, которое препятствует образованию конгломератов эритроцитов. Так, в данной работе предлагается рассматривать механизм адсорбции НРС на поверхности эритроцита на основе кулоновских взаимодействий между НРС и зарядами на поверхности эритроцита, что в итоге приводит к изменению формы эритроцита.

Например, на рисунке 5.11 представлены СЭМ изображения эритроцитов образца крови ребенка с диагнозом хронический гломерулонефрит.

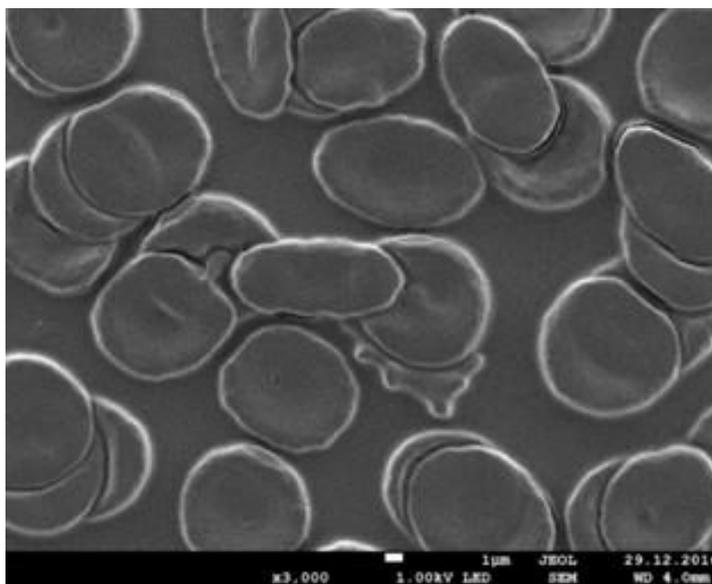


Рисунок 5.11. СЭМ изображение эритроцитов крови при хроническом гломерулонефрите при увеличении x3000.

Обнаруженные в ходе исследования изменения формы эритроцитов, вероятно, обусловлены изменением поверхностного заряда эритроцитов вследствие прикрепления к ним достаточно большого количества вирусных частиц противоположного знака [158,159,166,167].

Наличие при патологии большого числа связанных эритроцитов (монетных столбиков), которое снижается при терапии, также может быть расценено влиянием

уменьшения электростатического поля эритроцита с отрицательно заряженной поверхностью и уменьшением кулоновского отталкивания, приводящее к образованию конгломератов эритроцитов [158,159,166,167].

В данной работе рассматривается попытка решения проблемы определения общего заряда поверхности заряда эритроцита с учетом заряда прикрепленных вирусных частиц в зависимости от вида патологии и задача определения взаимосвязи предполагаемых значений зарядов с формами измененных эритроцитов, которые являются необходимыми в понимании этиологии происхождения некоторых сложно диагностируемых почечных заболеваний и в формировании нового комплексного метода их диагностики.

Предполагается, что изменения формы и размеров эритроцитов происходят таким образом, чтобы поддержать на прежнем уровне напряженность электрического поля всей системы, обеспечивающего кулоновское отталкивание, если по каким-то причинам уменьшился поверхностный заряд эритроцита, что позволило бы уменьшить вероятность склеивания и осаждения эритроцитов.

Таким образом, в модели предполагается, что при изменении поверхностного заряда при патологическом состоянии изменяется форма и размер эритроцита, чтобы электростатическое поле измененного эритроцита было таким, чтобы расстояние между эритроцитами оставалось примерно одинаковым, как при нормальном состоянии.

Кроме того, в этом параграфе рассматривается решение задачи исследования динамики движения эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля. Определяется напряженность электрического поля измененного эритроцита (овалоцита), в нашем случае он аппроксимируется эллипсоидом с отличающимися геометрическими параметрами от параметров эритроцита в норме, аппроксимированного эллипсоидом вращения. Затем, используя описанное выше условие о сохранении электрического поля эритроцита при изменении формы, рассчитывается полный заряд поверхности эритроцита, аппроксимированного эллипсоидом. В ходе проведения расчетов численных значений поверхностных зарядов эритроцитов можно также оценить поверхностные заряды предполагаемых вирусов для возможной идентификации их не только по наблюдаемым на эксперименте размерам, но и по значениям их поверхностных зарядов. На основе полученных значений зарядов эритроцитов в норме и патологии определяется закон движения эритроцита в крови при воздействии внешнего электрического поля с учетом сопротивления плазмы крови.

Дифференциальные уравнения первого в частных производных, включаемые в математическую модель, построенной на основе предлагаемой физической модели эритроцита, приводятся с применением метода разделения переменных к обыкновенным дифференциальным уравнениям первого порядка и решаются в Mathcad с использованием численного метода Рунге-Кутты 4-го порядка.

### 5.2.1. Модели определения поверхностных зарядов эритроцитов и наноразмерных структур

В данной физико-математической модели для решения задачи определения зарядов НРС (вирусных частиц) допускается, что вблизи поверхности эритроцита значение напряженности электрического поля поверхностного заряда измененного эритроцита, аппроксимированного эллипсоидом с другими параметрами  $a_{\text{пат}}, b_{\text{пат}}, c_{\text{пат}}$  при паталогическом состоянии, должно быть примерно таким же как и значение напряженности 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.

Модель состоит из следующих частей:

1) Зная значение поверхностного заряда эритроцитов в норме, мы можем определить напряженность электрического поля вблизи поверхности эритроцита. Известно, что для заряженного проводящего тела любой конфигурации вблизи его поверхности поверхностная плотность заряда равна:

$$\sigma = D, \quad (5.2.1)$$

где  $D$  — электрическое смещение вблизи поверхности заряженного тела. В этой модели применяем допущение, что данную формулу (1) 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:

$$\vec{D}_{\text{эр}} = \varepsilon \varepsilon_0 \vec{E}_{\text{эр}}, \quad (5.2.2)$$

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 используется метод определения поверхностного заряда заряженного проводящего эллипсоида:

$$q_{\text{эр}} = 4\pi abc \varepsilon \varepsilon_0 E_{\text{эр}} \left( \frac{1}{a^2} + \frac{1}{b^2} + \frac{1}{c^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (5.2.3)$$

полученное из предположения применения (1), где  $a, b, c$  — полудлины главных диаметров эллипсоида вращения.

Исходя из этой формулы определяется 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:

$$E_{\text{эр норм}} = \frac{q_{\text{эр норм}}}{4\pi abc \varepsilon \varepsilon_0 \left( \frac{1}{a^2} + \frac{1}{b^2} + \frac{1}{c^2} \right)^{\frac{1}{2}}}, \quad (5.2.4)$$

где  $q_{\text{эр норм}}$  — численное значение поверхностного заряда эритроцита в норме.

2) Определяется заряд дисморфного эритроцита с другими параметрами  $a_{\text{пат}}, b_{\text{пат}}, c_{\text{пат}}$ , т.е. эритроцита в патологии, исходя из предположения, что изменение формы и размеров эритроцитов происходит таким образом, чтобы поддержать на прежнем уровне напряженность электрического поля по следующей формуле:

$$q_{\text{эр пат}} = 4\pi a_{\text{пат}} b_{\text{пат}} c_{\text{пат}} \varepsilon \varepsilon_0 E_{\text{эр норм}} \left( \frac{1}{a_{\text{пат}}^2} + \frac{1}{b_{\text{пат}}^2} + \frac{1}{c_{\text{пат}}^2} \right)^{\frac{1}{2}}; \quad (5.2.5)$$

3) Считая, что на поверхности эритроцита прикрепляются благодаря кулоновскому взаимодействию предполагаемые вирусы, когда поверхностные заряды вирусов в плазме становятся положительными при определенных рН условиях крови, заряд дисморфного эритроцита можно представить, как алгебраическую сумму поверхностного заряда эритроцита в норме и суммарный заряд НРС на дисморфном эритроците:

$$q_{\text{эр пат}} = q_{\text{эр норм}} + N \cdot q_{\text{нано}}, \quad (5.2.6)$$

где  $N$  — это количество наноструктур на поверхности эритроцитов. Так как заряд эритроцита отрицателен, а заряд вируса положителен, поверхностный заряд дисморфного эритроцита уменьшен по сравнению с зарядом эритроцита в норме. И используя эту формулу, можно заряд наночастицы на поверхности эритроцита:

$$q_{\text{нано}} = \frac{q_{\text{эр норм}} - q_{\text{эр пат}}}{N}. \quad (5.2.7)$$

В данной работе, для проведения численных 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 наибольшего приближения к реальным результатам параметры эллипсоида в патологии берутся равными следующим численным значениям:  $a_{\text{пат}} = 5,06 \cdot 10^{-6}$  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 (Рисунок 5.12). Также было подсчитано приблизительное количество НРС на поверхности эритроцита  $N$  на основе СЭМ-снимка (рисунок 5.12), которое составило примерно 1545.

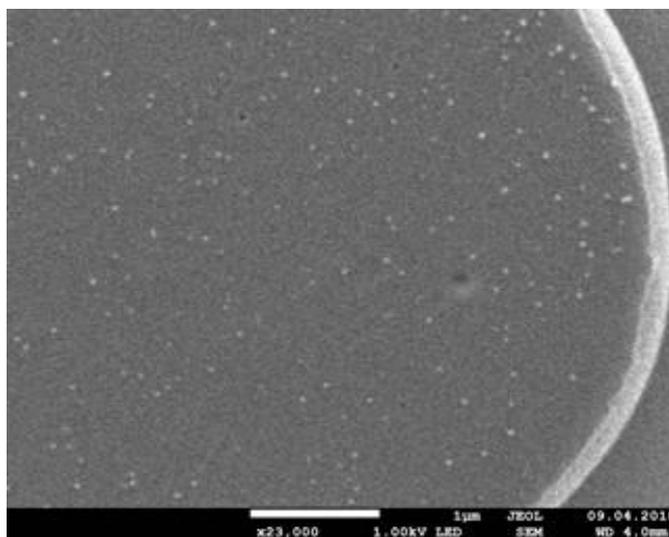


Рисунок 5.12. СЭМ изображение дисморфного эритроцита при увеличении  $\times 23000$ .

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.

### **5.2.2. Динамика движения эритроцитов крови под воздействием внешнего электрического поля с учетом сопротивления буферной жидкости и пространственного заряда эритроцитов**

В данной серии численных экспериментов исследовали движение эритроцита в буферной жидкости при воздействии внешнего электрического поля с учетом сопротивления жидкости. При проведении расчетов в первом приближении

предположено, что движение эритроцита, установившееся во времени и происходит в тонком слое крови, находящемся на гладкой плоской поверхности между двумя плоскими электродами. Т.е. кровь представляется как бесконечная плоская структура, находящаяся под воздействием внешнего электрического поля  $\vec{E}_{\text{внешн}}$ .

В исследовании динамики движения эритроциты рассматриваются как точечные заряды, численные значения которых определяется на первом этапе, при рассмотрении воздействия на них внешнего и внутреннего электрических полей. В данной части исследуется законы движения эритроцитов в крови под воздействием внешнего электрического поля с учетом пространственного заряда эритроцитов и сопротивления буферной жидкости.

С учетом изложенных допущений расчет электрических характеристик и гемодинамики эритроцитов решается с помощью математической модели, включающей:

1) уравнения движения эритроцитов с учетом сопротивления и пространственного заряда эритроцитов:

$$m_{\text{эр}} \dot{\vec{v}} = q_{\text{эр}} \frac{\vec{E}}{\varepsilon} - SC \frac{\rho v^2 \vec{v}}{2 v}, \quad (5.2.8)$$

где  $m_{\text{эр}}$  — масса эритроцита,  $\rho$  — плотность буферной жидкости,  $C$  — коэффициент сопротивления раствора,  $S$  — наибольшее поперечное сечение тела;  $q_{\text{эр}}$  — поверхностный заряд эритроцита;  $\vec{E} = \vec{E}_{\text{внешн}} + \vec{E}_{\text{внутр}}$ ,  $\vec{E}_{\text{внешн}}$  — внешнее электрическое поле;  $\vec{E}_{\text{внутр}}$  — внутреннее электрическое поле пространственных зарядов эритроцитов в крови,  $\vec{v}$  — скорость эритроцита;

2) уравнения для электрического смещения электрического поля пространственного заряда эритроцитов:

$$\text{div} \vec{D}_{\text{внутр}} = \rho_{\text{зар}}; \quad (5.2.9)$$

$$\text{rot} \vec{E}_{\text{внутр}} = 0, \quad (5.2.10)$$

где  $\rho_{\text{зар}}$  — плотность зарядов пространственных зарядов эритроцитов в крови, которое можно определить по следующей формуле:

$$\rho_{\text{зар}} = \frac{q_{\text{эр}} N}{V},$$

где  $N$  — количество эритроцитов в объеме жидкости  $V$ ,

$$\vec{D}_{\text{внутр}} = \varepsilon \varepsilon_0 \vec{E}_{\text{внутр}}; \quad (5.2.12)$$

3) уравнение непрерывности:

$$\nabla \rho_m \vec{v} + \rho_m \operatorname{div} \vec{v} = 0, \quad (5.2.13)$$

где  $\rho_m$  – массовая плотность эритроцитов.

Так как рассматривается бесконечная плоская система, то все искомые величины в данном случае зависят только от координаты  $y$ , поэтому решение ищется в виде:

$$v_x = v_x(y) \quad (5.2.14)$$

$$v_y = v_y(y) \quad (5.2.15)$$

$$\rho_{\text{зар}} = \rho_{\text{зар}}(y) \quad (5.2.16)$$

$$\vec{E} = E_{\text{внутр}}(y) \vec{e}_x + E_{\text{внутр}}(y) \vec{e}_y \quad (5.2.17)$$

Распишем по координатным компонентам уравнение (5.2.9), учитывая уравнения (5.2.14-5.2.17):

$$\dot{v}_x = \frac{q_{\text{эр}}}{m_{\text{эр}}} \frac{E_{\text{внутр } x}}{\varepsilon} - C \frac{\rho v_x^2}{2} S, \quad (5.2.18)$$

$$\dot{v}_y = \frac{q_{\text{эр}}}{m_{\text{эр}}} \frac{E_{\text{внешн}} + E_{\text{внутр } y}}{\varepsilon} - C \frac{\rho v_y^2}{2} S. \quad (5.2.19)$$

Так как  $E_{\text{внутр } x}$ ,  $E_{\text{внутр } y}$  являются функциями только от  $y$ , то заменяя в уравнении (5.2.10) частную производную на полную получаем, что:

$$E_{\text{внутр } x} = c_1, \quad (5.2.20)$$

где  $c_1$  — постоянная, определяемая начальным значением напряженности электрического поля.

