

## Experimental Studies

**Нелинейные локальные деформации мембран эритроцитов:  
нормальные эритроциты (Часть 1)**А. М. Черныш<sup>1,2</sup>, Е. К. Козлова<sup>1,2</sup>, В. В. Мороз<sup>1</sup>, В. А. Сергунова<sup>1</sup>,  
О. Е. Гудкова<sup>1</sup>, А. П. Козлов<sup>2</sup>, Е. А. Манченко<sup>1</sup><sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитации,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2**Nonlinear Local Deformations of Erythrocyte Membranes:  
Normal Erythrocytes (Part 1)**Alexander M. Chernysh<sup>1,2</sup>, Elena K. Kozlova<sup>1,2</sup>, Viktor V. Moroz<sup>1</sup>, Viktoria A. Sergunova<sup>1</sup>,  
Olga E. Gudkova<sup>1</sup>, Alexander P. Kozlov<sup>2</sup>, Ekaterina A. Manchenko<sup>1</sup><sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,  
25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia<sup>2</sup> I. M. Setchenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
8, Trubetskaya Str., Build. 2, Moscow 119991, Russia

Изучение механических свойств мембран эритроцитов — острая проблема в практической реаниматологии и реабилитологии, так как способность эритроцитов деформироваться определяет возможность их прохождения через капиллярную сеть и реологию крови в целом.

**Цель работы:** исследование процесса нелинейной деформации мембран нормальных эритроцитов.

**Материалы и методы.** Методом атомно-силовой спектроскопии исследовали локальную жесткость мембран эритроцитов: дискоцитов — на торе и на впадине, планоцитов — на поверхности клетки.

**Результаты.** Процесс нелинейной деформации описывали функциями  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  и  $\mu(h)$ . Этот набор функций полно описывает процесс индентации (погружения) зонда в мембраны. Показали, что пошаговые зависимости коэффициента жесткости участков мембран существенно различаются и зависят от ее состояния.

**Заключение.** Предложенный подход может быть использован при проведении фундаментальных и клинических исследований свойств клеток крови в норме и при различных заболеваниях. Особенно эффективным метод регистрации нелинейных деформаций может быть в практике реаниматологии и реабилитологии.

*Ключевые слова: мембраны эритроцитов; нелинейная деформация; атомно-силовая спектроскопия; кинетика погружения зонда*

Investigation of mechanical properties of erythrocyte membranes is a pressing issue in practical reanimatology and rehabilitation, because erythrocyte's ability to deform determines the possibility of their passage through capillary network and blood rheology in general.

**The purpose of the work:** to study the process of nonlinear deformation of membranes of normal erythrocytes by the method of atomic force spectroscopy.

**Materials and Methods.** The local stiffness of erythrocyte membranes was studied: that of diskocytes — on the torus and on the depression, that of planocytes — on the cell surface. Atomic force spectroscopy was used for cell membrane study.

**Results.** The nonlinear deformation process was described by functions  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$ , and  $\mu(h)$ . This set of functions describes in full the process of probe incorporation (submergence) into membranes. It has been shown that stepwise dependencies of the stiffness coefficient of membrane segments differ significantly and depend on its condition.

**Conclusion.** The suggested approach may be used in fundamental and clinical studies of blood cells' properties in the norm and different diseases. The method of recording nonlinear deformations may be especially efficient in the reanimatology and rehabilitation practice.

*Keywords: nonlinear deformation; erythrocyte membranes; atomic force spectroscopy; probe submergence kinetics*

DOI:10.15360/1813-9779-2017-5-58-68

Адрес для корреспонденции:

Александр Черныш  
E-mail: orbf@mail.ru

Correspondence to:

Alexander Chernysh  
E-mail: orbf@mail.ru

## Введение

Изучение механических свойств мембран эритроцитов — одна из ключевых проблем нормальной и патологической физиологии крови. Способность эритроцитов деформироваться определяет возможность их прохождения через капиллярную сеть и реологию крови в целом [1]. Особенно остро стоит эта проблема в практической реаниматологии и реабилитологии. Это определяется тем, что при критических состояниях, при кровопотерях, при сочетанных травмах собственные параметры мембран эритроцитов меняются в широких пределах [2, 3].

Атомно-силовая спектроскопия (АСС) — уникальный метод исследования механических свойств биологических мембран. Он позволяет получать изображения наноповерхности мембран и, практически одновременно, исследовать ее способность деформироваться (прогибаться) под действием индентора [4, 5]. Так измеряют жесткость стенок сосудов, фрагментов мышечных структур, фибробластов [6], клеток эпителия и эндотелия [7, 8], хромосом, липосом, дрожжей [9] бактериальных клеток [10–12], кардиомиоцитов [13], тканей мозга [14] и ряд других.

По силовым кривым, измеренным в поверхностном слое, рассчитывается модуль Юнга, который приписывается всему объему материала [15].

Компоненты мембраны эритроцитов имеют собственные механические свойства. Мягкий, практически прозрачный для зонда, липидный бислой, жесткий спектриновый матрикс — цитоскелет, протеиновые узлы связей — белки band 4.1, band 3, анкирина, актина и ряда других. В силу многочисленных и достаточно прочных связей между фосфолипидным бислоем и спектриновым матриксом при действии на клетку индентора эти структуры ведут себя как единая неоднородная (в смысле упруго-эластичных свойств) композитная конструкция клетки.

Цель работы — исследование процесса нелинейной деформации мембран нормальных эритроцитов.

## Материал и методы

**Метод измерения и объект.** Измерения локальной жесткости мембраны эритроцитов проводили методом атомно-силовой спектроскопии [16]. Использовали атомный силовой микроскоп (АСМ) «Integra Prima NT-MDT» (Россия). Кантилеверы SD-R150-NCL (Nanosensor, Switzerland), радиус R зонда 150 нм, высота зонда 15 мкм, коэффициент упругости кантилевера  $K=36$  Н/м, резонансная частота 190 кГц.

Для получения изображений проводили сканирование эритроцитов в резонансном режиме в поле АСМ  $100 \times 100$  мкм, выбирали клетку для исследования (группу клеток), сканировали в поле  $10 \times 10$  мкм. Затем в режиме атомно-силовой спектроскопии устанавлива-

## Introduction

Clarifying the mechanical properties of erythrocyte membranes is a key problem of normal and pathological physiology of blood. Erythrocytes' ability to deform determines the possibility of their passing through capillary network and blood rheology in general [1]. This issue is particularly relevant in practical reanimatology and rehabilitation, because in critical conditions, blood losses, concomitant injuries, the parameters of erythrocyte membranes vary in a wide range [2, 3].

Atomic-force spectroscopy (AFS) is a unique method of investigating the mechanical properties of biological membranes. It allows acquiring images of membrane nano-surfaces and studies of its ability to deform (yield) under the indenter's action [4, 5]. In this way, stiffness of vascular walls, fragments of muscular structures, fibroblasts [6], epithelial and endothelial cells [7, 8], chromosomes, liposomes, yeast [9] bacterial cells [10–12] cardiomyocytes [13] brain tissue and some others [14] are measured.

Based on the force curves measured in the surface layer, Young's modulus is calculated, which is attributed to the whole volume of material [15].

Erythrocyte membrane components have their own mechanical properties: soft, almost transparent for the probe, lipid bilayer, stiff spectrin matrix — cytoskeleton, protein links nodes — proteins band 4.1, band 3, ankyrin, actin, and otherones. By virtue of multiple and sufficiently strong links between phospholipid bilayer and spectrin matrix, under indenter's action on a cell, the behavior of those structures constitutes a single heterogeneous (in terms of viscoelastic properties) composite cellular structure.

Purpose of the work: to study the process of nonlinear deformation of membranes of normal erythrocytes by the method of atomic force spectroscopy.

