

## НАУЧНЫЙ ПРАКТИКУМ ДЛЯ СТУДЕНТОВ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ «МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА»

А. М. Черныш<sup>1,2</sup>, Д. С. Белопахов<sup>2</sup>, А. А. Беляевская<sup>2</sup>, А. В. Закарян<sup>2</sup>,  
М. С. Куприянова<sup>2</sup>, М. А. Постников<sup>2</sup>, Е. В. Сергеенко<sup>2</sup>, И. М. Шогенов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского,  
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, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

### Scientific Practicum for Students of the Specialty «Medical Biophysics»

A. M. Chernysh<sup>1,2</sup>, D. S. Belopakhov<sup>2</sup>, A. A. Belyaevskaya<sup>2</sup>, A. V. Zakaryan<sup>2</sup>,  
M. S. Kupriyanova<sup>2</sup>, M. A. Postnikov<sup>2</sup>, E. V. Sergeenko<sup>2</sup>, I. M. Shogenov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russ

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
8, Trubetskaya Str., Build. 2, Moscow 119991, Russia

Статья посвящена специализированному научному практикуму, организованному на базе лаборатории «Биофизики мембран клеток при критических состояниях» НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского для студентов, обучающихся по специальности «Медицинская биофизика» в Первом МГМУ им. И. М. Сеченова. В ходе работы студентами был освоен ряд методик: атомная силовая микроскопия, калиброванная электропорация, спектрофотометрия. Студенты ознакомились с методологией научного эксперимента и математической обработкой полученных результатов.

**Ключевые слова:** научный практикум; методология научного эксперимента; атомная силовая микроскопия; калиброванная электропорация; спектрофотометрия

This article focuses on specialized scientific Practicum organized on April 14s 2016 by the Laboratory of biophysics of cells membranes in critical illness of V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology for students enrolled in the specialty «Medical Biophysics» at the I. M. Sechenov First Moscow State Medical University. During the study students had mastered a number of techniques: atomic force microscopy, calibrated electroporation, spectrophotometry. Students familiarized with the methodology of scientific experiment and mathematical treatment of the results.

**Key words:** scientific Practicum, methodology of scientific experiment; atomic force microscopy; calibrated electroporation; spectrophotometry

DOI:10.15360/1813-9779-2016-4-79-88

### Введение

В соответствии с постановлением Правительства РФ от 15 апреля 2014 г. №295 «Об утверждении государственной программы Российской Федерации «Развитие образования» на 2013—2020 годы» с изменениями и дополнениями от 27 февраля, 14 апреля 2016 г. в НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского (г. Москва)

### Introduction

According to the Russian Federation Government Decree on April 15, 2014, N. 295 «On approval of the Russian State Program of Development of Education for the 2013—2020 years» as amended on February 27, April 14, 2016, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology organized a specialized scientific

#### Адрес для корреспонденции:

Александр Черныш  
E-mail: amchernysh@mail.ru

#### Correspondence to:

Mr. Alexander Chernysh  
E-mail: amchernysh@mail.ru

на базе лаборатории «Биофизики мембран клеток при критических состояниях» был организован специализированный научный практикум для студентов 4 курса Первого МГМУ им И. М. Сеченова, обучающихся по специальности «Медицинская биофизика» — код специальности 30.05.02.

Практикум был проведен под руководством заведующего лабораторией, д. б. н., профессор А. М. Черныша на безвозмездной основе в соответствии с обращением проректора по учебной работе Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, Т. М. Литвиновой. Всестороннюю поддержку в постановке Практикума оказывал директор НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, член-корреспондент РАН, профессор В. В. Мороз.

Цель практикума — подготовка студентов к самостоятельному получению научных результатов, их объяснению, формулировке соответствующих выводов, оформлению материалов для научной публикации.

При создании Практикума авторы ставили следующие задачи:

- ознакомить студентов с современными методами биофизики: атомная силовая микроскопия, калиброванная электропорация, спектрофотометрия;
- научить студентов самостоятельно устанавливать необходимые настройки и работать на современной аппаратуре;
- научить студентов методологии научного эксперимента;
- научить студентов проводить математическую обработку научных результатов и правильно представлять результаты для публикаций.

### Материал и методы

При создании Практикума авторы ставили следующие задачи:

- ознакомить студентов с современными методами биофизики: атомная силовая микроскопия, калиброванная электропорация, спектрофотометрия;
- научить студентов самостоятельно устанавливать необходимые настройки и работать на современной аппаратуре;
- научить студентов методологии научного эксперимента;
- научить студентов проводить математическую обработку научных результатов и правильно представлять результаты для публикаций.