В уравнении (5.2.10), учитывая (5.2.17), также заменяем частную производную на полную:

$$\frac{dE_{\text{внутр } y}}{dy} = \frac{\rho_{\text{зар}}}{\varepsilon_0 \varepsilon}$$

и умножаем его на  $\dot{y}$ . Тогда получаем, что:

$$\dot{E}_{\text{внутр } y} = \frac{\rho_{\text{зар}}}{\varepsilon_0 \varepsilon} \dot{y}. \quad (5.2.21)$$

Рассмотрим уравнение (5.2.13) по координатной составляющей  $y$ :

$$\frac{\partial \rho_{\text{зар}}}{\partial y} v_y + \rho_{\text{зар}} \frac{\partial v_y}{\partial y} = 0. \quad (5.2.22)$$

В уравнении (5.2.22) частные производные заменяем на полные, учитывая уравнения (5.2.14), (5.2.15), и умножаем его на  $\dot{y}$ . Тогда получаем:

$$\dot{\rho}_{\text{зар}} = \frac{\rho_{\text{зар}}}{v_y} \dot{v}_y. \quad (5.2.23)$$

Проинтегрировав уравнение (23) получаем:

$$\rho_{\text{зар}} v_y = c_2, \quad (5.2.24)$$

где  $c_2$  — постоянная, определяемая начальными значениями плотности заряда эритроцитов и скорости эритроцита.

Так как  $\rho_{\text{зар}} v_y = c_2$ , то из уравнения (21) следует, что:

$$\dot{E}_{\text{внутр } y} = c_3. \quad (5.2.25)$$

Таким образом, в итоге получается система из четырех обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка (5.2.26):

$$\begin{aligned} \dot{v}_x &= \frac{q_{\text{эр}}}{m_{\text{эр}}} \frac{E_{\text{внутр } x}}{\varepsilon} - C \frac{\rho v_x^2}{2} S \\ \dot{v}_y &= \frac{q_{\text{эр}}}{m_{\text{эр}}} \frac{E_{\text{внешн}} + E_{\text{внутр } y}}{\varepsilon} - C \frac{\rho v_y^2}{2} S, \\ \dot{\rho}_{\text{зар}} &= \frac{\rho_{\text{зар}}}{v_y} \dot{v}_y, \\ \dot{E}_{\text{внутр } y} &= \frac{\rho_{\text{зар}}}{\varepsilon_0 \varepsilon} \dot{y}. \end{aligned} \quad (5.2.26)$$

Численные расчеты выполняются для физической модели динамики эритроцитов в тонком слое буферной жидкости, находящейся на гладкой плоской поверхности между двумя плоскими электродами. Решение системы дифференциальных уравнений (5.2.26) производится в Mathcad с использованием численного метода Рунге-Кутты 4-го порядка.

На рисунках (5.13-5.15) представлены результаты реализации математической модели динамики эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля с учетом сопротивления среды, в которой перемещаются эритроциты, в Mathcad и полученных сравнений скоростей нормальных и дисморфных эритроцитов при различных внешних и внутренних условиях.

Полученные результаты зависимости скоростей эритроцитов в норме и патологии при одинаковых условиях численных экспериментов показывают, что скорости дисморфных эритроцитов значительно ниже, чем скорости нормальных эритроцитов при различных условиях численного эксперимента, что подтверждается в некоторых экспериментальных исследованиях [367].

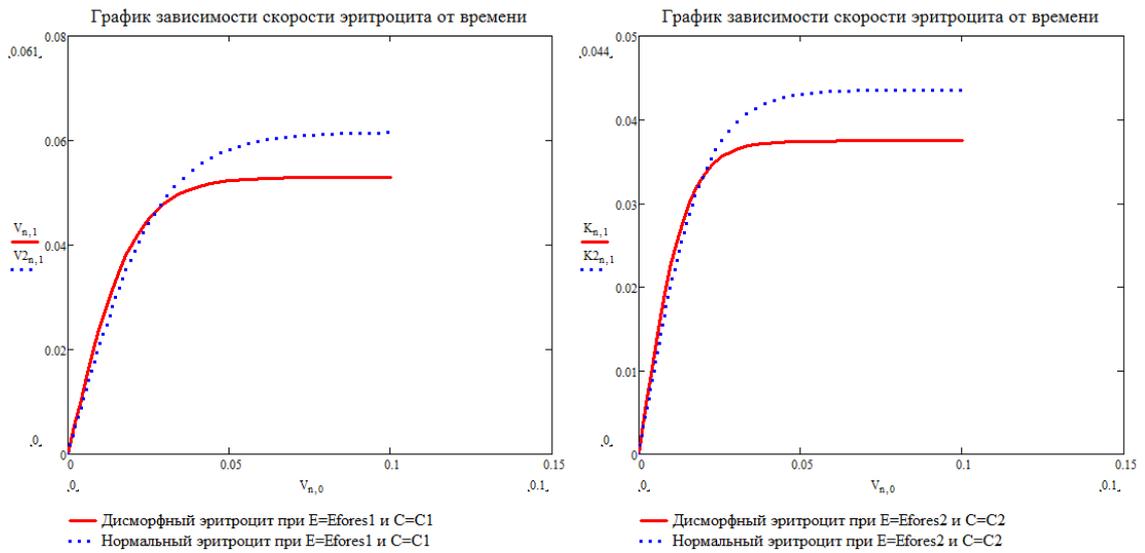


Рисунок 5.13. Скорость движения дисторфных и нормальных эритроцитов (м/с) в зависимости от времени (с) под воздействием различных значений внешнего электрического поля  $\vec{E}_{\text{внешн}}$  и коэффициента сопротивления среды.

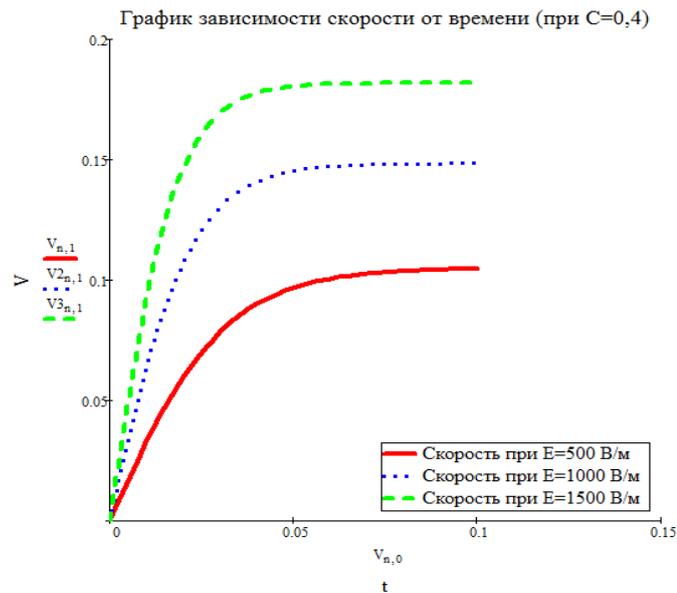


Рисунок 5.14. Скорость движения эритроцитов (м/с) в зависимости от времени (с) под воздействием различных значений внешнего электрического поля  $\vec{E}_{\text{внешн}}$ .

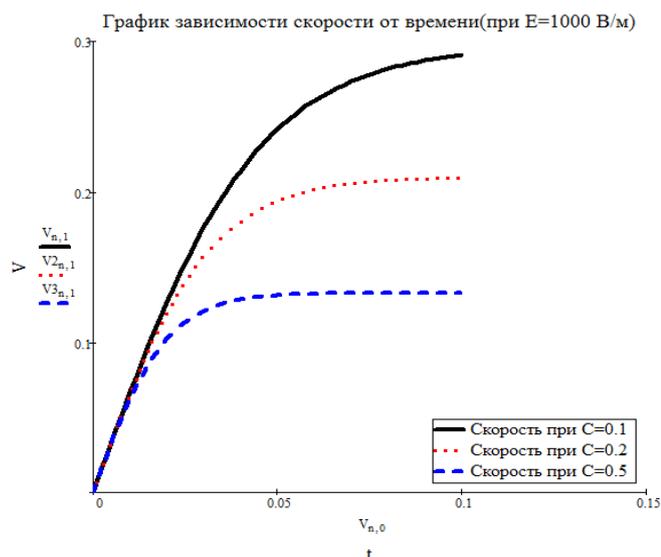


Рисунок 5.15. Скорость движения эритроцитов (м/с) в зависимости от времени (с) под воздействием внешнего электрического поля  $\vec{E}_{\text{внешн}}$  при различных значениях коэффициента сопротивления.

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 дисморфных и нормальных эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля, а также зависимости скорости движения эритроцитов от параметров внешнего электрического поля, поверхностного заряда эритроцита и свойств среды, применяя численный метод Рунге-Кутты при решении дифференциальных уравнений движения эритроцитов, что позволит получить дополнительную информацию о свойствах эритроцитов в норме и патологии, которую, возможно, полезно использовать в комплексном методе диагностики сложно диагностируемых почечных заболеваний. Результаты данного исследования могут быть применены косвенным образом для проведения диагностики заболеваний и для выработки рекомендаций для проведения экспериментальных исследований гемодинамики под воздействием различных внешних физических факторов.

### 5.2.3. Моделирование динамики движения эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля с применением уравнения Навье-Стокса

Для профилактики РШМ и его раннего выявления, в России бесплатно 1 раз в 3 года среди женщин проводится цитологический скрининг. Однако заболеваемость РШМ и смертность от него в России не снижается на протяжении 10 последних лет. Увеличение рецидивов или дальнейшее развитие онкологических заболеваний после курса терапии, в том числе курса лучевой терапии, ставит перед исследователями задачи определения причин возникновения рецидивов, что может быть взаимосвязано с новыми представлениями о развитии заболевания, а также разработки диагностики эффективности терапии.

Для решения существующих проблем в исследовании развития данного заболевания во взаимосвязи с причинами его возникновения и рецидивов необходимы разработки новых представлений об его свойствах на основе новых экспериментов, обусловленных выявлением НРС на поверхности эритроцитов методом электронной микроскопии.

В данном параграфе рассматривается является построение физико-математической модели динамики эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля на стадии проведения электрофореза при проведении ПЦР исследования эритроцитарной массы, представленного в третьей главе.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены с использованием методов математического моделирования и численного эксперимента с использованием MathCad 15.

В этой модели система, генерирующая внешнее электрическое поле, представляется как бесконечная плоская структура. Исследуются скорости эритроцитов, находящиеся под воздействием электрического поля  $\vec{E}$ , с учетом силы, возникающей в буферном растворе, а также рассчитанных в работе поверхностных зарядов эритроцитов в зависимости от группы крови и вида дисморфии.

Для расчета динамики потока эритроцитов используется гидродинамическое уравнение Навье-Стокса, которое учитывает внутреннее трение.

Рассматривается стационарный случай:  $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = 0$ ,  $\frac{\partial \rho_m}{\partial t} = 0$ , где  $\vec{v}$  - скорость электрона,  $\rho_m$  - массовая плотность эритроцитов.

Математическая модель

1. Уравнения движения Навье-Стокса:

$$(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\frac{\rho_{\text{зар}}}{\rho_m} \cdot \vec{E} + \frac{\eta}{\rho_m} \Delta \vec{v} + \frac{\eta}{3\rho_m} \nabla(\nabla \cdot \vec{v}) \quad (5.2.27)$$

где  $\rho_{\text{зар}}$  - плотность зарядов эритроцитов ( $\frac{\rho_{\text{э}}}{\rho_m} = \frac{e}{m}$ ),  $\eta$  - коэффициент сопротивления буферной жидкости,  $\vec{E}$  - сумма векторов напряженности внешнего и внутреннего электрических полей.

2. Уравнение Максвелла:

$$\text{div} \vec{E} = \frac{\rho_e}{\varepsilon_0} \quad (5.2.28)$$

где  $\varepsilon_0$  - электрическая постоянная;

3. Уравнение непрерывности:

$$\nabla \rho_m \vec{v} + \rho_m \text{div} \vec{v} = 0 \quad (5.2.29)$$

Так как рассматривается бесконечная плоская структура, то все искомые величины в данном случае зависят только от координаты  $y$ , поэтому решение ищется в виде:

$$v_y = v_y(y) \quad (5.2.30)$$

$$\rho_m = \rho_m(y) \quad (5.2.31)$$

$$\vec{E} = E_y(y) \vec{e}_y \quad (5.2.32)$$

Распишем по координатным компонентам уравнение (5.2.27) с учетом уравнений (5.2.30), (5.2.31):

$$\dot{v}_y = \frac{e}{m} (-E_y(y)) + \frac{4\eta}{3\rho_m} \frac{d^2 v_y(y)}{dy^2} \quad (5.2.33)$$

Введем обозначения:

$$\frac{dv_y(y)}{dy} = G(y) \quad (5.2.34)$$

Тогда уравнение (5.2.33) с учетом того, что  $v_y = v_y(y, t)$ :

$$\begin{aligned} \dot{v}_y &= \frac{dv_y}{dt} = \frac{dv_y}{dy} \frac{dy}{dt}, \\ \dot{v}_y &= \frac{dv_y}{dy} v_y \end{aligned} \quad (5.2.35)$$

перепишется в виде:

$$v_y G = \frac{e}{m} (-E_y(y)) + \frac{4\eta}{3\rho_m} \frac{dG(y)}{dy}. \quad (5.2.36)$$

Уравнение (5.2.34) умножаем на  $v_y$ :

$$G(y) v_y = \frac{dv_y(y)}{dy} v_y = \dot{v}_y. \quad (5.2.37)$$

С учетом равенства (5.2.34) определим производную  $G(y)$  по времени как:

$$\dot{G}(y) = \frac{d}{dt} \left( \frac{dv}{dy} \right). \quad (5.2.38)$$

Кроме того,

$$\frac{dG(y)}{dy} \cdot v_y = \frac{dG(y)}{dy} \frac{dy}{dt} = \dot{G}(y). \quad (5.2.39)$$

Умножая уравнение (5.2.36) на  $v_y$  и подставляя (5.2.39), получаем следующее дифференциальное уравнение первого порядка для  $G(y)$ :

$$v_y^2 G = \frac{e}{m} (-E_y(y)) v_y + \frac{4\eta}{3\rho_m} \frac{dG(y)}{dy} v_y$$

$$\dot{G}(y) = \frac{3\rho_m}{4\eta} \cdot \left( v_y^2 G(y) + \frac{e}{m} E_y(y) \right). \quad (5.2.40)$$

Уравнение (5.2.34) умножаем на  $\dot{y}$  и получаем следующее дифференциальное уравнение для скорости движения эритроцитов  $v_y$ :

$$\frac{dv_y(y)}{dy} = G(y) \quad | \cdot \dot{y},$$

$$\dot{v}_y = G(y) \dot{y}. \quad (5.2.41)$$

Так как  $E_y$  является функцией только от  $y$ , то заменяя в уравнении (5.2.28) частную производную на полную, получаем:

$$\frac{dE_y}{dy} = \frac{\rho_{\text{зар}}}{\varepsilon_0}$$

и умножаем его на  $\dot{y}$ . Тогда получаем, что:

$$\dot{E}_y = \frac{\rho_{\text{зар}}}{\varepsilon_0} \dot{y}. \quad (5.2.42)$$

Рассмотрим уравнение (5.2.29) по оси  $y$ :

$$\frac{\partial \rho}{\partial y} v_y + \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} = 0. \quad (5.2.43)$$

В уравнении (5.2.43) частные производные заменяем на полные, учитывая уравнения (5.2.30, 5.2.31). Тогда получаем:

$$\dot{\rho} = \frac{\rho}{v_y} \dot{v}_y. \quad (5.2.44)$$

Проинтегрировав уравнение (5.2.44) получаем:

$$\rho v_y = c_2, \quad (5.2.45)$$

где  $c_2$  – постоянная, определяемая начальными значениями плотности заряда и скорости эритроцитов.