## Materials and Methods

**Method of Measurement and Object.** Measurements of the local stiffness of erythrocyte membrane were performed with the aid of atomic-force spectroscopy [16]. Atomic-force microscope (AFM) 'Integra Prima NT-MDT' (Russia) was used. Cantilevers SD-R150-NCL (Nanosensor, Switzerland), probe radius R is 150 nm, probe height is 15  $\mu$ m, cantilever elasticity coefficient  $K=36$  N/m, resonant frequency = 190 kHz.

To receive images, erythrocytes were scanned in a resonance mode in AFM  $100 \times 100$   $\mu$ m field, a cell (or group of cells) were selected for analysis and scanned in the field of  $10 \times 10$   $\mu$ m. Thereafter, in an atomic-force spectroscopy mode, a marker was placed on the cell membrane imagin surface and the region was exposed to an indenter (probe) acting with the force F. Force curves were obtained [17].

Local stiffness of membranes was measured in formed monolayers of erythrocytes mounted on a slide. Monolayers of cells were produced with the aid of special

ли маркер на изображении мембраны клетки и действовали на эту область индентором (зондом) с силой F. Получали силовые кривые [17].

Локальную жесткость мембран измеряли в сформированных монослоях эритроцитов на предметном стекле. Монослои клеток получали с помощью специализированного устройства «V-Sample VISION» (Австрия). Измерения проводили при температуре 18°C сразу после формирования монослоя. Измерения, проведенные в этих условиях, давали воспроизводимые результаты.

Забор крови осуществляли у здоровых пациентов на добровольной основе при профилактических осмотрах, и все дальнейшие исследования проводили *in vitro*. В исследовании использовали кровь 6 доноров мужского пола от 23 до 34 лет. Все исследования проводили с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г, а также с нормами этического комитета ФНКЦ РР.

Исследовали локальную жесткость мембран красных клеток крови: дискоцитов — на торе и на впадине, планоцитов — на поверхности клетки. Анализировали по 5 дискоцитов и по 4 планоцита каждого донора. На каждом дискоците проводили по 4 измерения локальной жесткости мембран на торе и по 3 на впадине. Планоциты в крови доноров — результат физиологического пойкилоцитоза. На поверхности каждого планоцита измеряли локальную жесткость 4 фрагментов. Всего измерено 120 фрагментов на торе, 90 фрагментов во впадине дискоцитов и 96 фрагментов на планоцитах. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы Origin 9, (Origin Lab Corporation, USA). Строили гистограммы, определяли среднее значение, величину среднеквадратического отклонения и получали интервальную оценку, оценку достоверности полученных результатов, оценку достоверности различий. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way, ANOVA).

**Требования к процессу измерений и к зондам.** Коэффициент упругости K кантилевера (консоли) должен быть соизмерим со средним коэффициентом жесткости  $\mu$  исследуемого материала (мембраны клетки) [18]. Если  $K \ll \mu$ , то зонд внедряется только в приповерхностный слой. Это не даст возможности оценить упруго-эластичные свойства неоднородного материала мембраны. Исходя из экспериментальных данных оптимальное значение K для измерения локальной жесткости мембран эритроцитов лежит в пределах 10–50 Н/м для сухих клеток и 1,0–0,1 Н/м для нативных клеток.

Радиус R зонда должен быть не менее 100 нм, оптимально 100–200 нм. Малая величина R (10–30 нм) приводит к проникновению зонда в структуру мембраны через липидный бислой и через полые поля цитоскелета [19]. Результаты таких измерений не воспроизводимы. Поэтому для регистрации  $\mu$  мембраны необходимо, чтобы R был больше размера ячейки спектринного матрикса. Радиус более 400 нм не позволит зонду погрузиться в мембрану. В наших работах мы использовали зонды с радиусом 150 нм.

В работе отдельно провели испытывания кантилеров SD-Sphere-NCH-S-10 (Nanosencor, Switzerland),

device — V-Sample VISION (Austria). Measurements were done at a temperature of 18°C immediately after a monolayer has been formed. Measurements were carried out in the above conditions that delivered reproducible results.

Blood was harvested from patients on a voluntary basis during preventive examinations, and all subsequent analysis were performed *in vitro*. In the study, blood of 6 male donors aged 23 to 34 years was used. All studies followed the requirements of the Helsinki Declaration of the World Medical Association «Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects» as amended in 2000, and the Protocol of the Ethics Committee of the Federal Research and Clinical Center for Intensive Care Medicine and Rehabilitology.

The local stiffnesses of erythrocyte membranes were studied: that of diskocytes — on the torus and on the depression, that of planocytes — on the cell surface. 5 diskocytes and 4 planocytes per each donor were analyzed. On each diskocyte, 4 measurements of membrane stiffness were done on the torus and 3 measurements — on the depression. Planocytes in donors' blood resulted from the physiological poikilocytosis. On the surface of each planocyte, local stiffness of 4 fragments was measured. In total, 120 fragments were measured on the torus and 90 fragments were measured on the depression of diskocytes, and 96 fragments were measured on planocytes. Statistic processing of data was performed with the aid of standard software Origin 9 (Origin Lab Corporation, USA). Histograms were created, the mean, mean-square deviations, intervals, confidence estimation of the results and significance of differences were determined by One-way-ANOVA.

**Requirements to the Process of Measurements and Probes.** The elasticity coefficient K of a cantilever (console) should be commensurable with the mean stiffness coefficient  $\mu$  of the material under investigation (cell membrane) [18]. If  $K \ll \mu$ , probe penetrates only into the near-surface layer. This does not allow evaluating. Это не даст возможности оценить viscoelastic properties of the heterogeneous membrane material. Based on experimental data, the optimal K for measuring local stiffness of erythrocyte membranes is within the range of 10–50 N/m for dry cells and 1.0–0.1 N/m for native cells.

Radius R of the probe should be not less than 100 nm, the optimal range is 100–200 nm. A small R (10–30 nm) results in probe's penetration into the membrane structure through lipid bilayer and hollow fields of cytoskeleton [19]. Results of such measurements are not reproducible. Hence, for recording membrane's  $\mu$ , it is necessary for R to be larger than the size of the spectrin matrix cellule. A radius exceeding 400 nm will preclude probe submergence into the membrane. In our work, we used probes with a radius of 150 nm.

Within the work, separate tests of cantilevers SD-Sphere-NCH-S-10 (Nanosencor, Switzerland), probe radius R=400 nm, were carried out. Such probes were submerged into erythrocyte membrane by 10–14 nm only, which in principle did not allow measuring membranes' deformability.

Cantilever calibration on a completely stiff material (for example, glass) must be performed before and after measurements.

радиус  $R$  зонда 400 нм. Такие зонды погружались в мембрану эритроцита лишь на 10–4 нм, что в принципе не позволяло измерять способность мембран деформироваться.

Калибровку кантилевера на абсолютно жестком материале (например, стекле) необходимо проводить до и после измерений.

Время индентации зонда не должно быть коротким. Быстрое погружение может менять характеристики материала [20, 21]. Оптимальное время индентации 5–10 секунд.

При действии индентора могут возникать два типа деформации мембраны: чисто упругая — подчиняется закону Гука и упруго-эластичная, при которой связь между механическим напряжением и относительной деформацией нелинейна [20, 22]. При том и другом виде деформаций после снятия нагрузки мембрана должна восстанавливать свою форму.

Как себя ведет мембрана эритроцита? Для ответа на этот вопрос после деформации мембраны в результате действия зонда (измерения жесткости) вновь сканировали поверхность той же области клетки. Мембрана эритроцита восстановила свою начальную форму, остаточная деформация не наблюдалась. Подобные результаты приведены и в [23]. Мембрана, под действием индентора (зонда) вела себя как упруго — эластичный деформируемый материал.

## Результаты и обсуждение

**Построение силовых кривых.** Способность мембраны под действием индентора деформироваться внутрь клетки оценивали коэффициентом локальной жесткости  $\mu$  (Н/м) на глубине  $h$ .