**Практикум включал следующие темы:**

1. Атомная силовая микроскопия, идея метода, устройство атомного силового микроскопа (АСМ), режимы его работы.
2. Методы получения и оценки наноструктуры мембран клеток крови на АСМ.
3. АСМ. Дефекты наноструктуры мембран эритроцитов при длительном хранении донорской эритроцитарной взвеси (ЭВ).

Практикум для студентов 4-го года обучения Семеновского Первого Московского Государственного Медицинского Университета. Студенты обучались по специальности «Медицинская биофизика» — код специальности 30.05.02. Практикум проводился бесплатно в соответствии с просьбой проф. Т. М. Литвиновой, заместителя ректора по академическим вопросам, И. М. Семеновского Первого Московского Государственного Медицинского Университета. Поддержка в формулировке Практикума была предоставлена профессором В. В. Морозом, членом-корреспондентом Российской Академии Наук, директором В. А. Неговского Научно-исследовательского института общей реаниматологии.

Вся исследовательская работа в рамках Практикума проводилась на базе Лаборатории биофизики клеток мембран при критических состояниях под руководством проф. биол. наук А. М. Черныша, главы Лаборатории.

Целью Практикума — обучение студентов самостоятельному получению научных результатов, их объяснению, формулировке соответствующих выводов, оформлению материалов для научной публикации.

### Materials and Methods

**The authors set the following goals when creating the Practicum:**

- To acquaint students with comprehensive methods of biophysics: atomic force microscopy, calibrated electroporation;
- To teach students to establish independently the necessary settings, and to employ sophisticated equipment in their research;
- To teach students the methodology of scientific experiment;
- To teach students to carry out mathematical processing of study results and to submit the results for publication.

**The Practicum included the following topics:**

1. Atomic force microscopy: the idea of the method, the modes of operation of the atomic force microscope (AFM).
2. Methods of preparing and evaluating nanostructure of blood cell membranes.
3. AFM: defects of nanostructure of erythrocyte membranes during prolonged storage of donor packed red blood cells (PRBC).
4. AFM: defects of nanostructure erythrocyte membranes under the action of toxins on the membrane of red blood cells (RBC) — Zn ions, hemin.
5. Calibrated electroporation method. Hidden damage of erythrocyte membranes under the influence of muscle relaxants (rocuronium Kabi).
6. Calibrated electroporation method. Hidden damage to erythrocyte membranes under the action of ultraviolet (UV) radiation on human blood.
7. Spectrophotometry. Kinetics of hemoglobin derivatives under the action of sodium nitrite on human blood.
8. Methods of mathematical processing of the results. Using special laboratory programs created on the basis of Nonlinear Fitting software, OriginPro9 (USA).

All the experiments were performed *in vitro*.