Так как  $\rho v_y = c_2$ , то из уравнения (5.2.22) следует, что:

$$\dot{E}_y = c_3. \quad (5.2.46)$$

Таким образом, в итоге получается система из трех обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка:

$$\begin{aligned} \dot{y} &= v_y(y), \\ \dot{v}_y &= G(y)\dot{y}, \\ \dot{G}(y) &= \frac{3\rho_m}{4\eta} \cdot \left( v_y^2 G(y) + \frac{e}{m} E_y(y) \right). \end{aligned} \quad (5.2.47)$$

Результаты и обсуждения. Численные расчеты выполнялись для физической модели динамики эритроцитов в тонком слое буферной жидкости, находящейся на гладкой плоской поверхности между двумя плоскими электродами.

Полученные результаты зависимости скоростей эритроцитов в норме и патологии при одинаковых условиях численных экспериментов показывают, что скорости дисморфных эритроцитов значительно ниже, чем скорости нормальных эритроцитов при различных условиях численного эксперимента, что подтверждается в некоторых экспериментальных исследованиях (Рисунок 5.16).

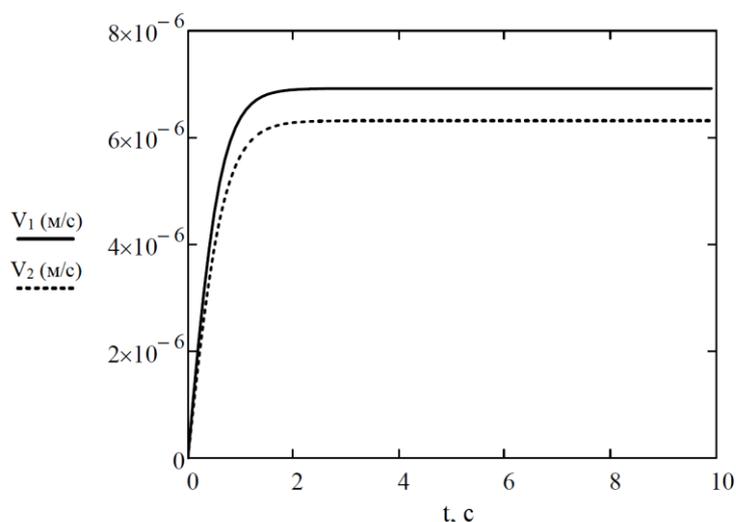


Рисунок 5.16. Графики зависимости скоростей эритроцитов от времени при различных значениях поверхностных зарядов и других равных условиях численного эксперимента: сплошная линия – при  $q = 6 \cdot 10^{-14}$  Кл; штрихованная линия – при  $q = 5 \cdot 10^{-14}$  Кл.

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 дисморфных и нормальных эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля, а также зависимости скорости движения эритроцитов от параметров внешнего электрического поля, поверхностного заряда эритроцита и свойств среды, применяя

численный метод Рунге-Кутты при решении дифференциальных уравнений движения эритроцитов, что позволит получить дополнительную информацию о свойствах эритроцитов в норме и патологии, которую, возможно, полезно использовать в комплексном методе диагностики сложно диагностируемых почечных заболеваний. Очевидно, что результаты данного исследования могут быть применены косвенным образом для проведения диагностики заболеваний и для выработки рекомендаций для проведения экспериментальных исследований гемодинамики под воздействием различных внешних физических факторов. Возможно применение модели для расчета реологических характеристик, гемодинамики для учета дисморфии и изменения поверхностного заряда, а также оценки влияния на степень дисморфии прикрепления НРС на поверхности эритроцитов, для оценки значения зарядов НРС.

Кроме того, в данное время развивается направления, связанные с разработкой микрожидкостных биочипов с одиночными эритроцитами (эритроцитами) с каждым годом увеличивается. Исследователи в этой области подчеркнули огромный потенциал, который необходимо изучить для разработки устройств на основе биочипов, отвечающих потребностям промышленности и научных кругов. RBC SCA на основе микрофлюидики облегчает разработку приложений «лаборатория на чипе» и даже «орган на чипе»

Результаты данных математических моделей могут быть рассмотрены в области решения задач микрофлюидики и исследования отдельных эритроцитов.

### **Выводы к Главе 5**

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение разрешающей способности и рентабельности методов распознавания наноразмерных изменений морфологии клеток является важным направлением современной науки и практики. В ходе проведенного исследования доказано, что выявление наноразмерных изменений морфологии плазматической мембраны эритроцитов возможно при внедрении ряда дополнительных модификаций режима работы СЭМ, а также при использовании подложек с низким сопротивлением, изготовленных из композита восстановленного оксида графена и наночастиц серебра. Предложенный подход позволил впервые, выявить наноразмерные структуры на поверхности мембраны эритроцита мазков крови при патологии человека (при заболеваниях почек у детей с синдромом гематурии, заболевании почек у взрослых, РШМ, РМЖ, при воздействии низких температур и заболеваниях суставов), а также при воздействии ионизирующего излучения во время лучевой терапии.

При исследовании механизма формирования НРС на поверхности мембраны эритроцита доказано, что ионизирующее излучение влияет как на размер и форму эритроцитов, так и количество НРС: количество и форма эритроцитов меняются в зависимости от этапа лучевой терапии, а количество НРС возрастало на каждом этапе облучения, но после завершения лучевой терапии сокращалось. Также на СЭМ изображениях до и после лучевой терапии была обнаружена агглютинация эритроцитов, возможно, частично вызванная прикреплением НРС на поверхности эритроцитов. Созданы предпосылки для применения разработанной технологии для диагностики с помощью контроля содержания и распределения НРС до и после каждого этапа ЛТ и определения критерия (критического соотношения) эффективности терапии. Таким образом, комплексная методика исследования распределения и количества НРС на поверхности эритроцита, разработанная в данном исследовании, может стать как основой для разработки методики диагностики и эффективности ЛТ, так и исследований локализации различных НРС (вирус, экзосом и т.д.).

С помощью метода КР спектроскопии доказано, что при наличии на поверхности клетки НРС, воздействие ионизирующего излучения приводит к изменениям не только морфологии, но и структуры гемоглобина (изменения доли оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина, а также липидов). Наличие НРС на поверхности эритроцитов может влиять на мембранный потенциал эритроцитов, что в свою очередь

может привести к изменениям морфологии этих клеток, а также к изменениям структуры гемоглобина. С помощью КР спектроскопии доказано, что как эритроциты, так и компоненты плазмы крови млекопитающих позвоночных животных зависят от фракционированных режимов воздействия ионизирующего излучения.

С помощью метода ПЦР с использованием праймеров, предназначенных для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего участок белка L1 ВПЧ установлено, что во фракции эритроцитов крови пациентов с РШМ присутствует ДНК ВПЧ 16 и 18 типов. Полученный результат был подтвержден с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием в качестве первичных антител мышинных моноклональных антител против белков ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18 и 31 и козьих поликлональных антител против Н и L цепей мышинных иммуноглобулинов, конъюгированных с флуоресцеином, в качестве вторичных антител. Методом иммунофлуоресцентного анализа было показано наличие НРС в эритроцитарной массе и после ЛТ. Итак, НРС на поверхности эритроцитов или их часть являются либо вирусными частицами, либо экзосомами, а ионизирующее излучение не влияет на наличие НРС с ДНК ВПЧ на поверхности эритроцитов.

Для описания процессов прикрепления НРС к поверхности эритроцитов и их электрических свойств была сформирована физико-математическая модель. Модель позволяет оценить поверхностный заряд мембраны эритроцитов в норме и в патологии с учетом их формы и размеров, а также оценить электрические заряды вирусов на поверхности эритроцитов и исследовать динамику дисморфных и нормальных эритроцитов под воздействием внешнего электрического поля в зависимости от параметров внешнего электрического поля, поверхностного заряда эритроцита и свойств среды, применяя численный метод Рунге-Кутты при решении дифференциальных уравнений движения эритроцитов, что позволило получить дополнительную информацию о свойствах эритроцитов в норме и патологии. Очевидно, что результаты данного исследования могут быть применены косвенным образом для проведения диагностики заболеваний и для выработки рекомендаций для проведения электрофореза. Возможно применение модели для расчета гемодинамики с учетом дисморфии и изменения поверхностного заряда, а также оценки влияния на степень дисморфии прикрепления НРС на поверхности эритроцитов, для оценки и значения зарядов НРС.

Для автоматизации выбора режима работы, а также разработки новых модификаций СЭМ были сформулированы математические модели эмиссионных характеристик

электронных пучков ТПЭК и ПЭК, которые представляют собой системы уравнений в частных производных первого и второго порядков. В ходе численного эксперимента были получены координаты движения крайнего электрона, определяющие форму и размер электронного пучка, значения напряженности электрического поля, плотности тока с учетом пространственного заряда пучка и внешнего магнитного поля. Представленные модели ТПЭК и ПЭК позволяют определить характеристики электронного пучка электронно-оптической системы СЭМ, производить выбор оптимального режима работы СЭМ, создавать программные обеспечения для СЭМ. Кроме того, на основе этих исследований можно говорить о целесообразности производства новых модификаций электронно-оптической системы СЭМ для исследований биообразцов.

Итак, разработанная технология и математические модели позволили повысить разрешающую способность и рентабельность применения СЭМ и провести комплексное, междисциплинарное исследование с помощью дополнительных физико-математических подходов, результаты которого свидетельствуют о наличии и распределении НРС на поверхности эритроцитов при возникновении патологии и в ходе лучевой терапии.

## ВЫВОДЫ

**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 термополевым 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 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.
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.

## 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.
16. Becker A. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis / Becker A. et al. // *Cancer cell*. – 2016. – Т. 30. – №. 6. – С. 836-848.
17. Rikkert L. G. Cancer-ID: toward identification of cancer by tumor-derived extracellular vesicles in blood / Rikkert L. G. et al. // *Frontiers in oncology*. – 2020. – Т. 10. – С. 608.
18. Kubosch E. J. Clinical trial and in-vitro study comparing the efficacy of treating bony lesions with allografts versus synthetic or highly-processed xenogeneic bone grafts / Kubosch E. J. et al. // *BMC musculoskeletal disorders*. – 2016. – Т. 17. – №. 1. – С. 1-17.
19. Wysocki B. Post processing and biological evaluation of the titanium scaffolds for bone tissue engineering / Wysocki B. et al. // *Materials*. – 2016. – Т. 9. – №. 3. – С. 197.
20. Hobbelink M. G. Synergistic effect of wire bending and salivary pH on surface properties and mechanical properties of orthodontic stainless steel archwires / Hobbelink M. G. et al. // *Progress in Orthodontics*. – 2015. – Т. 16. – С. 1-7.
21. Mestres-Ventura P. Applications of electron microscopy in medicine / Mestres-Ventura P. // *Imaging & Microscopy*. – 2007. – Т. 9. – №. 3. – С. 44-46.

22. Computational Scanning Electron Microscopy. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nist.gov/programs-projects/computational-scanning-electron-microscopy> (дата обращения 07.10.2024)
23. King J. Role of transmission electron microscopy in cancer diagnosis and research / King J. //Microscopy and Microanalysis. – 2007. – Т. 13. – №. S02. – С. 20-21.
24. Kradin R. L. Diagnostic Pathology of Infectious Disease E-Book. – Elsevier Health Sciences, 2017.
25. <https://www.worldscientific.com/doi/10.1142/S1793545816500450> Jusman Y. A system for detection of cervical precancerous in field emission scanning electron microscope images using texture features / Jusman Y. et al. //Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2017. – Т. 10. – №. 02. – С. 1650045.
26. Hyams T. C. Scanning electron microscopy as a new tool for diagnostic pathology and cell biology / Hyams T. C., Mam K., Killingsworth M. C. //Micron. – 2020. – Т. 130. – С. 102797.
27. Walker C. G. H. Simulations and measurements in scanning electron microscopes at low electron energy / Walker C. G. H., Frank L., Muellerova I. //Scanning. – 2016. – Т. 38. – №. 6. – С. 802-818.
28. Lenthe W. C. Advanced detector signal acquisition and electron beam scanning for high resolution SEM imaging / Lenthe W. C. et al. //Ultramicroscopy. – 2018. – Т. 195. – С. 93-100.
29. Schiffman M. Human papillomavirus and cervical cancer / Schiffman M. et al. //The lancet. – 2007. – Т. 370. – №. 9590. – С. 890-907.
30. Lu J. Machine learning for assisting cervical cancer diagnosis: An ensemble approach / Lu J. et al. //Future Generation Computer Systems. – 2020. – Т. 106. – С. 199-205.
31. Bray F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / Bray F. et al. //CA: a cancer journal for clinicians. – 2018. – Т. 68. – №. 6. – С. 394-424
32. Горев Р.А. Адсорбция белка, глюкозы и холестерина на эритроцитах при действии адаптивных гормонов / Горев Р.А., Смагулова З.Ш., Макарушко С.Г. [и др.] //Научные труды 1 съезда физиологов СНГ. — Москва. — 2005.
33. Черницкий Е.А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Черницкий Е.А., Воробей А.В. - Минск: Наука и техника, 1981. - 216 с.