Эмпирическая силовая кривая, полученная с помощью АСМ — это зависимость тока рассогласования  $I$  фотодиода, а, следовательно, отклонения  $L$  кантилевера от величины вертикального смещения  $z$  пьезосканера. Основание кантилевера закреплено неподвижно, а его конец вместе с зондом отклоняется в результате смещения пьезосканера (рис. 1, а, III). Прямой ход пьезосканера иллюстрируется на рис. 1, а, а процесс погружения индентора в мембрану и ее деформация внутрь эритроцита на рис. 1, б.

На АСМ программно задаются максимальные величины смещения пьезосканера  $z$  и значения тока  $I$ , то есть величины приложенной силы, например:  $z_{\max} = 500$  нм,  $I_{\max} = 1.5$  нА. Если  $\mu \gg K$  (стекло), то между силой  $F$  и отклонением кантилевера  $L$  существует зависимость, определяемая законом Гука.

$$F = -KL \quad (1)$$

Если зонд взаимодействует с мембраной и  $\mu \approx K$  то:

$$F = - [1/K + 1/\mu(h)] L \quad (1a)$$

и зонд погружается в мембрану клетки на глубину  $h$  ( $h \leq z$ ) (рис. 1, б). При этом коэффициент  $\mu$  зависит от глубины погружения зонда —  $\mu(h)$ , и следовательно функция (1a) нелинейна.

На рис. 2 представлены изображения клеток в поле АСМ и силовые кривые для мембраны тора

The time of probe indentation should not be short. Fast submergence might alter material's characteristics [20, 21]. The optimal time of indentation is 5–10 seconds.

Indenter action may cause two types of membrane deformation: purely elastic — it follows Hook's law, and viscoelastic wherein the connection between mechanic stress and relative deformation is nonlinear [20, 22]. In case of both types of deformations, after the load is removed, membrane must recover its shape.

What is the erythrocyte membrane's behavior? To answer this question, after probe-caused membrane deformation (stiffness measurement), the surface of the same region of the cell was scanned again. Erythrocyte membrane recovered its initial shape, no residual deformation was observed. Similar results are given also in [23]. Under the action of an indenter (probe), the membrane behaved as a viscoelastic deformable material.

## Results and Discussion

**Force Curve Building.** Membrane's ability to deform towards inside of a cell under the action of an indenter was evaluated with the help of local stiffness coefficient  $\mu$  (N/m) at depth  $h$ .

The empirical force curve obtained with the help of AFM is the dependence of the photodiode misalignment current, hence, cantilever deviation  $L$  from piezoscanner vertical shift  $z$ . The cantilever base is fixed rigidly, while its end together with the probe deviates as a result of piezoscanner shift (fig. 1, a, III). Piezoscanner's straight path is illustrated on figure 1a; the process of indenter submersion into the membrane and its deformation inside erythrocyte is shown in fig. 1, b.

In AFM, the program sets the maximal limits of piezoscanner shift  $z$  and current  $I$ , i.e. the applied force values, for example:  $z_{\max} = 500$  nm,  $I_{\max} = 1.5$  nA. If  $\mu \gg K$  (glass), then there is dependence between force  $F$  and cantilever deviation  $L$ , which is determined by the Hook's law.

$$F = -KL \quad (1)$$

If a probe interacts with a membrane and  $\mu \approx K$ , then:

$$F = - [1/K + 1/\mu(h)] L \quad (1a)$$

and the probe submerges into the cell membrane to depth  $h$  ( $h \leq z$ ) (fig. 1, b). In this instance, coefficient  $\mu$  depends on the probe submergence depth —  $\mu(h)$ , and, hence, function (1a) is nonlinear.

Figure 2 shows images of cells in the AFM field and force curves for diskocyte membrane torus — region 'Tor', — diskocyte membrane depression — region 'Dep', and planocyte — region 'Pl'.

These curves differ from each other by the behavior of material deformed under the applied force action. The slope of straight line for glass is determined by cantilever stiffness  $K$  — elastic deformation model. Point A is the point of contact of the probe and membrane. This point is determined empirically as a point in which  $dI/dz$  becomes greater than 0. Point B is the point where the curve reaches



дискоцита — область «Тор», — мембраны впадины дискоцита — область «Дер» и — планоцита — область «Pl».

Эти кривые отличаются друг от друга поведением деформируемого материала под действием приложенной силы. Тангенс угла наклона прямой для стекла определяется жесткостью кантилевера  $K$  — модель упругой деформации. Точка А — точка касания зонда и мембраны. Эта точка определяется эмпирически, как точка, в которой  $dI/dz$  становится больше 0. Точка В — точка выхода кривой на упругую деформацию. Для мембран клеток (рис. 2) участок А–В — фаза упруго-эластичной деформации, участок В–С — чисто упругой.

#### Анализ силовых кривых.

Дальнейший анализ процесса индентации зонда требует перехода к координатам  $F(z)$  и ряда преобразований. Переход к  $F(z)$  и инвертирование графиков осуществляется согласно выражению:

$$F(z) = (I_m/I_g)Kz, \quad (2)$$

где:  $I_m$  и  $I_g$  — токи рассогласования при действии индентора на мембрану и стекло соответственно.

Для области, расположенной на торе дискоцита, зависимость  $F(z)$  представлена на рис. 3.

Прямая «G» — это зависимость, описываемая выражением (1). Кривая «M» — зависимость силы  $F$ , которая прикладывается к поверхности мембраны тора дискоцита со стороны зонда при его подъеме на величину  $z$ .

Сила  $F$  определяет отклонение кантилевера  $L$  и одновременно деформацию самой мембраны, то есть погружение зонда в мембрану на глубину  $h$ .

Кривая «M» содержит в себе три компонента: — компоненту нелинейной упругости мембраны, — компоненту упругости кантилевера, — компоненту переменной геометрии индентора, определяемую формулой Герца [15].

Величина  $h$  погружения зонда в мембрану:

$$h = z - L, \quad (3)$$

или в координатах рисунка 3:

$$h_i = z_m - z_g \quad (3a)$$

Введем параметр  $\Delta h$  — углубление зонда в мембрану клетки при одинаковом дискретном подъеме пьезосканера на величину  $\Delta z$ .

Для разных углублений  $h_i$  величина  $\Delta h$  может быть разной в зависимости от свойств данной мембраны. Величина  $\Delta z$  задается исходя из свойств мембраны клетки и необходимой дискретности описания изучаемой структуры.

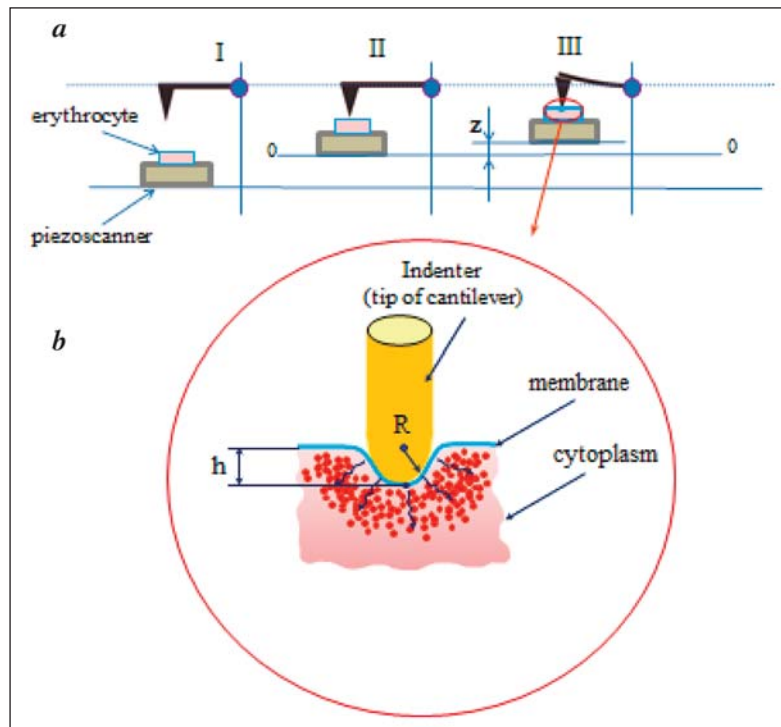


Рис. 1. Измерение жесткости мембраны в атомно-силовой спектроскопии.