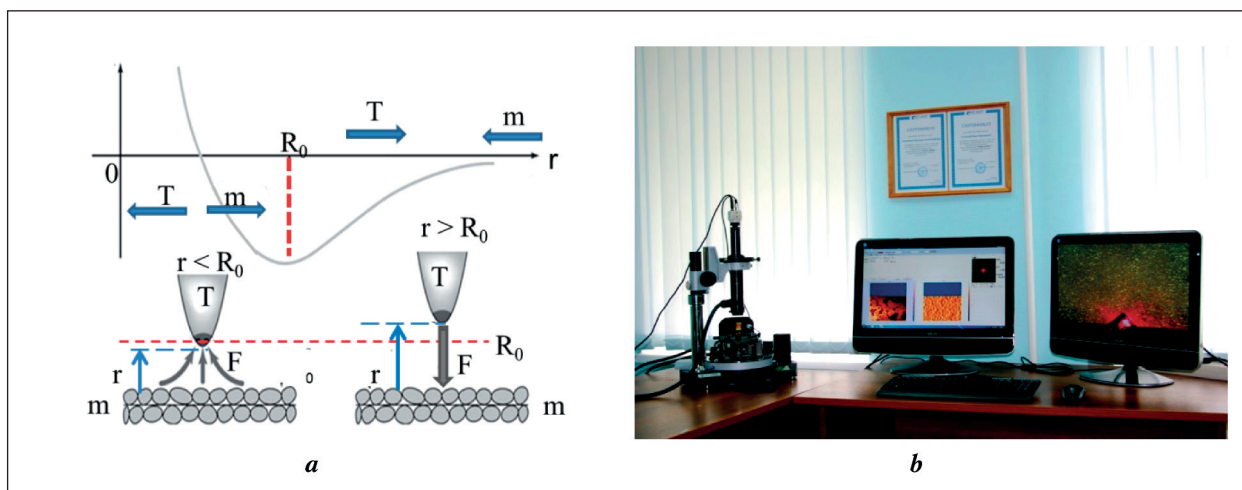


Рис. 1. Атомная силовая микроскопия: идея метода (а), рабочее место (б).  
Fig. 1. Atomic force microscopy: the idea of method (a), the workplace (b).

4. АСМ. Дефекты наноструктуры мембран эритроцитов при действии токсинов на мембраны эритроцитов: ионы Zn, гемин.

5. Метод калиброванной электропорации. Скрытые повреждения мембран эритроцитов при действии миорелаксантов (рукороний каби).

6. Метод калиброванной электропорации. Скрытые повреждения мембран эритроцитов при действии ультрафиолетового (УФ) излучения на кровь человека.

7. Спектрофотометрия. Кинетика производных гемоглобина при действии на кровь человека нитрита натрия.

8. Методы математической обработки результатов. Использование специализированных программ лаборатории, созданных на базе программного обеспечения Nonlinear Fitting, OriginPro9 (USA).

## Результаты и обсуждение

Первая тема «Атомная силовая микроскопия, идея метода, устройство атомного силового микроскопа (АСМ), режимы его работы» проводилась со всей группой одновременно. Перед работой обсуждались теоретические аспекты атомной силовой микроскопии: молекулярные взаимодействия между зондом и объектом исследования, потенциал Леннарда-Джонса, зависимости взаимодействий от расстояния между объектом и зондом (рис. 1).

По ходу работы студенты самостоятельно устанавливали кантилевер, получали дифракцию лазерного луча на нем, устанавливали положение лазерного луча на фотодиоде, проводили настройку программного обеспечения АСМ. Наиболее сложной операцией была настройка резонанса кантилевера и получение высокой добротности резонансной кривой при работе АСМ в полуконтактном режиме.

Вторая тема выполнялась индивидуально каждым студентом и была посвящена методам по-

## Results and Discussion

The first theme « Atomic force microscopy, the idea of the method, the modes of operation of the atomic force microscope » was carried out with the whole group at once. Before the work the theoretical aspects of AFM (molecular interaction between the probe and the object of study, Lennard-Jones interactions depending on the distance between the object and the probe) were discussed.

During the work students independently established the cantilever obtained diffraction of the laser beam on it, set the position of the laser beam on the photodiode, and used software to set the AFM. The most complicated operations including setting the cantilever resonance and obtaining high quality of the resonance curve at the AFM in a tapping mode.

The second theme was carried out individually by each student and was devoted to the methods of obtaining and evaluating the nanostructure of RBC membranes. Initially, it was necessary to form a monolayer of cells. It was performed by students with the aid of the V-Sampler device (Austria). Then, the smears of cell monolayer was placed onto the AFM working table, and the scale, speed and the number of scanning points were set. After imaging nanosurfaces of erythrocyte membranes and transferring the images to the program «FemtoScan» (Russia), the students quantified parameters of objects roughness by setting the markers. For this surface profiles constructed in any given direction.

In the course of the study, each student received an individual task to build their own image, determined profiled and estimated parameters of the erythrocyte membrane nanosurfaces [1].

The problem of evaluating the nanostructure defects in erythrocyte membrane during prolonged storage of PRBC was devoted to the work №3. Transfusion of blood components is considered as an