34. Гаврилов О.К. Клетки костного мозга и периферической крови / Гаврилов О.К., Козинец Г.И., Черняк Н.Б. - М.: Медицина, 1985. - 286 с
35. Трошкина, Н. А. Эритроцит: строение и функции его мембраны / Н. А. Трошкина, В. И. Циркин, С. А. Дворянский // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 2-3. – С. 32-40.
36. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. В 3-х томах. Том 3 / Воробьев А.И. - М.: Ньюдиамед, 2005. - 416 с.
37. Казеннов А. М. Структурно-биохимические свойства мембраны безъядерных эритроцитов / Казеннов А. М., Маслова М. Н. // Физиологический журнал СССР им. ИМ Сеченова. – 1987. – Т. 73. – №. 12. – С. 1587-1594.
38. Бойтлер Э. Нарушение метаболизма эритроцитов и гемологическая анемия / Э. Бойтлер; пер. с англ. – М.: Медицина, 1981. – 256 с.
39. Морозова В.Т. Эритроциты: структура, функции, клинко-диагностическое значения / В.Т. Морозова, С.А. Луговская, М.Е. Почтарь // Клин. лаб. д-ка. – 2007. – № 10. – С. 21–35.
40. Блума Р. К., Калния И. Э., Иванова С. М. Исследование структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов с помощью флуоресцентных зондов ДСМ и ДСП-6 / Блума Р.К., Калния И.Э., Иванова С.М // Биологические мембраны. – 1992. – Т. 9. – №. 5. – С. 453-462.
41. Холестериноз (Холестерин мембран. Теоретические и клинические аспекты) / Ю. М. Лопухин [и др.]; Академия наук СССР, Академия медицинских наук СССР. - М.: Медицина, 1983. - 352 с.
42. Лапочкина Н.П. Особенности липидного спектра эритроцитов и их мембраны у женщин с заболеваниями молочной железы и миомы матки / Лапочкина Н.П. // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии. - 2006. - № 6. - С. 41-45.
43. Микровязкость мембран эритроцитов у больных раком молочной железы: связь с рецепторным фенотипом опухоли / Е. В. Цырлина, О. Г. Крюкова, Т. Е. Порошина [и др.] // Вопросы онкологии. – 2014. – Т. 60, № 4. – С. 505-510.
44. Изучение роли плазматической мембраны эритроцитов в формировании гипоксии у больных с хронической сердечной недостаточностью / Г. В. Максимов, О. В. Родненков, О. Г. Лунева [и др.] // Терапевтический архив. – 2005. – Т. 77, № 9. – С. 70-73.

45. Максимов Г.В. Влияние объема эритроцитов человека и крысы на структуру порфирина гемоглобина / Максимов Г. В., Орлов С. Н. //Биофизика. – 1993. – Т. 38. – №. 5. – С. 804-808.
46. Потемкин В.В. Метаболические показатели и структура мембран эритроцитов при ожирении и метаболическом синдроме у женщин / Потемкин В. В., Троицкая С. Ю., Максима А. Г. //Российский медицинский журнал. – 2006. – №. 1. – С. 35-38.
47. Стародуб Н.Ф. Гетерогенная система гемоглобина / Н.Ф. Стародуб // Успехи современной биологии. – 1985. – Т. 99, вып. 3. – С. 385–400.
48. Постнов Ю.В. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран / Ю.В. Постнов, С.Н. Орлов. – М.: Медицина, 1987. – 189 с.
49. Глебов Р.Н. Эндоцитоз и экзоцитоз / Р.Н. Глебов. – М.: Высшая школа, 1987. – 94 с.
50. Iverius P.H. The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans / P.H. Iverius // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247. – P. 2607–2613.
51. Arbyn M. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis / Arbyn M. et al. //The Lancet Global Health. – 2020. – Т. 8. – №. 2. – С. e191-e203.
52. Заридзе Д.Г. Прогноз заболеваемости и смертности от рака шейки матки в России в зависимости от вакцинации против ВПЧ / Заридзе Д.Г., Стилиди И.С., Максимович Д.М., Дзитиев Д.М. // Общественное здоровье. – 2022. – Т. 2, № 2. – С. 4-13.
53. Чимитдоржиева, Т. Н. Рак шейки матки в республике Бурятия (заболеваемость и смертность в сравнении по субъектам СФo и по России в целом) / Т. Н. Чимитдоржиева // Вопросы онкологии. – 2021. – Т. 67, № 2. – С. 227-232. – DOI 10.37469/0507-3758-2021-67-2-227-232.
54. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова; Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена. – Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена, 2017. – 250 с. – ISBN 978-5-85502-227-8.
55. Заридзе, Д. Г. Рак шейки матки и другие ВПЧ ассоциированные опухоли в России / Д. Г. Заридзе, Д. М. Максимович, И. С. Стилиди // Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66, № 4. – С. 325-335. – DOI 10.37469/0507-3758-2020-66-4-325-335.

56. Саввина Н.В. Анализ структуры и динамики гинекологической заболеваемости в республике Саха (Якутия) / А. А. Яворский, Е. А. Борисова [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – № 3. – С. 49-52.
57. Давыдов М.И. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2009 г./ Давыдов М. И., Аксель Е. М. //Вестник РОНЦ им. НН Блохина РАМН. – 2011. – Т. 22. – №. 3. – С. 85.
58. Hopenhaun C. Prevalence of human papillomavirus types in invasive cervical cancers from 7 US cancer registries before vaccine introduction / Hopenhaun C. et al. //Journal of lower genital tract disease. – 2014. – Т. 18. – №. 2. – С. 182-189.
59. Comparing Health services interventions for the prevention of HPV-Related cancer [Электронный ресурс]. URL: <https://hpvcentre.net/coheahr.php> (дата обращения: 07.10.2024)
60. Davey E. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review / Davey E., Barrat A., Irwing L. et al. //The Lancet. – 2006. – Т. 367. – №. 9505. – С. 122-132.
61. Deaths registered in England and Wales Statistical bulletins [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/birthsdeathsandmarriages/deaths/bulletins/deathsregistrationsummarytables/previousreleases> (дата обращения 07.10.2024)
62. Кононова И.В. Диагностическое значение определения вируса папилломы человека в крови / И. В. Кононова, Ф. А. Захарова, М. П. Кириллина, Никифоров П.В., Мамаева С.Н. и др. // Якутский медицинский журнал. – 2018. – № 4(64). – С. 100-101. – DOI 10.25789/YMJ.2018.64.30.
63. Longworth, M. S. The Binding of Histone Deacetylases and the Integrity of Zinc Finger-Like Motifs of the E7 Protein Are Essential for the Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31 / M. S. Longworth, L. A. Laimins // Journal of Virology. – 2004. – Vol. 78, No. 7. – P. 3533-3541.
64. Lowy D. R. Reducing HPV-associated cancer globally / Lowy D. R., Schiller J. T. //Cancer prevention research. – 2012. – Т. 5. – №. 1. – С. 18-23.

65. Walboomers J. M. M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide / Walboomers J. M. M. et al. //The Journal of pathology. – 1999. – T. 189. – №. 1. – C. 12-19.
66. Woodman C. B. J. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues / Woodman C. B. J., Collins S. I., Young L. S.//Nature Reviews Cancer. – 2007. – T. 7. – №. 1. – C. 11-22.
67. Longworth M. S. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia / Longworth M. S., Laimins L. A. //Microbiology and molecular biology reviews. – 2004. – T. 68. – №. 2. – C. 362-372.
68. Sasagawa T. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer / Sasagawa T., Takagi H., Makinoda S. //Journal of Infection and Chemotherapy. – 2012. – T. 18. – №. 6. – C. 807-815.
69. Bodaghi S. Could human papillomaviruses be spread through blood? / Bodaghi S. et al. //Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – T. 43. – №. 11. – C. 5428-5434.
70. Drennan M. R. What is “Sterile blood”? //British Medical Journal. – 1942. – T. 2. – №. 4269. – C. 526.
71. Tseng C. J. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis / Tseng C. J. et al. //Journal of clinical oncology. – 1999. – T. 17. – №. 5. – C. 1391-1391.
72. Pao C. C. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells / Pao C. C. et al. //American journal of clinical pathology. – 1991. – T. 95. – №. 4. – C. 540-546.
73. Foresta C. Human papillomavirus proteins are found in peripheral blood and semen Cd20+ and Cd56+ cells during Hpv-16 semen infection / C. Foresta, A. Bertoldo, A. Garolla et al.//BMC infectious diseases. – 2013. – T. 13. – C. 1-10.
74. Chen A. C. H. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors / Chen A. C. H. et al. //Journal of medical virology. – 2009. – T. 81. – №. 10. – C. 1792-1796.
75. Wang T. Detection and analysis of human papillomavirus (HPV) DNA in breast cancer patients by an effective method of HPV capture / Wang T., Zeng X., Li W., Zhu H., Wang G. et al. //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 3. – C. e90343.

76. Dong S. M. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma / Dong S. M. et al. //Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. – 2002. – T. 11. – №. 1. – C. 3-6.
77. Arias Y. R. Human papillomavirus (HPV) detected in restored plasma DNA from women diagnosed with pre-invasive lesions and invasive cervical cancer / Arias Y. R., Carrillo E. F., Aristizábal F. A. //Colombia Médica. – 2010. – T. 41. – №. 2. – C. 148-154.
78. Rombaldi R. L. Transplacental transmission of human papillomavirus / Rombaldi R. L. et al. //Virology journal. – 2008. – T. 5. – № 1. – C. 1-14.
79. Kay P. Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer / Kay P. et al. //Journal of medical virology. – 2005. – T. 75. – №. 3. – C. 435-439.
80. O. C. Wells. Scanning Electron Microscopy / O. C. Wells. – New York: McGraw-Hill. – 1974. – 421 p.
81. S. Wischnitzer. Introduction to Electron Microscopy / S. Wischnitzer. – New York: Pergamon Press. – 1962. – 310 p.
82. Haine M.E. The Electron Microscope / M. E. Haine, V. E. Cosslett, L. Marton // Physics Today. – 1961. – №14. – C. 52–54.
83. Goldstein J. I. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis / Goldstein J. I., Newbury D. E., Michael J. R., Ritchie N. W., Scott J. H. J., Joy D. C. – New York: Plenum Publishers, 2003.
84. Goldstein J. (ed.). Practical scanning electron microscopy: electron and ion microprobe analysis. – Springer Science & Business Media, 2012.
85. Everhart T. E. Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents / Everhart T. E., Thornley R. F. M. //Journal of scientific instruments. – 1960. – T. 37. – №. 7. – C. 246.
86. Joy D. C. Measuring the performance of scanning electron microscope detectors / Joy D. C., Joy C. S., Bunn R. D. //Scanning: The Journal of Scanning Microscopies. – 1996. – T. 18. – №. 8. – C. 533-538.
87. Koike H. Scanning device combined with conventional electron microscope / Koike H., Ueno K., Suzuki M. //Proc. EMSA. – Baton Rouge : Claytor's Publishing Division, 1971. – T. 29. – C. 28-29.

88. Xu L. Electrodeposited nickel and gold nanoscale metal meshes with potentially interesting photonic properties / Xu L. et al. //Chemical Communications. – 2000. – №. 12. – C. 997-998.
89. Tanaka K. Application of an ultrahigh-resolution scanning electron microscope (UHS-T1) to biological specimens / Tanaka K. et al. //Journal of electron microscopy technique. – 1989. – T. 12. – №. 2. – C. 146-154.
90. Peters K. R. Improved handling of structural fragile cell-biological specimens during electron microscopic preparation by the exchange method / Peters K. R. //Journal of microscopy. – 1980. – T. 118. – №. 4. – C. 429-441.
91. Apkarian R. SEM cryofracture study of ovarian follicles of immature rats / Apkarian R., Curtis J. C. //Scanning electron microscopy. – 1981. – T. 4. – C. 165-172.
92. Boyde A. Pros and cons of critical point drying and freeze drying for SEM / Boyde A. //Scanning electron microscopy. – 1978. – T. 2. – C. 303.
93. Anderson T. F. Techniques For The Preservation Of Three-Dimensional Structure In Preparing Specimens For The Electron Microscope / Anderson T. F. //Transactions of the New York Academy of Sciences. – 1951. – T. 13. – №. 4 Series II. – C.130-134.
94. Apkarian R. P. Analysis of high quality monatomic chromium films used in biological high resolution scanning electron microscopy / Apkarian R. P. //Scanning microscopy. – 1994. – T. 8. – №. 2. – C. 12.
95. Peters K.R. Working at higher magnifications in scanning electron microscopy with secondary and backscattered electrons on metal coated biological specimens and imaging macromolecular cell membrane structures / Peters K.R. //Scanning electron microscopy. – 1985. – T. 4. – №. 1. – C. 28.
96. Apkarian R. P. Condenser-objective lens SE microscopy: Application for high resolution imaging of cell membranes / Apkarian R. P. //Proc. Ann. EMSA Mtg. – 1987. – T. 45. – C.564-567.
97. Joy D. C. Optimizing detector resolution and efficiency in CCD arrays / Joy D. C., Allard L. F. //Proceedings of the 52nd Annual Meeting of the Microscopy Society of America. – 1994.
98. Bearer E. L. Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study / Bearer E. L., Orci L. //The Journal of cell biology. – 1985. – T. 100. – №. 2. – C. 418-428.

99. Apkarian R. P. The fine structure of fenestrated adrenocortical capillaries revealed by in-lens field-emission scanning electron microscopy and scanning transmission electron microscopy / Apkarian R. P. // *Scanning*. – 1997. – Т. 19. – № 5. – С. 361-367.
100. Boyes E. D. On low voltage scanning electron microscopy and chemical microanalysis / Boyes E. D. // *Microscopy and Microanalysis*. – 2000. – Т. 6. – № 4. – С. 307-316.
101. Liu J. Low-voltage and ultra-low-voltage scanning electron microscopy of semiconductor surfaces and devices / Liu J. // *International Journal of Modern Physics B*. – 2002. – Т. 16. – №. 28n29. – С. 4387-4394.
102. Joy D.C. Low Voltage Scanning Electron Microscopy / Joy D.C., Newbury D.E. // *Microscopy Today*. – 2002. – №10. – С.22-23.
103. Müllerová I. Contrast mechanisms in the scanning low energy electron microscopy / Müllerová I., Frank L. // *Microscopy and Microanalysis*. – 2003. – Т. 9. – №. S03. – С.120-121.
104. Oliver W.C. Low voltage scanning electron microscopy / Oliver W.C. // *Microscopy Today*. – 2002. – №10.
105. Елинсон М.И. Автоэлектронная эмиссия / Елинсон М.И., Васильев Г.Ф. – М: Физ.-мат.лит., 1958. – 272 с.
106. Елинсон М.И. О теории автоэлектронной и термоавтоэлектронной эмиссии металлов и полупроводников / Елинсон М.И., Добрякова Ф.Ф., Крапивин В.Ф. // *Радиотехника и электроника*. - 1961 г. - Т.6, - №8. - С.1342-1353
107. Добрецов Л.Н. Эмиссионная электроника / Добрецов Л.Н., Гомоюнова М.В. – М: Наука, 1966. – 564 с.
108. Компанеец А.С. Влияние объемного заряда на автоэлектронную эмиссию / Компанеец А.С. // *Докл. АН СССР*. - 1959. - Т. 128, - №6. - С. 1160-1162.
109. Модинос А. Авто-, термо- и вторичноэлектронная эмиссионная спектроскопия // пер. с англ. М.: Наука, 1990. – 320 с.
110. Фишер Р. Автоэлектронная эмиссия полупроводников / Фишер Р., Нойман Н. – М.: Наука, 1971. - 215 с.
111. Dyke W. P., Trolan J. K. Field emission: Large current densities, space charge, and the vacuum arc / Dyke W. P., Trolan J. K. // *Physical Review*. – 1953. – Т. 89. – №. 4. – С. 799.
112. Dolan W. W. The field emission initiated vacuum arc. II. The resistively heated emitter / Dolan W. W., Dyke W. P., Trolan J. K. // *Physical review*. – 1953. – Т. 91. – №. 5. – С. 1054.