Fig. 1. AFM study of erythrocyte membrane rigidity.

Note. a: I–II — piezoscanner and erythrocyte bring to Z level; III — probe indentation; b: dipping the cantilever into the cell membrane to a depth  $h$ , zoomed.

Примечание. Erythrocyte — эритроцит; piezoscanner — пьезосканер; Indenter (tip of cantilever) — индентер (кончик кантилевера); membrane — мембрана; cytoplasm — цитоплазма. a: I–II — подвод пьезосканера и эритроцита на величину  $Z$ ; III — индентация зонда в клетку; b: погружение кантилевера в мембрану клетки на глубину  $h$ , увеличенный масштаб.

elastic deformation. For cell membranes (fig. 2), region A–B is the phase of viscoelastic deformation, region B–C is purely elastic deformation.

**2.4. Analysis of Force Curves.** Further analysis of the process of probe indentation requires transition to coordinates  $F(z)$  and a number of transformations. Transition to  $F(z)$  and inversion of diagrams are done according to expression:

$$F(z) = (I_m/I_g)Kz, \quad (2)$$

where:  $I_m$  and  $I_g$  are currents of misalignment at indenter's action on the membrane and glass, respectively.

For the region located on the diskocyte torus, dependence  $F(z)$  is shown in fig. 3.

Straight line 'G' is the dependence described by expression (1). Curve 'M' is force  $F$  that is applied to the diskocyte torus membrane surface on the side of the probe when it is lifted to  $z$ .

Force  $F$  determines cantilever deviation  $L$  and simultaneously deformation of the membrane itself, i.e. probe submergence into membrane to depth  $h$ .

Curve 'M' contains three components: — the component of membrane nonlinear elasticity, — the component of cantilever elasticity, — the component

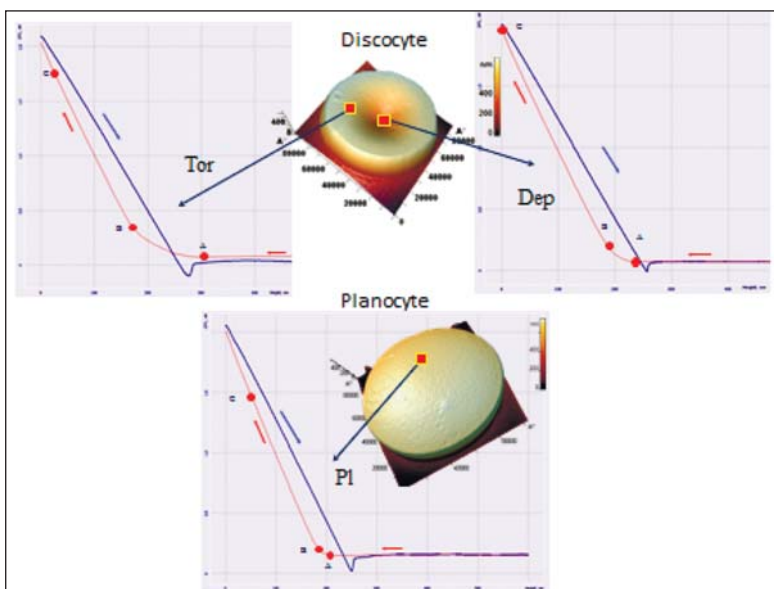


Рис. 2. Дискцит и планцит в поле АСМ, силовые кривые для клеточных мембран.

Fig. 2. Images of diskocyte and planocyte in the AFM field and force curves for cells membrane.

Note. For fig. 2, 4, tabl. 1, 2: Tor – diskocyte torus; Dep – diskocyte membrane depression; Pl – planocyte. A – the point of contact of the probe and membrane; B – the point where the curve reaches elastic deformation; region A–B is the phase of viscoelastic deformation; region B–C is purely elastic deformation. The arrows show the direction of the piezoscaner movement.

Примечание. Для рис. 2, 4, табл. 1, 2: Diskocyte – дискцит; Tor – область тора; Dep – область впадины; Planocyte, Pl – планцит. А – точка касания зонда и мембраны; В – точка выхода кривой на упругую деформацию; А–В упруго-эластичная деформация; В–С – упругая деформация. Стрелки указывают на направление хода пьезосканера.

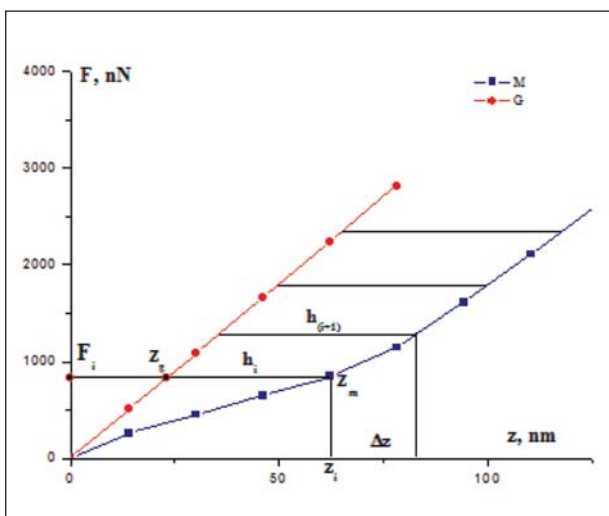


Рис. 3. Функции  $F(Z)$  для области, расположенной на торе дискцита.

Fig. 3.  $F(Z)$  curves for diskocyte torus region.

Note. Curve M is force  $F$  that is applied to the diskocyte torus membrane surface on the side of the probe when it is lifted to  $Z$ . Curve G is the dependence described by expression (1).  $h$  – probe dipping, nm.

Примечание. М – для мембраны эритроцита; G – для абсолютно твердого тела (стекло);  $F$  – сила, действующая на образец (nN),  $Z$  – величина смещения пьезосканера (nm),  $h$  – глубина погружения зонда (nm).

of indenter variable geometry determined by the Hertz formula [1].

Value  $h$  of probe submergence into membrane is:

$$h = z - L, \quad (3)$$

or in the coordinates of figure 3:

$$h_i = z_m - z_g \quad (3a)$$

Let us introduce parameter  $\Delta h$  – probe deepening into the cell membrane at equal discrete rise of the piezoscaner by value  $\Delta z$ .

For different deepenings  $h_i$ , value  $\Delta h$  may differ depending on the properties of a particular membrane. Value  $\Delta z$  is set based on the cell membrane's properties and required discretion of description of the structure under investigation.

Further analysis requires building dependence  $\Delta h(h)$ . How can this dependence be obtained?

To this end, in the beginning, it is necessary to find dependence  $\Delta h(z)$ . Let us set discrete step  $\Delta z$ , for example, 20 nm in figure 3. For each value of  $z_m$  (curve 'M'), we shall determine values  $z_g$  (straight line 'G') for the same force  $F_i$ . Function  $h(z)$  is determined by expression (3a).

Then:

$$\Delta h_i = h_{i+1} - h_i \quad (4)$$

for sequence of  $z_i$  via chosen

discrete step  $\Delta z$ .