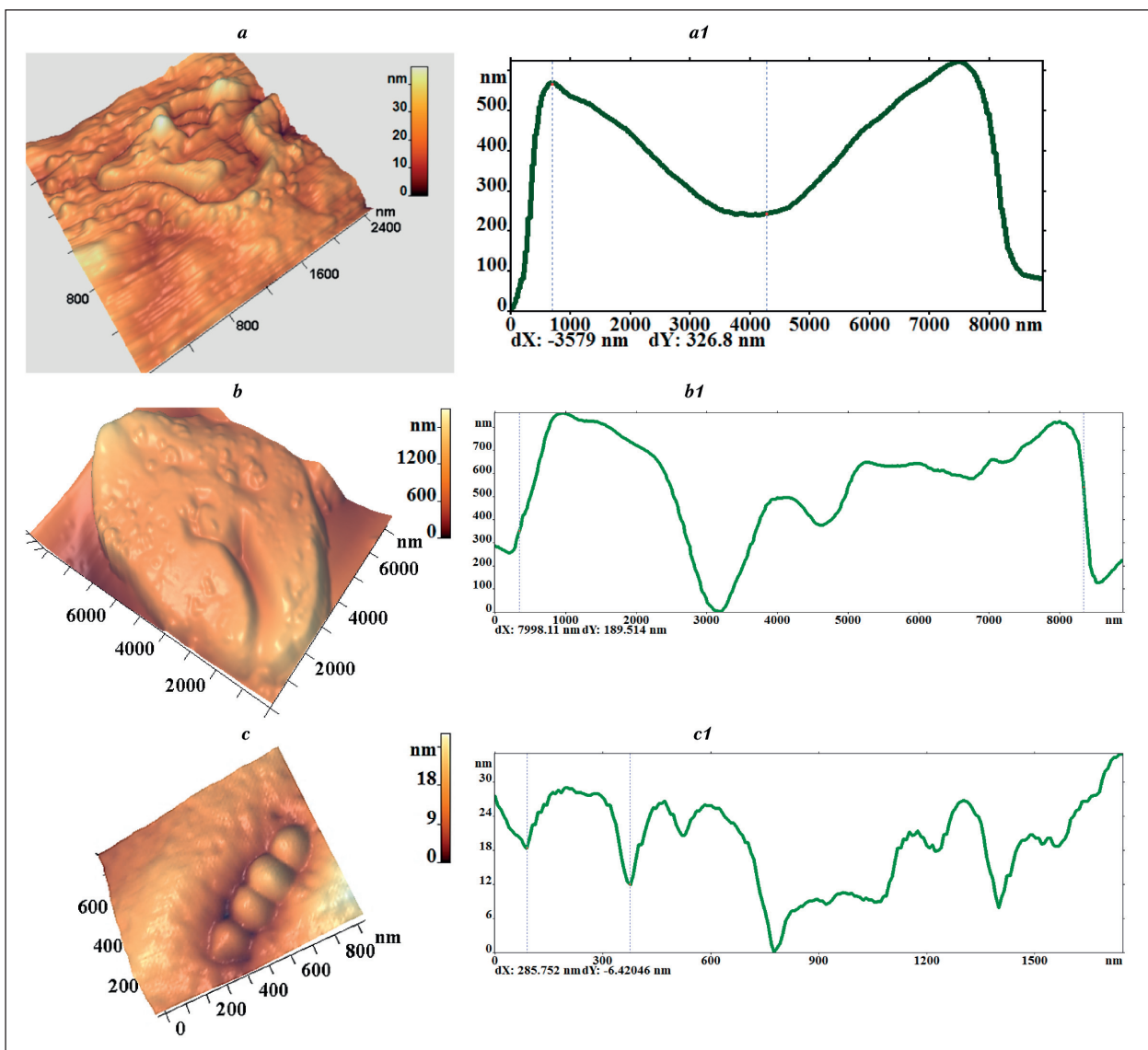


Рис. 2. Мембрана эритроцита в формате 3D и профиль поверхности.

Fig. 2. Details of red blood cells membrane in 3D-format and the profile of its surface.

Note. *a* – the details of red blood cells membrane; *b* – image of a single red blood cell after the action of Zn ions; *c* – the details of red blood cells membrane hemin effect after; *a1*, *b1*, *c1* – the profiles of the *a*, *b*, *c* surfaces of red blood cells.

Примечание. *a* – фрагмент мембраны эритроцита; *b* – мембрана отдельного эритроцита после воздействия ионов Zn; *c* – фрагмент мембраны эритроцита после воздействия гемина; *a1*, *b1*, *c1* – профили поверхностей *a*, *b*, *c*.

лучения и оценки наноструктуры мембран клеток крови. Вначале необходимо было сформировать монослой клеток. Для этого студенты использовали устройство V-Sampler (Austria). Затем монослой помещали на рабочий столик АСМ, устанавливали масштаб, скорость и количество точек сканирования. После получения изображений наноповрхности мембран эритроцитов и установки их в программу «Фемтоскан» (РФ) студенты с помощью постановки маркеров изучали и количественно оценивали параметры шероховатости объектов. Для этого строились профили поверхностей в любом заданном направлении (рис. 2).