113. Dyke W.P. Field Emission Current-Density Distribution / Dyke W.P., Trolan, J. K., Dolan, W. W., & Grundhauser, F. J. // Journal of Applied Physics. – 1954. – T. 25. – №. 1. – C. 106-112.
114. Stern T. E. Further studies in the emission of electrons from cold metals / Stern T. E., Gossling B. S., Fowler R. H. // Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character. - 1929. - T. 124. - №. 795. - C. 699-723.
115. Lewis T. J. Theoretical interpretation of field emission experiments / Lewis T. J. // Physical Review. – 1956. – T. 101. – №. 6. – C. 1694.
116. Paulini J. Thermo-field emission and the Nottingham effect / Paulini J., Klein T., Simon G. // Journal of Physics D: Applied Physics. – 1993. – T. 26. – №. 8. – C. 1310.
117. Drechsler M. Feldemissions-Stromdichten und Oberflächenfeldstärken bei Feldemissionsmikroskopen sowie Methoden zur Bestimmung der Spitzenradius der Spitzenform der Vergrößerung und des Auflösungsvermögens / Drechsler M., Henkel E. // Z. angew. Physik. – 1954. – T. 6. – C.341-346.
118. Becker J. A. Bell Syst / Becker J. A., Green C. B., Pearson G. L. // Techn. J. – 1951. – T. 30. – №. 907. – C. t951.
119. Eyring C. F. Fields currents from points / Eyring C. F., Mackeown S. S., Millikan R. A. // Physical Review. – 1928. – T. 31. – №. 5. – C. 900.
120. Ohshita A. Field Strength at the Cathode Tip of the Point Cathode Electron Gun / Ohshita A., Shimoyama H., Maruse S. // Microscopy. – 1973. – T. 22. – №. 2. – C. 135-140.
121. Lee C. G. New approach to manufacturing field emitter arrays with sub-half-micron gate apertures / Lee C. G. et al. // Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena. – 1996. – T. 14. – №. 3. – C. 1966-1969.
122. Itoh S. A new structure of field emitter arrays / Itoh S. et al. // Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena. – 1996. – T. 14. – №. 3. – C. 1977-1981.
123. Lo W. K. Field emission properties of self-shielded tungsten sources / Lo W. K. et al. // Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena. – 1995. – T. 13. – №. 6. – C. 2441-2444.

124. Jensen K. L. Space charge effects on the current-voltage characteristics of gated field emitter arrays / Jensen K. L., Kodis, M. A., Murphy, R. A. et al. //Journal of applied physics. – 1997. – Т. 82. – №. 2. – С. 845-854.
125. Batrakov A. V. On the screening of the electric field at the cathode surface by an electron space charge at intense field emission / Batrakov A. V., Pegel I. V., Proskurovsky D. I. //IEEE transactions on dielectrics and electrical insulation. – 1999. – Т. 6. – №. 4. – С. 436-440.
126. Брауде С.Я. Движение электрона в электрическом и магнитном поле с учетом пространственного заряда / Брауде С.Я. //, 1935. - Вып.7. - Т.5. - С.621.
127. Брауде С.Я. К вопросу о действии магнитного поля на пространственный заряд в плоском и цилиндрическом диодах // Журнал Экспериментальной и Теоретической Физики. – 1940. –Т.10. – №3. – С.217.
128. Астрелин В.Т. Отрицательное дифференциальное сопротивление электронного диода в магнитном поле / Астрелин В.Т. и др. //Институт ядерной физики СО АН СССР. Препр. – 1988. – Т.25. – С.3.
129. Пестриков Д. В. Экспериментальное изучение устойчивости компенсированного электронного пучка / Пестриков Д. В. //Журнал технической физики. – 1983. – Т. 53. – №. 5. – С. 870-876.
130. Малафаев В. А. Неустойчивость электронного пучка в магнитном поле / Малафаев В. А., Никульшина А. А., Новичков Д. Н. //Прикладная механика и техническая физика. – 1990. – Т. 31. – №. 2. – С. 10-17.
131. Карбушев Н.И. Низкочастотные неустойчивости релятивистских электронных пучков, удерживаемых внешним магнитным полем / Карбушев Н.И., Рухадзе А.А. //Материалы докладов Всесоюзного семинара «Генераторы и усилители релятивистских электронных потоках». – 1987. – С.154.
132. Михайловский А.Б. Неустойчивости плазмы в магнитных ловушках / Михайловский А.Б. – М.: Атомиздат, 1978. – 296 с.
133. Березин Ю. А. Численное моделирование инжекции мощного электронного пучка в вакуумную камеру с сильным магнитным полем / Березин Ю. А., Брейзман Б. Н., Вшивков В. А. //Прикладная механика и техническая физика. – 1981. – Т. 22. – №. 1. – С. 3-9.

134. Мануилов В.Н. К теории формирования релятивистских винтовых электронных пучков / Мануилов В.Н., Цимпринг Ш.Е. //Журнал технической физики. – 1981. – Т.51. – №12. – С.2483.
135. Барминова Е.Е. Движение сгустков заряженных частиц в поперечном магнитном поле / Барминова Е.Е., Чихачев А.С. //Известия вузов. Радиофизика. – 1990. – Т.33. – №3. – С.366-374.
136. Немчинский В. А. Расчет влияния аксиального магнитного поля на образование анодного пятна вакуумной дуги / Немчинский В. А. //Журнал технической физики. – 1989. – Т. 59. – №. 9.
137. Мануилов В.Н. К вопросу об учете собственного магнитного поля в теории формирования релятивистских винтовых электронных пучков / Мануилов В.Н. //Журнал технической физики. – 1982. – С.1506.
138. Яловец А.П. Влияние собственного электромагнитного поля интенсивного релятивистского электронного пучка на его взаимодействие с веществом / Яловец А.П. //Известия вузов. Физика. – 1987. – Т.30. – №10. – С.19.
139. Гордеев А. В. О токе релятивистского ножевого диода в сильном продольном магнитном поле / Гордеев А. В. //Письма в Журнал технической физики. – 1987. – Т. 13. – №. 7. – С. 410-414.
140. Лебедев В. А. Формирование электронного пучка с малыми поперечными скоростями в системах с продольным магнитным полем / Лебедев В. А., Шарапа А. Н. //Журнал технической физики. – 1987. – Т. 57. – №. 5. – С. 975-977.
141. Овсянников, Д. А. Моделирование и оптимизация динамики пучков заряженных частиц / Д. А. Овсянников. – Ленинград: Издательство Ленинградского государственного университета, 1990. – 312 с.
142. Овсянников, Д. А. Математическое моделирование систем формирования электронных и ионных пучков / Д. А. Овсянников, Н. В. Егоров. – Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского государственного университета, 1998. – 276 с. – ISBN 5-288-01530-9.
143. Blatt F. J. Field emission in a magnetic field / Blatt F. J. //Physical Review. – 1963. – Т. 131. – №. 1. – С. 166.
144. Good R. H. Field emission / Good R. H., Müller E. W. //Handbuch der physik. – 1956. – Т. 4. – С.176-231.

145. Kunzler J. E., Hsu F. S. L., Boyle W. S. Magnetothermal oscillations. the oscillatory dependence of temperature on magnetic field //Physical Review. – 1962. – Т. 128. – №. 3. – С. 1084.
146. Эйдукас Д.Ю., Кашета С.С., Карсокас А.А. Моделирование параметров магнитных фокусирующе – отклоняющих устройств на ЭВМ / Эйдукас Д.Ю., Кашета С.С., Карсокас А.А. //Науч. труды вузов Лит. ССР, Радиоэлектроника. – 1986. – Т.22. – С.141.
147. Dingle R. B. Some magnetic properties of metals I. General introduction, and properties of large systems of electrons / Dingle R. B. //Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences. – 1952. – Т. 211. – №. 1107. – С. 500-516.
148. Гогодзе Г.А. Квантовые осцилляции тока холодной эмиссии металлов в магнитном поле" / Гогодзе Г.А., Ицкович Ф.И., Кулик И.О. //ЖЭТФ, 1964. – №46. – С.913.
149. Бурибаев И., Шишкин Б.Б. //ФТТ, 1970. - №12. – С.3309.
150. Kennedy P. J. Modification of field-emission currents from tungsten by external magnetic fields / Kennedy P. J., Muir A. Y. //Solid State Communications. – 1978. – Т. 27. – №. 3. – С. 279-281.
151. Птицын В.Э. Температурная зависимость магнитных эффектов при автоэлектронной эмиссии. / Птицын В.Э., Фурсей Г.Н., Егоров Н.В. //Письма в ЖТФ, 1980. - Т.6. - Вып.10. - С.619.
152. Мамаева С.Н. Исследование характеристик полевого эмиссионного одноострийного диода с учетом влияния пространственного заряда и внешнего магнитного поля //Тезисы докладов научной конференции студентов и молодых ученых Республики Саха (Якутия) «Лаврентьевские чтения» 3-13 апреля 2000г. – С.30-32.
153. Яковлев Б.В. Исследование влияния пространственного заряда и управляющего магнитного поля на характеристики полевого эмиссионного диода / Яковлев Б.В., Егоров Н.В. //Ж. «Поверхность» – 1996. – №12. – С.80-87.
154. Яковлев Б.В. Расчет характеристик плоского полевого диода с учетом влияния управляющего магнитного поля на пространственный заряд эмиттирующих электронов в релятивистском приближении / Яковлев Б.В., Егоров Н.В. //Ж. «Поверхность» 1999. – №11. – С.69-71.
155. Яковлев Б.В., Егоров Н.В. Расчет характеристик сферического полевого диода с магнитной фокусировкой электронного пучка / Яковлев Б.В., Егоров Н.В. //Ж. «Поверхность» 2000. – №4. – С.193-196.

156. Мамаева С.Н. Исследование эритроцитов пациентки с хроническим мезангиопролиферативным гломерулонефритом методом сканирующей электронной микроскопии / 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. // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 3; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=29910> (дата обращения: 03.07.2020).
157. Платонова К.Н. Исследование эритроцитов человека методом сканирующей электронной микроскопии: условие проведения эксперимента /Платонова К.Н., Стручков В.Н., Семёнова М.Н., Коркина А.П., Мамаева С.Н., Антонов С.Р., Мунхалова Я.А., Кононова И.В. // Молодой ученый. — 2020. — № 23 (313). — С. 27-33. — URL: <https://moluch.ru/archive/313/71381/> (дата обращения: 08.12.2023)
158. Maksimov, G.V. Measuring Erythrocyte Morphology by Electron Microscopy to Diagnose Hematuria / G. V. Maksimov, S. N. Mamaeva, S. R. Antonov [et al.] // Measurement Techniques. – 2016. – Vol. 59, No. 3. – P. 327-330.
159. Мамаева С. Н. Исследование эритроцитов крови детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии с использованием растровой электронной и атомно-силовой микроскопии / С. Н. Мамаева, Г. В. Максимов, С. Р. Антонов [и др.] // Медицинская физика. – 2017. – № 1(73). – С. 58-63.
160. Жу У. Растровая электронная микроскопия для нанотехнологий. Методы и применение / Жу У., Уанг Ж. Л. //М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, —2013. — 582 с.
161. Мамаева С. Н. Изучение действия низких температур на морфологию эритроцитов крови детей с гематурией методами оптической и электронной микроскопии» / 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. // Ж. Медицинская физика. – 2019. – № 3(83). – С. 75-82.
162. Визильтер Ю. В. Обработка и анализ цифровых изображений с примерами на LabVIEW и IMAQ Vision / Ю. В. Визильтер, С. Ю. Желтов, В. А. Князь [и др.]. – Москва : ДМК Пресс, 2012. – 464 с. – ISBN 5-94074-348-X.
163. Mamaeva S.N. Using Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy to Study the Formation of Nanoparticles on Red Blood Cell Surface in Cervical Cancer Patients / Mamaeva S. N., Kononova I. V., Ruzhansky M. [et al.] // International Journal of Biomedicine. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 70-75. – DOI 10.21103/Article10(1)\_OA12.

164. Huang J. et al. Feature extraction for license plate location based on L0-norm smoothing / Huang, J., Ruzhanshy, M., Feng, H., Zheng, L., Huang, X., Wang, H. //Open Computer Science. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 128-135.
165. Максимов Г.В. Измерение морфологии эритроцитов с помощью электронной микроскопии для диагностики гематурии / Максимов Г.В., Мамаева С.Н., Антонов и др // Measurement Techniques. – 2016. – Т. 59. – №3. –С. 327-330.
166. Мамаева С.Н. Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии / С. Н. Мамаева, Я. А. Мунхалова, И. В. Конова [и др.] // Вестник Мордовского университета. – 2016. – Т. 26, № 3. – С. 381-390. – DOI 10.15507/0236-2910.026.201603.381-390.
167. Максимов Г.В. Измерение морфологии эритроцитов методом электронной микроскопии для диагностики гематурии / Г. В. Максимов, С. Н. Мамаева, С. Р. Антонов [и др.] // Метрология. – 2016. – № 1. – С. 47-51.
168. Mamaeva S.N. Use of Nanocomposite Material Based on Graphene Oxide and Silver Nanoparticles in Research of Blood Erythrocytes in Various Diseases / S. N. Mamaeva, G. V. Maksimov, E. P. Neustroev [et al.] // Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine : The 2nd International Symposium: Conference Paper, Moscow, 10–14 октября 2017 года. – Moscow: Knowledge E (KnE Energy & Physics), 2018. – P. 212-222. – DOI 10.18502/ken.v3i2.1815.
169. Мамаева С.Н. Изучение морфологии эритроцитов крови в ходе радиационной терапии опухолей с применением методов медицинской физики и нанобиотехнологий / Мамаева С.Н., Максимов Г.В., Антонов С.Р., Неустроев Е.П., Кононова И.В., Захарова Ф.А., Васильев И.В., Павлов А.П // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Сильно коррелированные двумерные системы: от теории к практике». г. Якутск, 18-23 июня 2018 г. – С.74.
170. Неустроев Е.П. Синтез, характеристика и применение нанокompозитов на основе серебряных наночастиц и оксида графена / Е. П. Неустроев, И. И. Куркина, С. Н. Мамаева, М. В. Ноговицына // Журнал структурной химии. – 2018. – Т. 59, № 4. – С. 883-888. – DOI 10.26902/JSC20180413. – EDN URSXQK.
171. Neustroev E. P. Synthesis, characterisation and applications of nanocomposites based on silver nanoparticles and graphen oxide / Neustroev E. P., Kurkina I. I., Mamaeva S. N., Nogovitsyna M. V. //Journal of Structural Chemistry. – 2018. – Т. 59. – С. 847-852.