To obtain the resulting characteristic – the value of discrete submergence of probe into membrane, at set step  $\Delta z$  we will obtain dependence looking like:

$$dh/dz = f(h) \quad (5)$$

or for discrete representation of function:

$$\Delta h / \Delta z = f(h) \quad (5a)$$

Function (5a) allows describing the process of heterogeneous submergence of a probe into a composite membrane and evaluating membrane's viscoelastic properties. For a fuller description of the probe indentation process, dependence  $\mu(h)$  is built. Cantilever elasticity  $K$  and membrane local stiffness  $\mu$  are included successively. Then, from figure 3 and expressions (2) and (3a) for different values  $h$ :

$$\mu = I_m K / (I_g - I_m) \quad (6)$$

The diagrams of function  $F(z)$ ,  $h(z)$ ,  $\Delta h(z)$ ,  $\Delta h(h)$ ,  $\Delta h / \Delta z(h)$ , and  $\mu(h)$  according to equations (2–6) are calculated and built by special programs written for realization of this method.

**Process of Probe Indentation into Membranes of Normal Erythrocytes.** Figure 4 shows dependencies  $h(z)$ ,  $\Delta h / \Delta z(h)$ , and  $\mu(h)$  for diskocyte torus, diskocyte depression, and planocyte. These figures contain respective statistical dispersions of values under analysis.

**Таблица 1. Средние значения величин  $z_{\max}$ ,  $L_{\max}$  и  $h_{\max}$  для дискоцита, тора и впадины дискоцита.**  
**Table 1. Mean  $z_{\max}$ ,  $L_{\max}$ , and  $h_{\max}$  for diskocyte torus, diskocyte depression, and planocyte.**

Parameters, nm	Values of parameters in cells		
	Diskocyte		Planocyte (Pl)
	Tor	Dep	
$z_{\max}$	223±27	203±25	189±21
$L_{\max}$	161±19	168±14	162±12
$h_{\max}$	62±7	35±5	27±3

**Примечание.** Для табл.1, 2: Parameters — параметры; Values of parameters in cells — значения параметров в клетках.

Для дальнейшего анализа надо построить зависимость  $\Delta h(h)$ . Как получить эту зависимость?

Для этого, в начале, надо найти зависимость  $\Delta h(z)$ . Зададим дискретный шаг  $\Delta z$ , например, 20 нм на рисунке 3. Для каждого значения  $z_m$  (кривая «М») определим величины  $z_g$  (прямая «G») для одной и той же силы  $F_i$ . Функция  $h(z)$  определяется выражением (3а).

Тогда:

$$\Delta h_i = h_{i+1} - h_i \quad (4)$$

для последовательности  $z_i$  через выбранный дискретный шаг  $\Delta z$ .

Для получения результирующей характеристики — величины дискретного погружения зонда в мембрану, при заданном шаге  $\Delta z$  получаем зависимость вида:

$$dh/dz = f(h) \quad (5)$$

или для дискретного представления функции:

$$\Delta h/\Delta z = f(h) \quad (5a)$$

Функция (5а) позволяет описать процесс неоднородного погружения зонда в композитную мембрану и оценить упруго-эластичные свойства мембраны. Для более полного описания процесса индентации зонда строится зависимость  $\mu(h)$ . Упругость кантилевера  $K$  и локальная жесткость мембраны  $\mu$  включены последовательно. Тогда из рисунка 3 и выражений (2) и (3а) для различных значений  $h$ :

$$\mu = I_m K / (I_g - I_m) \quad (6)$$

Графики функции  $F(z)$ ,  $h(z)$ ,  $\Delta h(z)$ ,  $\Delta h(h)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  и  $\mu(h)$  в соответствии с уравнениями (2–6) вычисляются и строятся специализированными программами написанными для реализации этого метода.

**Процесс индентации зонда в мембраны нормальных эритроцитов.** На рис. 4 приведены зависимости  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  и  $\mu(h)$  для тора дискоцита, впадины дискоцита и для планоцита. На этих рисунках приведены соответствующие статистические разбросы оцениваемых величин.

Величина максимального погружения  $h_{\max}$  зонда может меняться в широком диапазоне для разных клеток. Средние значения величин  $z_{\max}$ ,  $L_{\max}$  и  $h_{\max}$  для тора дискоцита, впадины дискоцита и планоцита, представлены в табл. 1.

На каждом графике  $h(z)$  можно выделить два характерных участка: линейный и нелинейный. Для графика Тор дискоцита граница этих

The value of maximal probe submergence  $h_{\max}$  may vary within a wide range for different cells. Mean values of  $z_{\max}$ ,  $L_{\max}$ , and  $h_{\max}$  for diskocyte torus, diskocyte depression, and planocyte are given in table 1.

On each diagram of  $h(z)$ , two typical regions can be identified: linear and nonlinear. For the diskocyte Tor diagram, the border of these regions  $z = 78$  11 nm, for the diskocyte Dep diagram  $z = 34 \pm 4$  nm, and for planocyte Pl diagram  $z = 28 \pm 4$  nm. Up to these borders,  $h$  increases from  $z$  almost linearly, i.e. elastic deformation takes place (1). After these borders, function  $h(z)$  is nonlinear, membrane behaves as a viscoelastic medium and follows viscoelastic deformation. The type of function (5а) for diskocyte torus is shown in fig. 4, *b* Tor.

Below, in the description of results, mean values are given.

The surface layer up to 10 nm is almost transparent for the indenter:  $\Delta h/\Delta z = 0.85$ . In the layer of 10–50 nm, local stiffness grew and normalized value  $\Delta h/\Delta z$  dropped to 0.19. In the next layer of 50–62 nm,  $\Delta h/\Delta z$  dropped to 0. At depth  $h = 62$  nm, the probe stopped submersion into the cell membrane.

For diskocyte depression (Dep), these dependencies had the same trends as for Tor. In the surface layer to 8 nm, decrease of  $\Delta h/\Delta z$  amounted to 0.78, and in the layer of 8–35 nm,  $\Delta h/\Delta z$  dropped monotonously to 0. At  $h = 35$  nm,  $\Delta h = 0$ , which meant probe stop.

Biological objects, in particular, erythrocyte membranes, feature high variability of properties and structural peculiarities. Therefore, mechanical properties of membranes of different erythrocytes may vary considerably. For planocyte (fig. 4, *b*) to 7 nm, decrease of  $\Delta h/\Delta z$  amounted to 0.85. Thereafter, to  $h = 21$  nm,  $\Delta h/\Delta z$  decreased to 0.1, and at  $h = 28$  nm, the probe stopped submersion into the membrane.

From dependence  $F(z)$  (fig. 2) and (6), we obtain the dependence of cell membranes' local stiffness coefficient  $\mu$  on probe submergence depth  $h$  (fig. 4, *c*). As the probe submerged (membrane dipped towards inside of the cell), coefficient  $\mu$  increases at first linearly and then nonlinearly. The borders of the regions of linear and nonlinear dependencies  $\mu(h)$  are given in table 2.

A number of papers evaluate Young's modulus  $E$  to describe stiffness of a biological object under in-

участков  $z=78\pm 11$  нм, для графика Дер дискочита  $z=34\pm 4$  нм, а для планочита  $z=28\pm 4$  нм. До этих границ  $h$  растет от  $z$  почти линейно, то есть имеет место упругая деформация (1). После этих границ функция  $h(z)$  нелинейна, мембрана ведет себя как вязко-упругая среда и подчиняется упруго-эластичной деформации. Вид функции (5а) для тора дискочита представлен на рис. 4, *b* Тор.

Ниже, при описании результатов приводятся средние значения величин.

Поверхностный слой до 10 нм практически прозрачен для индентора:  $\Delta h/\Delta z=0,85$ . В слое 10–50 нм локальная жесткость возрастала и нормированная величина  $\Delta h/\Delta z$  падала до 0,19. В последующем слое 50–62 нм  $\Delta h/\Delta z$  падала до 0. На глубине  $h=62$  нм зонд прекращал погружение в мембрану клетки.

Для впадины дискочита (Dep) эти зависимости имели такие же тенденции, что и для Тор. В поверхностном слое до 8 нм падение  $\Delta h/\Delta z$  составило 0,78, в слое 8–35 нм величина  $\Delta h/\Delta z$  монотонно падала до 0. При  $h=35$  нм величина  $\Delta h=0$ , что означало остановку зонда.