По ходу выполнения работы каждый студент получал индивидуальное задание, строил

operation of body tissue transplantation and it could further be contributed to the development of life-threatening reactions. The quality of transfusion media is paramount in ensuring the effectiveness of transfusions and prevention of severe post-transfusion reactions [2].

Main parameters of quality of donor PRBC are the morphology of cells and the structure of erythrocyte membranes [3, 4].

The purpose of this work: to study the alterations of RBC morphology and their membrane structure by AFM during long-term storage of PRBC.

This work was carried out on the human PRBC obtained from the Blood Transfusion Center, Moscow Health Department. PRBC portions (400



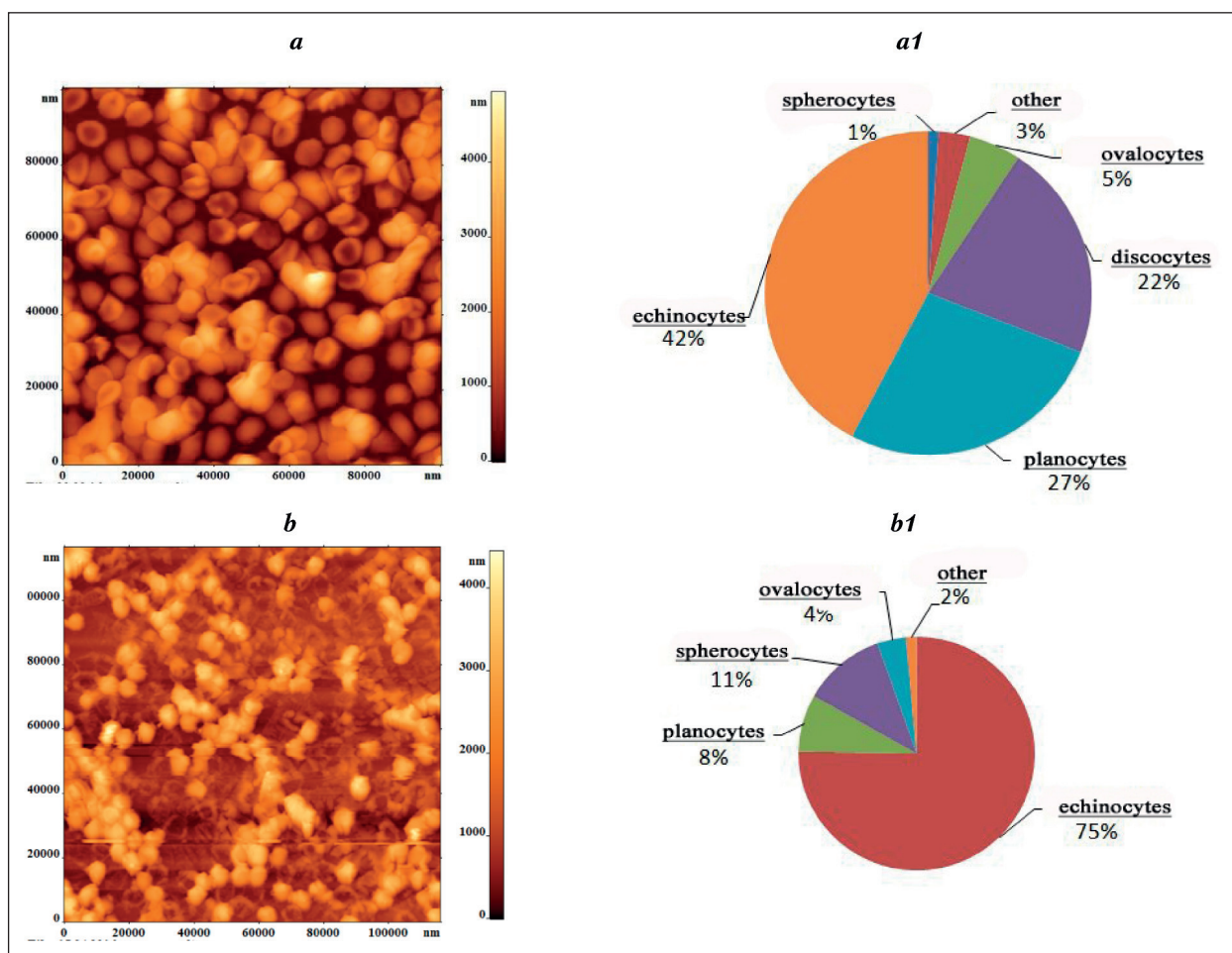


Рис. 3. Морфологический состав эритроцитов, полученных методом оседания, на разных сроках хранения эритроцитарной взвеси.