172. Mamaeva S. 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 / Mamaeva S. N, Antonov S. R., Neustroev E. P. [et al.] // 2D Systems of the Strong Correlated Electrons: From Fundamental Research to Practical Applications, Якутск, 18–23 июня 2018 года. Vol. 2041. – Якутск: American Institute of Physics, 2018. – P. 050016. – DOI 10.1063/1.5079385. – EDN BHRMYA.
173. Хаммерс У. С. Приготовление графитового оксида / Хаммерс У. С. Оффеман Р. Э. // Ж. Американского химического общества. – 1958. – Т. 80, № 6. – С. 1339.
174. Yu H. High-efficient synthesis of graphene oxide based on improved hummers method / Yu H., Zhang B., Bulin C., Li R., Xing R. //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-7.
175. Alam S. N. Synthesis of graphene oxide (GO) by modified hummers method and its thermal reduction to obtain reduced graphene oxide (rGO) / Alam S. N., Sharma N., Kumar L. //Graphene. – 2017. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-18.
176. Ferrari A. C. et al. The Raman fingerprint of graphene / Ferrari, A. C., Meyer, J. C., Scardaci V., Casiraghi C., Lazzeri M., Mauri F., Geim A. K. //arXiv preprint cond-mat/0606284. – 2006.
177. Клар П. Эффективность комбинационного рассеяния графена / Клар П., Лидорикис Э., Экманн А., Вержбицкий И.А., Феррари А.С., Казираги К. // Physical Review B. – 2013. – Т.87. – С. 205435 (1-12).
178. Díez-Betriu X. et al. Raman spectroscopy for the study of reduction mechanisms and optimization of conductivity in graphene oxide thin films / Díez-Betriu X., Álvarez-García S., Botas C., Álvarez P., Sánchez-Marcos J., Prieto C., De Andrés A. //Journal of Materials Chemistry C. – 2013. – Т. 1. – №. 41. – С. 6905-6912.
179. Kudin K. N. Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets / Kudin K. N., Ozbas B., Schniepp H. C., Prud'Homme R. K., Aksay I. A., Car R. //Nano letters. – 2008. – Т. 8. – №. 1. – С. 36-41.
180. Cañado L. G. Quantifying defects in graphene via Raman spectroscopy at different excitation energies / Cañado L. G., Jorio A., Ferreira E. M., Stavale F., Achete C. A., Capaz R. B., Ferrari A. C. //Nano letters. – 2011. – Т. 11. – №. 8. – С. 3190-3196.
181. Eckmann A. et al. Probing the nature of defects in graphene by Raman spectroscopy / Eckmann A., Felten A., Mishchenko A., Britnell L., Krupke R., Novoselov K. S., Casiraghi C //Nano letters. – 2012. – Т. 12. – №. 8. – С. 3925-3930.

182. Khan S. et al. Synthesis of reduced graphene oxide and enhancement of its electrical and optical properties by attaching Ag nanoparticles / Khan S., Ali J., Husain M., Zulfequar M. //Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures. – 2016. – Т. 81. – С. 320-325.
183. Zhou Y. et al. Transparent and conductive reduced graphene oxide/silver nanoparticles multilayer film obtained by electrical self-assembly process with graphene oxide sheets and silver colloid / Zhou Y., Yang J., Cheng X., Zhao N., Sun H., Li D. //Rsc Advances. – 2013. – Т. 3. – №. 10. – С. 3391-3398.
184. Папаян, А. В. IgA нефропатия (Болезнь Берже) у детей : Лекция / Папаян А. В., Соловьев А. А., Стяжкина И. С.. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 2001. – 36 с. – EDN WBIBOD.
185. Feehally J. IgA nephropathy: progress before and since Berger / Feehally J., Cameron J. S. //American journal of kidney diseases. – 2011. – Т. 58. – №. 2. – С. 310-319.
186. Hall Y. N. Race/ethnicity and disease severity in IgA nephropathy / Hall Y. N., Fuentes E. F., Chertow G. M., Olson J. L. //BMC nephrology. – 2004. – Т. 5. – С. 1-6.
187. Мунхалова, Я. А. Особенности гломерулонефрита, ассоциированного с герпес-вирусной инфекцией / Я. А. Мунхалова, Н. М. Захарова, А. В. Горохова // Экология и здоровье человека на Севере : Сборник материалов IV-го конгресса с международным участием, Якутск, 04–07 декабря 2013 года / ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный Федеральный университет имени М.К. Аммосова», Медицинский Институт; Министерство здравоохранения Республики Саха (Якутия); Лига «Женщины-Ученые Якутии»; Якутский Научный Центр комплексных медицинских проблем СО РАН. – Якутск: Международный центр научно-исследовательских проектов, 2013. – С. 405-409.
188. Горохова, А. В. Результаты морфологического исследования биоптатов почек у детей с хронической нефропатией в Республике Саха (Якутия) / А. В. Горохова, Я. А. Мунхалова // Современные вопросы педиатрии : Сборник научных трудов III Съезда педиатров Дальневосточного федерального округа, II Съезда детских врачей Республики Саха (Якутия), Якутск, 03–04 апреля 2014 года / Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова. – Якутск: Международный центр научно-исследовательских проектов, 2014. – С. 116-122.
189. Официальный сайт компании JEOL. URL: [http://jeolrus.com/products/d\\_products/jsm-7800f/index.html](http://jeolrus.com/products/d_products/jsm-7800f/index.html) (дата обращения: 20.02.2015).

190. Горчакова Л.Н. Роль вирусной инфекции в патогенезе гломерулонефрита у детей. Современные подходы к иммунокорригирующей терапии / Л. Н. Горчакова, А. С. Маркарян, В. В. Длин, В. В. Малиновская // Нефрология и диализ. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 285-289.
191. Ковалев, Н. А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека / Н. А. Ковалев, П. А. Красочко. – Минск : Беларуская наука, 2012. – 446 с. – ISBN 978-985-08-1451-7.
192. Юсипович А.И. Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки формы и состояния эритроцитов / А. И. Юсипович, Н. Ю. Брызгалова, Е. Ю. Паршина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 3. – С. 357-360.
193. Мамаева С. Н. Исследование крови детей с синдромом гематурии методом ИК-спектроскопии / Мамаева С. Н., Максимов Г. В., Мунхалова Я. А. // Медицинская физика. – 2018. – № 3(79). – С. 31-35.
194. Мамаева С.Н. Растровый электронный микроскоп: возможности исследования заболеваний почек / С. Н. Мамаева, Р. Р. Винокуров, Я. А. Мунхалова [и др.] // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2020. – Т. 22, № 12. – С. 176-182. – DOI 10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-12-176-182.
195. Minciacchi V. R. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes / Minciacchi V. R., Freeman M. R., Di Vizio D. // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2015. – Т. 40. – С. 41-51.
196. Ludwig A. K. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication / Ludwig A. K., Giebel B. // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2012. – Т. 44. – №. 1. – С. 11-15.
197. Pant S. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities / Pant S., Hilton H., Burczynski M. E. // *Biochemical pharmacology*. – 2012. – Т. 83. – №. 11. – С. 1484-1494.
198. Zhang H. G. Emerging concepts of tumor exosome-mediated cell-cell communication. – New York, NY, USA: : Springer, 2013.
199. Bodega G. et al. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers // *Journal of extracellular vesicles*. – 2019. – Т. 8. – №. 1. – С. 1626654.
200. Gwinner W., Gröne H. J. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2000. – Т. 15. – №. 8. – С. 1127-1132.

201. Мыреева С. А. Злокачественные новообразования женских половых органов в структуре онкологической заболеваемости в Якутии, динамика, прогноз / С. А. Мыреева, Л. Н. Афанасьева, Н. Н. Макарова [и др.] // Приоритетные направления организации онкологической службы в различных климатогеографических зонах : Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию доктора медицинских наук, профессора Иванова Петра Михайловича, Якутск, 14 сентября 2018 года. – Якутск: Общество с ограниченной ответственностью «Реноме», 2018. – С. 57-59.
202. Okunade K. S. Human papillomavirus and cervical cancer //Journal of Obstetrics and Gynaecology. – 2020. – Т. 40. – №. 5. – С. 602-608
203. Tutanov O. et al. Blood Plasma Exosomes Contain Circulating DNA in Their Crown //Diagnostics. – 2022. – Т. 12. – №. 4. – С. 854
204. Sung H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / Sung H. et al //CA: a cancer journal for clinicians. – 2021. – Т. 71. – №. 3. – С. 209-249.
205. Алексеев Р.З. Предупреждение развития некроза при отморожениях с оледенением тканей / Алексеев Р.З., Томский М.И., Гольдерова А.С. [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – №8-1. – С.35-41.
206. Алексеев Р.З. Оценка изменения эритроцитов методом растровой электронной микроскопии у лиц, умерших от переохлаждения / Алексеев Р. З., Гольдерова А. С., Мамаева С. Н. [и др.] // Якутский медицинский журнал. – 2018. – № 4(64). – С. 18-21.
207. Мороз В. В. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях / Мороз В. В., Голубев А. М., Афанасьев А. В. // Общая реаниматология. – 2012. – VIII; 1. – С.52 – 60
208. Алексеев Р. З. Комплексное лечение отморожений в дореактивном периоде : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук: 14.00.22 / Алексеев Рево Захарович. – Москва, 1999. – С -30.
209. Алексеев Р.З. Особенности морфологии эритроцитов у лиц умерших от переохлаждения / Алексеев Р. З., Гольдерова А. С., Мамаева С. Н. [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2018. – № 12-1(78). – С. 169-172. – DOI 10.23670/IRJ.2018.78.12.030.

210. Поликарпов А. В и др. Заболеваемость всего населения России в 2017 году. Статистические материалы //М.: ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России. – 2018.
211. Ильиных Е. В. Маска пирофосфатной артропатии: разоблачение / Е. В. Ильиных, С. А. Владимиров, Ф. М. Кудаева [и др.] // Современная ревматология. – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 35-36.
212. Носкова Т. С. Болезни отложения кристаллов кальция: клиника и лечение / Т. С. Носкова, К. Ю. Широкова, Т. И. Бахтиарова, Н. С. Филимонова // Клиническая геронтология. – 2012. – Т. 18, № 3-4. – С. 59-63.
213. Fahey M. et al. Dexamethasone promotes calcium pyrophosphate dihydrate crystal formation by articular chondrocytes //The Journal of rheumatology. – 2009. – Т. 36. – №. 1. – С. 163-169.
214. Liu Y. Z., Jackson A. P., Cosgrove S. D. Contribution of calcium-containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis //Osteoarthritis and cartilage. – 2009. – Т. 17. – №. 10. – С. 1333-1340.
215. Барскова, В. Г. Диагностика микрокристаллической патологии суставов методом поляризационной микроскопии (трактовка и методические рекомендации к исследованию) / В. Г. Барскова, М. С. Елисеев, С. А. Владимиров // Современная ревматология. – 2010. – Т. 4, № 1. – С. 84-88. –
216. Romanò C. L. Local antibacterial implant protection in orthopedics and trauma: what's new? / Romanò C. L., Bozhkova S., Artyukh V. [et al.] // Traumatology and Orthopedics of Russia. – 2019. – Vol. 25, No. 4. – P. 64-74.
217. Rozanov V. V. Current State and Lines of the Further Development of High-Tech Means of Radiation Sterilization / V. V. Rozanov, I. V. Matveichuk, A. P. Chernyaev [et al.] // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2020. – Vol. 84, No. 4. – P. 403-405.
218. Karbysheva S. New Methods in the Diagnosis of Prosthetic Joint Infection / Karbysheva S., Renz N., Yermak K. [et al.] // Traumatology and Orthopedics of Russia. – 2019. – Vol. 25, No. 4. – P. 56-63.
219. World health organization [Электронный ресурс]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>, (2018), Accessed date: 13 December 2019.

220. Mamaeva S. N. et al. 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 //Conference on Health and Wellbeing in Modern Society (CHW 2021). – Atlantis Press, 2022. – C. 138-142.
221. Ault K. A. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract //Infectious diseases in obstetrics and gynecology. – 2006. – T. 2006. – №. 1. – C. 040470.
222. Denny L. Cervical cancer: prevention and treatment //Discovery medicine. – 2012. – T. 14. – №. 75. – C. 125-131.
223. Kim H. K. et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor //European journal of cancer. – 2003. – T. 39. – №. 2. – C. 184-191.
224. Liu J. et al. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer //International journal of molecular sciences. – 2014. – T. 15. – №. 1. – C. 758-773.
225. Jang S. C. et al. In vivo kinetic biodistribution of nano-sized outer membrane vesicles derived from bacteria //Small. – 2015. – T. 11. – №. 4. – C. 456-461.
226. El Andaloussi S. et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities //Nature reviews Drug discovery. – 2013. – T. 12. – №. 5. – C. 347-357.
227. Taylor D. D., Gercel-Taylor C. RETRACTED: MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. – 2008.
228. Keller S. et al. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes //Cancer letters. – 2009. – T. 278. – №. 1. – C. 73-81.
229. Chai H., Brown R. E. Field effect in cancer—an update //Annals of Clinical & Laboratory Science. – 2009. – T. 39. – №. 4. – C. 331-337.
230. Honegger A. et al. Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells //PLoS pathogens. – 2015. – T. 11. – №. 3. – C. e1004712.
231. Li H. et al. HIV-1-infected cell-derived exosomes promote the growth and progression of cervical cancer //International journal of biological sciences. – 2019. – T. 15. – №. 11. – C. 2438.

232. Al-Mayah A. et al. The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes //Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2015. – Т. 772. – С. 38-45.
233. Arscott WT и др. Ионизирующее излучение и экзосомы глиобластомы: значение для биологии опухолей и миграции клеток //Трансляционная онкология. – 2013. – Т. 6. – № 6. – С. 638-IN6.
234. Mutschelknaus L. et al. Exosomes derived from squamous head and neck cancer promote cell survival after ionizing radiation //PloS one. – 2016. – Т. 11. – №. 3. – С. e0152213.
235. Mutschelknaus L. et al. Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 12423.
236. Tamkovich S. et al. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles //Current molecular medicine. – 2019. – Т. 19. – №. 4. – С. 273-285.
237. Xu D. et al. Study of damage to red blood cells exposed to different doses of  $\gamma$ -ray irradiation //Blood Transfusion. – 2012. – Т. 10. – №. 3. – С. 321.
238. Abdelhalim M. A. et al. The effects of gamma-radiation on red blood cell corpuscles and dimensional properties in rats //Pak. J. Pharm. Sci. – 2015. – Т. 28. – №. 5. – С. 1819-1822.
239. Hugel B. et al. Membrane microparticles: two sides of the coin //Physiology. – 2005. – Т. 20. – №. 1. – С. 22-27.
240. Meckes Jr D. G., Raab-Traub N. Microvesicles and viral infection //Journal of virology. – 2011. – Т. 85. – №. 24. – С. 12844-12854.
241. Lui W. O. et al. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer //Cancer research. – 2007. – Т. 67. – №. 13. – С. 6031-6043.
242. Mata-Rocha M. et al. Presence of HPV DNA in extracellular vesicles from HeLa cells and cervical samples //Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica. – 2020. – Т. 38. – №. 4. – С. 159-165.
243. Huang H. et al. MicroRNA profiling of exosomes derived from red blood cell units: implications in transfusion-related immunomodulation //BioMed Research International. – 2019. – Т. 2019. – №. 1. – С. 2045915.