Биологические объекты, в частности, мембраны эритроцитов, обладают высокой вариабельностью свойств и структурных особенностей. Поэтому механические свойства мембран различных эритроцитов могут существенно различаться. Так для планочита (рис. 4, *b*) до 7 нм падение  $\Delta h/\Delta z$  составило 0,85. Затем до  $h=21$  нм  $\Delta h/\Delta z$  уменьшилась до 0,1, а, при  $h=28$  нм, зонд прекратил погружение в мембрану.

Из зависимости  $F(z)$  (рис. 2) и (6) получаем зависимость коэффициента локальной жесткости  $\mu$  мембран клетки от глубины  $h$  погружения зонда (рис. 4, *c*). По мере погружения зонда (прогиба мембраны внутрь клетки) коэффициент  $\mu$  возрастает вначале линейно, а затем нелинейно. Границы участков линейной и нелинейной зависимостей  $\mu(h)$  представлены в табл. 2.

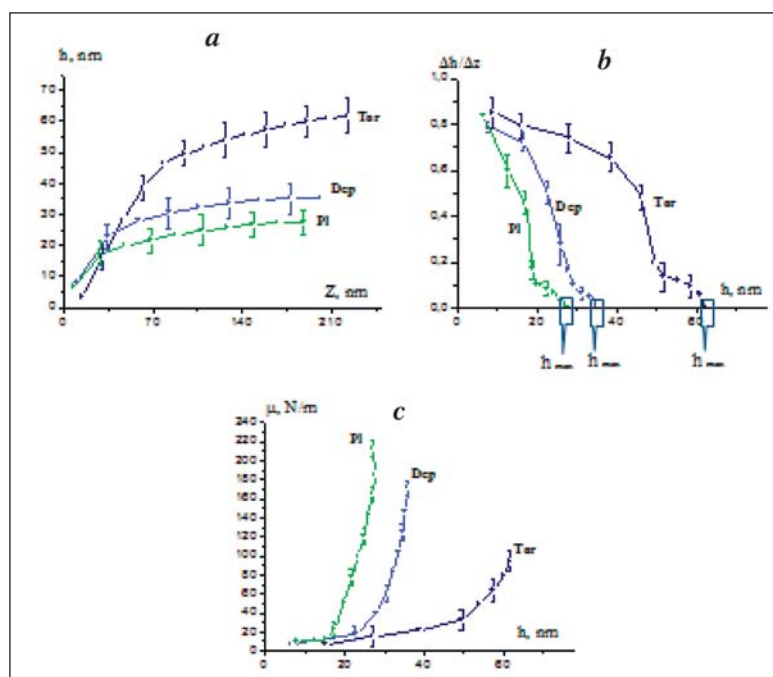


Рис. 4. Зависимости  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  и  $\mu(h)$  для планочита, тора и впадины дискочита.

Fig. 4. Dependencies  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  and  $\mu(h)$  for diskocyte torus, diskocyte depression and planocyte.

investigation [24–26]. It is assumed that the material is homogenous and, hence, value  $E$  measured for the surface layer may be attributed to the whole section (volume) of an object.

Such interpolation will be inadequate for the case of heterogeneous composite membrane [9, 27], because functions  $h(z)$  and  $\mu(h)$  are nonlinear (fig. 4, *a*) and membrane behaves as a viscoelastic medium.

This approach allows evaluating local deformations of RBC membranes not only by the end value of  $h_{max}$ , but also evaluating changes of nonlinear stiffness of membranes as their deformation towards inside of a cell (as probe indentation) increases.

Investigating viscoelastic deformations of erythrocytes' membranes, it should be discussed what physical value can adequately describe properties of such membranes. In this paper these properties are described by functions  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  and  $\mu(h)$ . This set of functions describes the process of probe indentation (submergence) in membranes fully enough.

Таблица 2. Границы участков линейной и нелинейной зависимостей  $\mu(h)$  для нормальных эритроцитов.  
Table 2. Borders of the regions of linear and nonlinear dependencies  $\mu(h)$  for normal erythrocytes.

Parameters, nm	Values of parameters in cells		
	Tor	Discocyte	Planocyte (Pl)
Linear region	0–46±5	0–23±3	0–17±2
Nonlinear region	46±5–62±7	23±3–35±5	17±2–27±3

Примечание. Linear region – линейный участок; Nonlinear region – нелинейный участок.



В ряде работ оценивают модуль Юнга  $E$  для описания жесткости исследуемого биологического объекта [24–26]. При этом предполагается, что материал однородный и поэтому можно измеренное по поверхностному слою значение  $E$  приписать всему сечению (объему) объекта.

Для случая неоднородной композитной мембраны такая интерполяция будет неадекватной [9, 27], так как функции  $h(z)$  и  $\mu(h)$  нелинейны (рис. 4, а) и мембрана ведет себя как вязкоупругая среда.

Данный подход позволяет оценивать локальные деформации мембран эритроцитов не только по конечной величине  $h_{\max}$ , но и оценивать изменения нелинейной жесткости мембран по мере увеличения ее деформации внутрь клетки (по мере индентации зонда).

При исследовании упруго-эластичных деформаций мембран эритроцитов следует обсудить, какая физическая величина может адекватно описать свойства таких мембран. В работе эти свойства описываются функциями  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  и  $\mu(h)$ . Этот набор функций достаточно полно описывает процесс индентации (погружения) зонда в мембраны.

В целом можно судить о жесткости мембраны по величине  $h_{\max}$ . Чем меньше  $h_{\max}$ , тем жестче мембрана. Но этот параметр дает лишь общее представление о свойствах мембраны. Если в исследовании поставлена цель изучить локальные свойства различных наноструктур мембраны эритроцита, то необходимо построить функцию  $\Delta h/\Delta z(h)$ . В контексте обсуждаемой задачи параметр  $\mu$  имеет определенный физический смысл: он показывает, какую силу  $F$  необходимо приложить к зонду, что бы он прогнул мембрану и погрузился на глубину  $h_i$ . Если по мере погружения индентора свойства мембраны будут меняться, то и коэффициент  $\mu$  тоже будет различен для разных величин  $h_i$ .

Для неоднородных сред, например, для мембран эритроцитов теоретическая зависимость, определяющая  $F$ , будет иметь вид:

$$F = \Psi[\varphi(h), f(S), \Phi(K)] \quad (7)$$

Функция  $\varphi(h)$  описывает неоднородное поведение мембраны при погружении зонда. Она включает в себя эмпирические зависимости  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  и  $\mu(h)$ , но, по-видимому, не описывается полностью только этими функциями. Именно эта функция и является искомой при исследовании механических свойств мембраны клетки.

Функция  $f(S)$  учитывает изменение активной составляющей геометрии  $S$  зонда при его погружении в мембрану. Эта зависимость описывается формулой Герца.  $\Phi(K)$  — функция, определяемая жесткостью кантилевера  $K$  (1). Функции  $\varphi(h)$ ,  $f(S)$  и  $\Phi(K)$  определяют вид эмпирической кривой  $F(z)$  для клетки (рис. 2, кривая «М»). Глу-

In general, membrane stiffness can be judged based on  $h_{\max}$ . The smaller  $h_{\max}$  is the stiffer is the membrane. However, this parameter gives just a general idea about membrane properties. If an investigation is aimed at studying local properties of different nanostructures of the erythrocyte membrane, it is necessary to build function  $\Delta h/\Delta z(h)$ . In the context of the problem under discussion, parameter  $\mu$  has a definite physical meaning: it shown what force  $F$  should be applied to a probe to make it bend the membrane and submerge to depth  $h_i$ . If as the indenter submerges, the membrane properties change, then coefficient  $\mu$  will also be different for different  $h_i$ .