244. Harisa G. I., Badran M. M., Alanazi F. K. Erythrocyte nanovesicles: Biogenesis, biological roles and therapeutic approach: Erythrocyte nanovesicles //Saudi Pharmaceutical Journal. – 2017. – T. 25. – №. 1. – C. 8-17.
245. Danesh A. et al. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – T. 123. – №. 5. – C. 687-696.
246. Jabbari N., Nawaz M., Rezaie J. Ionizing radiation increases the activity of exosomal secretory pathway in MCF-7 human breast cancer cells: a possible way to communicate resistance against radiotherapy //International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – T. 20. – №. 15. – C. 3649.
247. Bagheri H.S. Low-level laser irradiation at a high power intensity increased human endothelial cell exosome secretion via Wnt signaling / H. S. Bagheri, A. Rezabakhsh, J. Rezaie [et al.] // Lasers in Medical Science. – 2018. – Vol. 33, No. 5. – P. 1131-1145. – DOI 10.1007/s10103-018-2495-8.
248. Mamaeva S.N. Determination of Blood Parameters using Scanning Electron Microscopy as a Prototype Model for Evaluating the Effectiveness of Radiation Therapy for Cervical Cancer / S. N. Mamaeva, I. V. Kononova, V. A. Alekseev [et al.] // International Journal of Biomedicine. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – P. 32-38. – DOI 10.21103/Article11(1)\_OA6.
249. Osaki M., Okada F. Exosomes and their role in cancer progression //Yonago acta medica. – 2019. – T. 62. – №. 2. – C. 182-190.
250. Meng X. et al. Circulating exosomes and their cargos in blood as novel biomarkers for cancer //Translational Cancer Research. – 2018. – T. 7. – №. Suppl 2.
251. Hood J. L. et al. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes //Laboratory investigation. – 2009. – T. 89. – №. 11. – C. 1317-1328.
252. Kalluri R. et al. The biology and function of exosomes in cancer //The Journal of clinical investigation. – 2016. – T. 126. – №. 4. – C. 1208-1215.
253. Soung Y. H. et al. Exosomes in cancer diagnostics //Cancers. – 2017. – T. 9. – №. 1. – C. 8.
254. Mizutani K. et al. Isolation of prostate cancer-related exosomes //Anticancer research. – 2014. – T. 34. – №. 7. – C. 3419-3423.

255. Skog J. et al. Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers //Nat Cell Biol. – 2008. – Т. 10. – №. 12. – С. 1470-1476.
256. Clayton A. et al. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins //The FASEB journal. – 2004. – Т. 18. – №. 9. – С. 977-979.
257. Fu Q. et al. Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circulating tumor cells via SMAD3 in liver cancer //Oncogene. – 2018. – Т. 37. – №. 47. – С. 6105-6118.
258. Fang D. Y. P. et al. Exosomes and the kidney: blaming the messenger //Nephrology. – 2013. – Т. 18. – №. 1. – С. 1-10.
259. Van Doormaal F. F. et al. Cell-derived microvesicles and cancer //Neth J Med. – 2009. – Т. 67. – №. 7. – С. 266-73.
260. Anand S., Burkenroad A., Glaspy J. Workup of anemia in cancer //Clin Adv Hematol Oncol. – 2020. – Т. 18. – №. 10. – С. 640-646.
261. Bokemeyer C., Oechsle K., Hartmann J. T. Anaemia in cancer patients: pathophysiology, incidence and treatment //European journal of clinical investigation. – 2005. – Т. 35. – С. 26-31.
262. Ludwig H., Fritz E. Anemia in cancer patients //Seminars in oncology. – 1998. – Т. 25. – №. 3 Suppl 7. – С. 2-6., Houbiers JG, Busch OR, Van de Watering LM, Marquet RL, Brand A et al. Blood transfusion in cancer surgery: a consensus statement. Eur J Surg 1995; 161: 307–14.
263. Pauling L., Coryell C. D. The magnetic properties and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1936. – Т. 22. – №. 4. – С. 210-216.
264. Seiyama A., Maeda N., Shiga T. Analysis of the distribution of flowing erythrocytes in a model vessel under an inhomogeneous magnetic field //European biophysics journal. – 1996. – Т. 25. – №. 1. – С. 1-7.
265. Friedman J. M. Structure, dynamics, and reactivity in hemoglobin //Science. – 1985. – Т. 228. – №. 4705. – С. 1273-1280.
266. Мамаева С. Н. Исследование изменений состояния эритроцитов и плазмы крови обезьян при воздействии ионизирующего излучения / Мамаева С. Н., Иванова С. М., Шутова В. В., Максимов Г. В. // Вестник Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана. Серия Естественные науки. – 2022. – № 5(104). – С. 86-104. – DOI 10.18698/1812-3368-2022-5-86-104.

267. Grigoriev A.I. Investigation of erythrocyte shape, plasma membrane fluidity and conformation of haemoglobin haemoporphyrin under the influence of long-term space flight / A. I. Grigoriev, G. V. Maksimov, B. V. Morukov [et al.] // Journal of Gravitational Physiology. – 2004. – Vol. 11.– №2.
268. Ivanova S.M. Physical-Chemical properties of plasma membrane and function of erythrocytes of cosmonauts after long-term space flight / Ivanova S.M., Yarlikova Y.V., Labetskaya O.I., Morukov B.V., Braze N.A., Luneva O.G., Parshina E.Y., Baizhumanov A.A., Maksimov G.V. // Acta Astronautica, (United Kingdom):–2011. – 68 (9-10).– P. 1517-1522.
269. Braze N.A. Studies of the blood antioxidant system and oxygen-transporting properties of human erythrocytes during 105-day isolation / N. A. Brazhe, A. A. Baizhumanov, E. Y. Parshina [et al.] // Human Physiology. – 2014. – Vol. 40, No. 7. – P. 804-809. – DOI 10.1134/S0362119714070020.
270. Ivanova S.M. Morphological and functional features of the blood in humans during a nine-day stay in an oxyargon environment with various oxygen contents / S. M., B. V. Morukov, Y. V. Yarlykova [et al.] // Human Physiology. – 2012. – Vol. 38, No. 7. – P. 786-787. – DOI 10.1134/S0362119712070092..
271. Иванова С.М. Морфофункциональные свойства эритроцитов и эффективность переноса кислорода гемоглобином у человека в условиях 21-суточной "сухой" иммерсии / С. М. Иванова, О. И. Лабетская, Н. Анисимов, Г. В. Максимов // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2019. – Т. 53, № 6. – С. 33-37. – DOI 10.21687/0233-528X-2019-53-6-33-37.
272. Моруков Б. Обезьяны первыми испытают на себе влияние "марсианской" радиации. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://iz.ru/news/406986/>.
273. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика. Учебник для Вузов / Ремизов А.Н.– Москва: Высшая школа, 1987.
274. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика. Курс лекций по биологическому действию ионизирующих излучений. / Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Москва: Издательство Московского государственного университета, 1979. –С.240.
275. Luneva O.G. Erythrocytes as regulators of blood vessel tone / O. G. Luneva, S. V. Sidorenko, G. V. Maksimov [et al.] // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2015. – Vol. 9, No. 3. – P. 161-171. – DOI 10.1134/S1990747815040078.

276. Шиффман, Ф. Д. Патофизиология крови / Ф. Д. Шиффман; Фред Дж. Шиффман ; пер. с англ. под ред. Е. Б. Жибурта, Ю. Н. Токарева ; под общ. Ю. В. Наточина. – Москва: Бином, 2009. – 446 с. – (Серия Патофизиология). – ISBN 978-5-9518-0193-7.
277. Allakhverdiev E. S. Raman Spectroscopy and Its Modifications Applied to Biological and Medical Research / E. S. Allakhverdiev, O. V. Rodnenkov, T. V. Martynyuk [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, No. 3. – DOI 10.3390/cells11030386.
278. Nikelshparg E. I. et al. Probing lipids in biological membranes using SERS / Nikelshparg E.N., Grivennikova V.G., Baizhumanov A.A., Semenova A.A., Sosnovtseva V., Goodilin E.A., Maksimov G.V., Brazhe N.A. // *Mendeleev Communications*. – 2019. – Т. 29. – №. 6. – С. 635-637.
279. Osterrothová K. Analyzing carotenoids of snow algae by Raman microspectroscopy and high-performance liquid chromatography / Osterrothová K., Culka A., Němečková K. [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2019. – Vol. 212. – P. 262-271. – DOI 10.1016/j.saa.2019.01.013.
280. Jehlička J., Edwards H.G.M., Osterrothová K., Novotná J., Nedbalová L., Kopecký J., Němec I., Oren A. Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology. *Philos Trans a Math Phys Eng. Sci.* –2014. doi: 10.1098/rsta.2014.0199.
281. Sidorenko S.V. Proteomics-based identification of hypoxia-sensitive membrane-bound proteins in rat erythrocytes / S. V. Sidorenko, O. G. Luneva, L. I. Deev [et al.] // *Journal of Proteomics*. – 2018. – Vol. 184. – P. 25-33. – DOI 10.1016/j.jprot.2018.06.008.
282. Slatinskaya O.V. Conformational Changes that occur in Heme and Globin upon Temperature Variations and Normobaric Hypoxia / O. V. Slatinskaya, O. G. Luneva, L. I. Deev [et al.] // *Biophysics*. – 2020. – Vol. 65, No. 2. – P. 213-221. – DOI 10.1134/S0006350920020220.
283. Parshina E.Y. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity / E. Y. Parshina, A. I. Yusipovich, A. R. Brazhe [et al.] // *Journal of Biological Physics*. – 2019. – Vol. 45, No. 4. – P. 367-377. – DOI 10.1007/s10867-019-09533-5.
284. Eggersdorfer, M. Carotenoids in human nutrition and health / M. Eggersdorfer, A. Wyss // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – Vol. 652. – P. 18-26. – DOI 10.1016/j.abb.2018.06.001.

285. Орлов С.Н. Котранспортеры катионов и хлора: регуляция, физиологическое значение и роль в патогенезе артериальной гипертензии / Орлов С.Н., Кольцова С.В., Капилевич Л.В, Дулин Н.О., Гусакова С.В. //Успехи биологической химии. –2014.–Т. 54. –С. 267–298.
286. Atkins C.G. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components / C. G. Atkins, K. Buckley, R. F. B. Turner, M. W. Blades // Applied Spectroscopy. – 2017. – Vol. 71, No. 5. – P. 767-793. – DOI 10.1177/0003702816686593.
287. Othmane A. Influence of altered phospholipid composition of the membrane outer layer on red blood cell aggregation: relation to shape changes and glycocalyx structure / A. Othmane, M. Bitbol, P. Snabre, P. Mills // European Biophysics Journal. – 1990. – Vol. 18, No. 2. – P. 93-99. – DOI 10.1007/bf00183268.
288. Maksimov G.V. The Role of Erythrocyte Receptors in Regulation of the Conformation and Distribution of Hemoglobin / G. V. Maksimov, O. V. Slatinskaya, E. S. Tkhor [et al.] // Biophysics. – 2019. – Vol. 64, No. 1. – P. 57-61. – DOI 10.1134/S0006350919010123.
289. Sidorenko S.V. Hemolysis and ATP Release from Human and Rat Erythrocytes under Conditions of Hypoxia: A Comparative Study / S. V. Sidorenko, O. G. Luneva, T. S. Novozhilova [et al.] // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2018. – Vol. 12, No. 2. – P. 114-120. – DOI 10.1134/S1990747818020125.
290. Kononova I. 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 / Kononova I. V., Mamaeva S. N., Alekseev V. A. [et al.] // International Journal of Biomedicine. – 2022. – Vol. 12, No. 1. – P. 109-114. – DOI 10.21103/Article12(1)\_OA10. – EDN YIHRIW.
291. Кононова И. В. Обнаружение циркулирующей ДНК в безъядерных фракциях крови у пациентки с раком шейки матки / Кононова И. В., Мамаева С. Н., Алексеев В. А. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 2. – С. 86. – DOI 10.17513/spno.31543. – EDN RWOOHV.
292. Deacon B., Abramowitz J. Fear of needles and vasovagal reactions among phlebotomy patients //Journal of anxiety disorders. – 2006. – Т. 20. – №. 7. – С. 946-960.
293. Gu Y. et al. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: a meta-analysis //PLoS One. – 2020. – Т. 15. – №. 2. – С. e0224001.
294. Campitelli M. et al. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients. – 2012.