For heterogeneous media, for example, erythrocytes' membranes, the theoretic dependence determining  $F$  will look as follows:

$$F = \Psi[\varphi(h), f(S), \Phi(K)] \quad (7)$$

Function  $\varphi(h)$  describes the heterogeneous behavior of a membrane during probe submergence. It comprises empirical dependencies  $h(z)$ ,  $\Delta h/\Delta z(h)$  and  $\mu(h)$ , but, apparently, it is not fully described by these functions only. It is this function that is sought for during investigation of cell membrane's mechanical properties.

Function  $f(S)$  takes into account the change of active component of probe's geometry  $S$  during its submersion into a membrane. This dependence is described by the Hertz formula.  $\Phi(K)$  is the function determined by cantilever stiffness  $K$  (1). Functions  $\varphi(h)$ ,  $f(S)$  and  $\Phi(K)$  determine the shape of empirical curve  $F(z)$  for a cell (fig. 2, curve 'M'). The depth and process of submersion strongly depend on function  $\varphi(h)$ . Function  $f(S)$  has little influence on the end result and may be ignored in indenter submersion recording and model building [27, 28].

Measurement of the local stiffness of red blood cells' membranes addresses the issue of getting information about nanomechanical peculiarities and structure of this region of membrane.

## Conclusion

The paper provides the experimental data and substantiates the possibility of measuring local stiffness of blood cell membranes using the method of atomic force spectroscopy. The process of viscoelastic deformation of a membrane accompanying probe indentation is shown. In different cells and even in different zones of one cell, the maximal local stiffness and probe passage process might be different. The suggested approach may be employed in fundamental and clinical studies of parameters blood cells in the norm and diseases. The method of recording nonlinear deformations may be most efficient in the reanimatology and rehabilitation practice.

бина и процесс погружения сильно зависит от функции  $\varphi(h)$ . Функция  $f(S)$  слабо влияет на конечный результат и при регистрации погружения индентора и построении моделей может не учитываться [27, 28].

Измерение локальной жесткости мембран красных клеток крови решает задачу получения информации о наномеханических особенностях и структурном строении данной области мембраны.

## Заключение

В работе привели экспериментальные данные и обосновали возможность измерения ло-

кальной жесткости мембран клеток крови, используя метод атомно-силовой спектроскопии. Показали процесс упруго-эластичной деформации мембраны по мере индентации зонда. На разных клетках, и даже в разных зонах одной клетки, максимальная величина локальной жесткости и процесс прохождения зонда могут быть различными. Предложенный подход может быть использован при проведении фундаментальных и клинических исследований свойств клеток крови в норме и при различных заболеваниях. Особенно эффективным методом регистрации нелинейных деформаций может быть в практике реаниматологии и реабилитологии.

## Литература

1. Хромова В.С., Мышкин А.Е. Коагуляция цинк-модифицированного гемоглобина. *Журнал общей химии*. 2002; 72 (10): 1645–1649.
2. Gudkova O.Ye., Bushueva A.V., Kozlov A.P., Chernysh A.M. Nanostructure and local rigidity of red blood cells (RBC) under influence of membrane modifiers and ionizing radiation. *Conf. Proc. CLINAM*. 2013; 6: 172–173.
3. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. *J. Crit. Care*. 2010; 25 (3): 539.e1–539.e12. DOI: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007. PMID: 20381299
4. Roduit C., van der Goot F.G., De Los Rios P., Yersin A., Steiner P., Dietler G., Catsicas S., Lafont F., Kasas S. Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys. J.* 2008; 94 (4): 1521–1532. DOI: 10.1529/biophysj.107.112862. PMID: 17981897
5. Voitchovsky K., Antoranz Contera S., Kamihira M., Watts A., Ryan J.F. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes. *Biophys. J.* 2006; 90 (6): 2075–2085. DOI: 10.1529/biophysj.105.072405. PMID: 16387758
6. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007; 38 (8): 824–833. DOI: 10.1016/j.micron.2007.06.011. PMID: 17709250
7. Rabinovich Y.I., Daosukho S., Byer K.J., El-Shall H.E., Khan S.R. Direct AFM measurements of adhesion forces between calcium oxalate monohydrate and kidney epithelial cells in the presence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions. *J. Colloid. Interface Sci.* 2008; 325 (2): 594–601. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.06.024. PMID: 18619606
8. Bálint Z., Krizbai I.A., Wilhelm I., Farkas A.E., Párducz A., Szegletes Z., Váró G. Changes induced by hyperosmotic mannitol in cerebral endothelial cells: an atomic force microscopic study. *Eur. Biophys. J.* 2007; 36 (2): 113–120. DOI: 10.1007/s00249-006-0112-4. PMID: 17115151
9. Kasas S., Dietler G. Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers. Arch.* 2008; 456 (1): 13–27. DOI: 10.1007/s00424-008-0448-y. PMID: 18213477
10. Zhao C.X., Shao H.B., Chu L.Y. Aquaporin structure-function relationships: water flow through plant living cells. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2008; 62 (2): 163–172. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.10.015. PMID: 18063350
11. Volle C.B., Ferguson M.A., Aidala K.E., Spain E.M., Núñez M.E. Quantitative changes in the elasticity and adhesive properties of *Escherichia coli* ZK1056 prey cells during predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Langmuir*. 2008; 24 (15): 8102–8110. DOI: 10.1021/la8009354. PMID: 18572929
12. Vadillo-Rodriguez V., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* 2008; 190 (12): 4225–4232. DOI: 10.1128/JB.00132-08. PMID: 18408030
13. Azeloglu E.U., Costa K.D. Dynamic AFM elastography reveals phase dependent mechanical heterogeneity of beating cardiac myocytes. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2009; 2009: 7180–7183. DOI: 10.1109/IEMBS.2009.5335316. PMID: 19965272
14. Franze K. Atomic force microscopy and its contribution to understanding the development of the nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011; 21 (5): 530–537. DOI: 10.1016/j.gde.2011.07.001. PMID: 21840706
15. Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Szyceń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. *Biorheology*. 2005; 42 (4): 307–317. PMID: 16227658

## References

1. Khromova V.S., Myshkin A.E. Coagulation of zinc-modified hemoglobin. *Rus. J. Gen. Chem.* 2002; 72 (10): 1645–1649. DOI: 10.1023/A:1023356221708. [In Russ., In Engl.]
2. Gudkova O.Ye., Bushueva A.V., Kozlov A.P., Chernysh A.M. Nanostructure and local rigidity of red blood cells (RBC) under influence of membrane modifiers and ionizing radiation. *Conf. Proc. CLINAM*. 2013; 6: 172–173.
3. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. *J. Crit. Care*. 2010; 25 (3): 539.e1–539.e12. DOI: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007. PMID: 20381299
4. Roduit C., van der Goot F.G., De Los Rios P., Yersin A., Steiner P., Dietler G., Catsicas S., Lafont F., Kasas S. Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys. J.* 2008; 94 (4): 1521–1532. DOI: 10.1529/biophysj.107.112862. PMID: 17981897
5. Voitchovsky K., Antoranz Contera S., Kamihira M., Watts A., Ryan J.F. Differential stiffness and lipid mobility in the leaflets of purple membranes. *Biophys. J.* 2006; 90 (6): 2075–2085. DOI: 10.1529/biophysj.105.072405. PMID: 16387758
6. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007; 38 (8): 824–833. DOI: 10.1016/j.micron.2007.06.011. PMID: 17709250
7. Rabinovich Y.I., Daosukho S., Byer K.J., El-Shall H.E., Khan S.R. Direct AFM measurements of adhesion forces between calcium oxalate monohydrate and kidney epithelial cells in the presence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions. *J. Colloid. Interface Sci.* 2008; 325 (2): 594–601. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.06.024. PMID: 18619606
8. Bálint Z., Krizbai I.A., Wilhelm I., Farkas A.E., Párducz A., Szegletes Z., Váró G. Changes induced by hyperosmotic mannitol in cerebral endothelial cells: an atomic force microscopic study. *Eur. Biophys. J.* 2007; 36 (2): 113–120. DOI: 10.1007/s00249-006-0112-4. PMID: 17115151
9. Kasas S., Dietler G. Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers. Arch.* 2008; 456 (1): 13–27. DOI: 10.1007/s00424-008-0448-y. PMID: 18213477
10. Zhao C.X., Shao H.B., Chu L.Y. Aquaporin structure-function relationships: water flow through plant living cells. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2008; 62 (2): 163–172. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.10.015. PMID: 18063350
11. Volle C.B., Ferguson M.A., Aidala K.E., Spain E.M., Núñez M.E. Quantitative changes in the elasticity and adhesive properties of *Escherichia coli* ZK1056 prey cells during predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Langmuir*. 2008; 24 (15): 8102–8110. DOI: 10.1021/la8009354. PMID: 18572929
12. Vadillo-Rodriguez V., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* 2008; 190 (12): 4225–4232. DOI: 10.1128/JB.00132-08. PMID: 18408030
13. Azeloglu E.U., Costa K.D. Dynamic AFM elastography reveals phase dependent mechanical heterogeneity of beating cardiac myocytes. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2009; 2009: 7180–7183. DOI: 10.1109/IEMBS.2009.5335316. PMID: 19965272
14. Franze K. Atomic force microscopy and its contribution to understanding the development of the nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011; 21 (5): 530–537. DOI: 10.1016/j.gde.2011.07.001. PMID: 21840706
15. Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Szyceń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. *Biorheology*. 2005; 42 (4): 307–317. PMID: 16227658

## Experimental Studies

16. Picas L., Milhiet P.E., Hernández-Borrell J. Atomic force microscopy: a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chem. Phys. Lipids*. 2012; 165 (8): 845-860. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2012.10.005. PMID: 23194897
17. Hekele O., Goesselsberger C.G., Gebeshuber I.C. Nanodiagnostics performed on human red blood cells with atomic force microscopy. *Mater. Sci. Technol.* 2008; 24 (9): 1162-1165. DOI: 10.1179/174328408X341834
18. Sirghi L., Ponti J., Broggi F., Rossi F. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *Eur. Biophys. J.* 2008; 37 (6): 935-945. DOI: 10.1007/s00249-008-0311-2. PMID: 18365186
19. Zhang C.Y., Zhang Y.W. Extracting elastic properties and prestress of a cell using atomic force microscopy. *J. Mater. Res.* 2015; 24 (3): 1167-1171. DOI: 10.1557/jmr.2009.0121
20. Bremmell K.E., Evans A., Prestidge C.A. Deformation and nano-rheology of red blood cells: an AFM investigation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2006; 50 (1): 43-48. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.002. PMID: 16701986
21. McPhee G., Dalby M.J., Riehle M., Yin H. Can common adhesion molecules and microtopography affect cellular elasticity? A combined atomic force microscopy and optical study. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2010; 48 (10): 1043-1053. DOI: 10.1007/s11517-010-0657-3. PMID: 20623199
22. Fisseha D., Katiyar V.K. Analysis of mechanical behavior of red cell membrane in sickle cell disease. *Appl. Mathematics*. 2012; 2 (2): 40-46. DOI: 10.5923/j.am.20120202.08
23. Kim Y., Kim K., Park Y.K. Blood cell – an overview of studies in hematology. In: Moschandreou T.E. (ed.). Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances. Rijeka, Croatia; 2012: 167-195. DOI: 10.5772/50698
24. Buys A.V., Van Rooy M.J., Soma P., Van Papendorp D., Lipinski B., Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc. Diabetol.* 2013; 12: 25. DOI: 10.1186/1475-2840-12-25. PMID: 23356738
25. Li M., Liu L., Xi N., Wang Y., Dong Z., Xiao X., Zhang W. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci. China Life Sci.* 2012; 55 (11): 968-973. DOI: 10.1007/s11427-012-4399-3. PMID: 23160828
26. Yu M., Wang J., Wang H., Dong S. Calculation of the intracellular elastic modulus based on an atomic force microscope micro-cutting system. *Chin. Sci. Bull.* 2012; 57 (15): 1868-1872. DOI: 10.1007/s11434-012-5053-y
27. Kasas S., Wang X., Hirling H., Marsault R., Humi B., Yersin A., Regazzi R., Grenningloh G., Riederer B., Forró L., Dietler G., Catsicas S. Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 2005; 62 (2): 124-132. DOI: 10.1002/cm.20086. PMID: 16145686
28. Sen S., Subramanian S., Discher D.E. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with AFM: theoretical model and experiments. *Biophys. J.* 2005; 89 (5): 3203-3213. DOI: 10.1529/biophysj.105.063826. PMID: 16113121
16. Picas L., Milhiet P.E., Hernández-Borrell J. Atomic force microscopy: a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chem. Phys. Lipids*. 2012; 165 (8): 845-860. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2012.10.005. PMID: 23194897
17. Hekele O., Goesselsberger C.G., Gebeshuber I.C. Nanodiagnostics performed on human red blood cells with atomic force microscopy. *Mater. Sci. Technol.* 2008; 24 (9): 1162-1165. DOI: 10.1179/174328408X341834
18. Sirghi L., Ponti J., Broggi F., Rossi F. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *Eur. Biophys. J.* 2008; 37 (6): 935-945. DOI: 10.1007/s00249-008-0311-2. PMID: 18365186
19. Zhang C.Y., Zhang Y.W. Extracting elastic properties and prestress of a cell using atomic force microscopy. *J. Mater. Res.* 2015; 24 (3): 1167-1171. DOI: 10.1557/jmr.2009.0121
20. Bremmell K.E., Evans A., Prestidge C.A. Deformation and nano-rheology of red blood cells: an AFM investigation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2006; 50 (1): 43-48. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.002. PMID: 16701986
21. McPhee G., Dalby M.J., Riehle M., Yin H. Can common adhesion molecules and microtopography affect cellular elasticity? A combined atomic force microscopy and optical study. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2010; 48 (10): 1043-1053. DOI: 10.1007/s11517-010-0657-3. PMID: 20623199
22. Fisseha D., Katiyar V.K. Analysis of mechanical behavior of red cell membrane in sickle cell disease. *Appl. Mathematics*. 2012; 2 (2): 40-46. DOI: 10.5923/j.am.20120202.08
23. Kim Y., Kim K., Park Y.K. Blood cell – an overview of studies in hematology. In: Moschandreou T.E. (ed.). Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances. Rijeka, Croatia; 2012: 167-195. DOI: 10.5772/50698
24. Buys A.V., Van Rooy M.J., Soma P., Van Papendorp D., Lipinski B., Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc. Diabetol.* 2013; 12: 25. DOI: 10.1186/1475-2840-12-25. PMID: 23356738
25. Li M., Liu L., Xi N., Wang Y., Dong Z., Xiao X., Zhang W. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci. China Life Sci.* 2012; 55 (11): 968-973. DOI: 10.1007/s11427-012-4399-3. PMID: 23160828
26. Yu M., Wang J., Wang H., Dong S. Calculation of the intracellular elastic modulus based on an atomic force microscope micro-cutting system. *Chin. Sci. Bull.* 2012; 57 (15): 1868-1872. DOI: 10.1007/s11434-012-5053-y
27. Kasas S., Wang X., Hirling H., Marsault R., Humi B., Yersin A., Regazzi R., Grenningloh G., Riederer B., Forró L., Dietler G., Catsicas S. Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 2005; 62 (2): 124-132. DOI: 10.1002/cm.20086. PMID: 16145686
28. Sen S., Subramanian S., Discher D.E. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with AFM: theoretical model and experiments. *Biophys. J.* 2005; 89 (5): 3203-3213. DOI: 10.1529/biophysj.105.063826. PMID: 16113121

Поступила 06.06.17

Received 06.06.17