295. Yim E. K., Park J. S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis //Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association. – 2005. – Т. 37. – №. 6. – С. 319-324.
296. Rungkamoltip P. et al. Rapid and ultrasensitive detection of circulating human papillomavirus E7 cell-free DNA as a cervical cancer biomarker //Experimental Biology and Medicine. – 2021. – Т. 246. – №. 6. – С. 654-666.
297. Graham S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review //Clinical science. – 2017. – Т. 131. – №. 17. – С. 2201-2221.
298. Middleton K. et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers //Journal of virology. – 2003. – Т. 77. – №. 19. – С. 10186-10201.
299. 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.
300. Buck C.B., Day P.M., Trus B.L.. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):169-174. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038.
301. 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.
302. Li X. et al. Characterization of adult  $\alpha$ -and  $\beta$ -globin elevated by hydrogen peroxide in cervical cancer cells that play a cytoprotective role against oxidative insults //PloS one. – 2013. – Т. 8. – №. 1. – С. e54342. doi: 10.1371/journal.pone.0054342.
303. Thakur B. K. et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection //Cell research. – 2014. – Т. 24. – №. 6. – С. 766-769. doi: 10.1038/cr.2014.44.
304. Tamkovich S., Laktionov P. Cell-surface-bound circulating DNA in the blood: Biology and clinical application //IUBMB life. – 2019. – Т. 71. – №. 9. – С. 1201-1210. doi: 10.1002/iub.2070.
305. NanoPhotometer® P-Class User Manual P 300 / P 330 / P 360. [Электронный ресурс]. Available from: <https://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/04/NanoPhotometer-P-Class-User-Manual-2.1.pdf>
306. Evrogen. [Электронный ресурс]. Available from: [https://evrogen.ru/kit-user-manuals/qPCRMix-HS-SYBR-LowROX\\_PK156.pdf](https://evrogen.ru/kit-user-manuals/qPCRMix-HS-SYBR-LowROX_PK156.pdf) [in Russian]

307. Quellhorst G, Rulli S. A systematic guideline for developing the best real-time PCR primers. Lessons learned from designing assays for more than 14,000 genes. Qiagen. 2012;1–9. [Электронный ресурс]. Available from: file:///C:/Users/Admin/Downloads/1073958\_A\_systematic\_guideline\_for\_developing\_the\_best\_real-time\_PCR\_primers.pdf
308. Мамаева С. Н. Исследование поверхности эритроцитов пациентов с раком шейки матки методом иммунофлуоресцентного анализа / Мамаева С. Н., Алексеев В. А., Кононова И. В. [и др.] // Медицинская физика. – 2022. – № 4(96). – С. 64-71. – DOI 10.52775/1810-200X-2022-96-4-64-71.
309. Лушникова П.А. Современные методы лучевой терапии рака шейки матки / П. А. Лушникова, Е. С. Сухих, П. В. Ижевский [и др.] // Креативная хирургия и онкология. – 2021. – Т. 11, № 1. – С. 58-67. – DOI 10.24060/2076-3093-2021-11-1-58-67.
310. Tazhibayeva K.N. Ways to improve the diagnostics and detection of cervical cancer development and recurrence risk / K. N. Tazhibayeva, A. D. Sadykova, D. T. Tasboltaeva [et al.] // Oncology and Radiology of Kazakhstan. – 2021. – No. 4(62). – P. 24-27. – DOI 10.52532/2663-4864-2021-4-62-24-27.
311. Шакирова Э.Ж. Шакирова, Э. Ж. Спасительная (salvage) гистерэктомия после лучевой терапии рака шейки матки: обзор литературы / Э. Ж. Шакирова, Д. И. Зидиханов // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2021. – Т. 17, № 3. – С. 121-127. – DOI 10.17650/1994-4098-2021-17-3-121-127.
312. Крейнина Ю.М. Актуальные технологии конформной лучевой терапии в современных программах лечения рецидивов рака шейки, тела матки и яичников / Ю. М. Крейнина, Л. Н. Шевченко, М. Х. Каскулова [и др.] // Онкогинекология. – 2020. – № 2(34). – С. 60-70. – DOI 10.52313/22278710\_2020\_2\_60.
313. Мансурова Г. Б. и др. Анализ факторов влияющих на рецидивирование рака шейки матки / Мансурова Г. Б., Саидова К.А., Разаков А.Р., Талыбова С.А., Агзамов О.А., Чен Е.Е., Исраилов Б.С., Алимов Ж.М. // Клиническая и экспериментальная онкология. –2018. –Т.1(3) – С. 15-18.
314. Шумейкина А.О. Возможности применения стереотаксической лучевой терапии для лечения рецидивов рака шейки матки (РШМ) / А. О. Шумейкина, К. В. Вавилов, Е. А. Самойлова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № S3. – С. 231-232.

315. 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.
316. 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.
317. Lawson J. Extracellular vesicle secretion of miR-142-3p from lung adenocarcinoma cells induces tumor promoting changes in the stroma through cell-cell communication / J. Lawson, C. Dickman, R. Towle [et al.] // *Molecular Carcinogenesis*. – 2019. – Vol. 58, No. 3. – P. 376-387. – DOI 10.1002/mc.22935.
318. Xiao H., Wong D. T. W. Proteomic analysis of microvesicles in human saliva by gel electrophoresis with liquid chromatography-mass spectrometry // *Analytica chimica acta*. – 2012. – Т. 723. – С. 61-67.
319. 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.
320. Inci F. Nanoplasmonic quantitative detection of intact viruses from unprocessed whole blood / F. Inci, O. Tokel, S. Wang [et al.] // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7, No. 6. – P. 4733-4745. – DOI 10.1021/nn3036232.
321. Mathieu M. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication / M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Théry // *Nature Cell Biology*. – 2019. – Vol. 21, No. 1. – P. 9-17. – DOI 10.1038/s41556-018-0250-9.
322. Frémeaux-Bacchi V. Human lymphocytes shed a soluble form of CD21 (the C3dg/Epstein-Barr virus receptor, CR2) that binds iC3b and CD23 / Frémeaux-Bacchi V., Bernard I., Maillet F., Mani J.C., Fontaine M., Bonnefoy J.Y., Kazatchkine M.D., Fischer E. // *Eur J Immunol*. – 1996. – P.1497-1503. – DOI: 10.1002/eji.1830260714
323. Bakkalci D. Risk factors for Epstein Barr virus-associated cancers: a systematic review, critical appraisal, and mapping of the epidemiological evidence/ Bakkalci D., Jia Y., Winter J.R., Lewis J.E., Taylor G.S., Stagg H.R. // *J Glob Health*. – 2020. – Т.1. – doi: 10.7189/jogh.10.010405.

324. Ju. Su. Zh. Li. Chromosomal fragile site breakage by EBV-encoded EBNA1 at clustered repeats / Ju. Su. Zh. Li, A. Abbasi, D. H. Kim [et al.] // Nature. – 2023. – Vol. 616, No. 7957. – P. 504-509. – DOI 10.1038/s41586-023-05923-x.
325. Lanz T. V. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM / Lanz T. V., Brewer R. C., Ho P. P. [et al.] // Nature. – 2022. – Vol. 603, No. 7900. – P. 321-327. – DOI 10.1038/s41586-022-04432-7.
326. Im K. et al. An introduction to performing immunofluorescence staining. – Springer New York, 2019. – С. 299-311.
327. Mahmood T., Yang P.C. Western blot: technique, theory, and troubleshooting // N Am J Med Sci. – 2012. – Т.4(9). – P:429-434.
328. Tamkovich S. N. Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and ovarian cancer patients / S. N. Tamkovich, A. K. Somov, K. V. Proskura [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2019. – Vol. 20, No. 1. – P. 255-262. – DOI 10.31557/APJCP.2019.20.1.255.
329. Tamkovich S.N. Proteome analysis of circulating exosomes in health and breast cancer / S. N. Tamkovich, O. S. Tutanov, A. K. Somov [et al.] // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2017. – Vol. 43, No. 2. – P. 126-134. – DOI 10.1134/S1068162017020157.
330. Wang T. The role of human papillomavirus infection in breast cancer / T. Wang, P. Chang, L. Wang [et al.] // Medical Oncology. – 2012. – Vol. 29, No. 1. – P. 48-55. – DOI 10.1007/s12032-010-9812-9.
331. Мамаева С. Н. и др. Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии // Инженерные технологии и системы. – 2016. – Т. 26. – №. 3. – С. 381-390.
332. Orloff J. (ed.). Handbook of Charged Particle Optics, Second Edition, 2017. – EDN UTGJEQ.
333. Соколова, И. А. Агрегация эритроцитов / И. А. Соколова // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 9, № 4(36). – С. 4-26. – EDN NCRNTZ.
334. Маркин А.В. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у больных с синдромом обструктивного апноэ сна / Маркин А.В., Мартыненко Т.И., Костюченко Г.И. // Клиницист. — 2014. — № 1. — С. 15-21.

335. Gunes O. Associations between erythrocyte membrane fatty acid compositions and insulin resistance in obese adolescents / Gunes O et al. // Chem Phys Lipids. — 2014. — Vol.184. — P.69-75.
336. Revin V. V. Study of Erythrocyte Indices, Erythrocyte Morphometric Indicators, and Oxygen-Binding Properties of Hemoglobin Hematoporphyrin Patients with Cardiovascular Diseases / Revin V. V., Ushakova A. A., Gromova N. V. [et al.] // Advances in Hematology. — 2017. — Vol. 2017. — P. 8964587. — DOI 10.1155/2017/8964587.
337. Bishop J. J. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules / Bishop J.J. et al.//American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. — 2001. — Т. 280. — №. 1. — С. H222-H236.
338. Сидельникова Н. С. Метаболический синдром: особенности микроциркуляции и потоковых свойств крови / Сидельникова Н. С. и др. //Вестник современной клинической медицины. — 2012. — Т. 5. — №. Приложение 1.
339. Шилов А.М. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом / Шилов А.М., Авшалумов А.Ш., Сеницина Е.Н. // Русский Медицинский Журнал. — Том 16. №4. — 2008г. — С. 200-204. 100
340. Катюхин Л. Н. К объяснению механизма влияния сдвигового напряжения на вязкостные параметры крови в сосудах малого диаметра / Катюхин Л. Н. //ScienceRise. — 2014. — Т. 5. — №. 4. — С. 24-29.
341. Муравьев А. В. Вне-и внутриклеточные механизмы изменения агрегации эритроцитов / Муравьев А. В., Муравьев А. А.//Физиология человека. — 2005. — Т. 31. — №. 4. — С. 108-112.
342. Подзолков В.И. Артериальная гипертензия / Подзолков В.И. — М.:МИА. — 2016. — 426 с.
343. Катюхин Л. Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования / Катюхин Л. Н. //Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. — 1995. — Т. 81. — №. 6. — С. 122-129.
344. Сашенков С.Л. Влияние различных фармакологических препаратов на суммарный поверхностный заряд мембран эритроцитов / Сашенков С.Л., Алачева Л.В., Тишевская Л.В.// Вестник ЮУрГУ. — 2011. — №7. — С. 101- 104.

345. Смыр К. В. Агрегационные свойства эритроцитов у больных хроническим гломерулонефритом / Смыр К. В., Щербак А. В., Козловская Л. В. и др. //Клиническая фармакология и терапия. – 2008. – Т. 17. – №. 4. – С. 93-96.
346. Banerjee R. The diagnostic relevance of red cell rigidity / Banerjee R., Nageshwari K., Puniyani R. R. //Clinical hemorheology and microcirculation. – 1998. – Т. 19. – №. 1. – С. 21-24.
347. Кравец Е.Б. Особенности микрореологических свойств эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа./ Кравец Е.Б., Яковлева Н.М., Рязанова Н.В. // Сахарный диабет. – 2005г. – №1. – С. 14- 17.
348. Gyawali P. The association of dyslipidemia with erythrocyte aggregation / Gyawali P., Richards, R. S., Bwititi, P. T., Nwose, E. U. //Clinical Lipidology and Metabolic Disorders. – 2015. – Т. 10. – №. 2.
349. Gyawali P. Erythrocyte aggregation and metabolic syndrome / Gyawali P. et al. //Clinical hemorheology and microcirculation. – 2014. – Т. 57. – №. 1. – С. 73-83.
350. Gyawali P. Erythrocyte morphology in metabolic syndrome / Gyawali P., Richards R. S., Uba Nwose E. //Expert Review of Hematology. – 2012. – Т. 5. – №. 5. – С. 523-531.
351. Gyawali P. Hemorheological parameters better classify metabolic syndrome than novel cardiovascular risk factors and peripheral vascular disease marker / Gyawali P. et al. //Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2016. – Т. 64. – №. 1. – С. 1-5.
352. Kowalczyk E. Estimation of cell membrane properties and erythrocyte red-ox balance in patients with metabolic syndrome / Kowalczyk E. et al. //Molecular Biology Reports. – 2012. – Т. 39. – С.11113-11118.
353. Крылов В.Н. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов и их фосфолипидный состав при разных заболеваниях / Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Антипенко Е.А. // Клин. лаб. диагност. – 2009. – №9. – С.37–40.
354. Мальцева Т. С. Цитоархитектоника и агрегация эритроцитов при абдоминальном ожирении 1 степени в первом зрелом возрасте / Т. С. Мальцева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 717.
355. Бадалян К.Р. Биофизические свойства эритроцитов периферической крови у больных с хронической ишемией мозга / Бадалян К.Р., Василенко И.А., Федин А.И. // Лечебное дело. – 2015. – №1. – С.84-90.

356. Гогин Е. Е. Гипертоническая болезнь и ассоциированные болезни системы кровообращения: основы патогенеза, диагностика и выбор лечения / Е. Е. Гогин, Г. Е. Гогин. – Москва: Ньюдиамед, 2006. – 254 с. – ISBN 5-88107-058-5.
357. Кириченко А. А. Микроциркуляция при артериальной гипертензии и на фоне нормализации артериального давления с помощью антигипертензивной терапии / Кириченко А. А., Аверьянова И. М. // Российский кардиологический журнал. — 2012. — Т. 3. — С. 38-41.
358. Боровская, М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2010.- Т. 3. - № 73. - С. 334 - 354.
359. Крылов В.Н. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т.36, №3. – С. 83-86.
360. Bishop J. J. Relationship between erythrocyte aggregate size and flow rate in skeletal muscle venules / Bishop J. J. et al. //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2004. – Т. 286. – №. 1. – С. H113-H120.
361. Durocher J.R. Role of sialic acid in erythrocyte survival / J. R. Durocher, Robert C. Payne, Marcel E. Conrad // Blood, – 1975. – Т.45. –№1. – С.11-20.
362. Lominadze D. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation / Lominadze D., Dean W. L. //FEBS letters. – 2002. – Т. 517. – №. 1-3. – С. 41-44.
363. Ионова В.Г. Реологические свойства крови при ишемических нарушениях мозгового кровообращения / Ионова В.Г., Суслина З.А. //Неврологический журнал. – 2002. – Т. 3. – №. 7. – С. 4-10.
364. Громов А.А. Особенности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с артериальной гипертензией разной степени / Громов А. А. и др. //Системные гипертензии. – 2012. – Т. 9. – №. 4. – С. 57-62.
365. Сурикова Т. П. и др. Изучение зависимости заряда эритроцитов у больных сахарным диабетом в зависимости от тяжести его протекания / Сурикова Т. П. и др. //Астраханский медицинский журнал. – 2012. – Т. 7. – №. 2. – С. 206-207.
366. Кручинина М.В. Особенности параметров эритроцитов у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом / Кручинина М. В. и др. //Вестник Новосибирского

государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2011. – Т. 9. – №. 3. – С. 68-76.

367. Курилович С.А. Электрические параметры и структура мембран эритроцитов при диффузных заболеваниях печени / Курилович С.А., Кручинина М.В., Генералов В.М. и др. //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009. – Т. 19. – №. 2. – С. 30-36.

368. Tokumasu F. Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes / Tokumasu F., Nardone G. A., Ostera G. R., Fairhurst R. M., Beaudry S. D., Hayakawa E., & Dvorak J. A. //PloS one. – 2009. – Т. 4. – №. 6. – С. e5828.

369. Муравлёва Л. Е. Зарядовый баланс эритроцитов крови больных с хроническим пиелонефритом и на фоне артериальной гипертензии / Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Колесникова Е.А., Ключев Д.А., Мурсалова Ж.Ш., Мурзатаева А.М., Агей Л. Г. //Фундаментальные исследования. – 2011. – №. 10-1. – С. 126-130.

370. Чижевский А.Л. Электрические и магнитные свойства эритроцитов / Чижевский А.Л. – Киев: Наукова думка, 1973. – 94 с.

371. Levine S. Theory of the electrokinetic behavior of human erythrocytes / Levine, S., Levine, M., Sharp, K. A., & Brooks, D. E. //Biophysical journal. – 1983. – Т. 42. – №. 2. – С. 127-135.