Fig. 3. Morphological composition of red blood cells obtained by settling during a storage.

Note. *a* – on the 2<sup>nd</sup> day of storage; *b* – on the 19<sup>th</sup> day of storage; morphological composition for *a*, *b*.

Примечание. *a* – на 2-е сутки хранения эритроцитарной взвеси; *b* – на 19-е сутки хранения эритроцитарной взвеси; *a1*, *b1* – морфологические составы *a*, *b*. ovalocytes – овалциты; spherocytes – сфероциты; planocytes – планоциты; echinocytes – эхиноциты; other – другие.

собственное изображение, его профиль и оценивал параметры наноповушности мембраны эритроцита [1].

Проблеме оценки дефектов наноструктуры мембран эритроцитов при длительном хранении донорской эритроцитарной взвеси (ЭВ) была посвящена работа №3. Переливание компонентов крови рассматривается как операция трансплантации ткани организма с возможным последующим развитием жизненно опасных реакций. Качество трансфузионных сред является первостепенным в обеспечении эффективности трансфузий и профилактики тяжелых посттрансфузионных реакций [2]. Одними из главных показателей качества донорской эритроцитарной взвеси является морфология и структура мембран эритроцитов [3, 4].

Цель работы – исследовать с помощью атомной силовой микроскопии нарушения морфологии эритроцитов и структуры их мембран в процессе длительного хранения ЭВ.

ml each) were in a sterile sealed blood bag with a standard preservative solution.

Bags were stored at 4°C for 30 days, in accordance with WHO Recommendations. During the storage the morphology and nanostructure of erythrocyte membranes were evaluated as described previously [5].

During the period of storage of PRBC their morphology was transformed and their membranes were destructed [6].

Students compared nanostructure and morphology of erythrocytes at 2, 8, 15 and 19 hours of storage of PRBC. Then they carried out the analysis of morphological changes at different periods of storage [7–9].

Defects of erythrocyte membranes nanostructure following the action of toxins on RBC (Zn ions and hemin) were further investigated in the Study №4. One of the studied toxins was represented by heavy metal ions, the zinc ions. ZnSO<sub>4</sub> solution was

Эта работа проводилась на ЭВ человека, полученной в центре переливания крови департамента здравоохранения г. Москвы. Контейнер ЭВ с гемоконсервантом CPD хранили при 4°C в течение 30 суток, в соответствии с рекомендациями ВОЗ. В период всего хранения регистрировали морфологию и наноструктуру мембран эритроцитов [5].

На протяжении периода хранения эритроцитарной взвеси происходила трансформация морфологии эритроцитов, деструкция их мембран [6].

В этой работе студенты сравнивали морфологию и наноструктуру эритроцитов на 2-е, 8-е, 15-е и 19-е сутки хранения ЭВ. Затем проводился сквозной анализ изменений морфологии в различные сроки хранения (рис. 3) [7–9].

Дефекты наноструктуры мембран эритроцитов при действии токсинов на мембраны эритроцитов — ионы Zn, гемин изучались в работе №4. Одним из изучаемых токсинов являлись ионы тяжелых металлов. В нашей работе, в качестве примера, использовали ионы цинка. В раствор эритроцитов добавляли ZnSO<sub>4</sub> в концентрациях: 0 — контроль; 0,1 ; 0,2; 0,5; мМ. Смесь выдерживали в течение часа при температуре 20°C, после чего формировали монослой клеток.

В качестве зондов использовали стандартные кантилеверы fp N10 с углом при вершине ≤22° и радиусом ~10 нм. Сила при сканировании в диапазоне 0,1–5 нН. Число точек сканирования — 512, поля сканирования: 10×10 мкм, 1500×1500 нм, 800×800 нм и до 150×150 нм.

Студенты вводили различные концентрации ионов цинка и получали широкий спектр повреждений наноструктуры мембран эритроцитов (рис. 2, *b*, *b1*). Каждый студент проводил оценку повреждений индивидуально, по полученному им результату.

Другим изучаемым токсином был солянокислый гематин — гемин. Гемин может образовываться в организме человека при попадании гемоглобина в кровеносное русло и дальнейшем его окисления, например, в области желудка. Для приготовления рабочего раствора использовали сухой гемин (Sigma, USA). 50 мг сухого гемина растворяли в 1 мл раствора NaOH и добавляли 5 мл дистиллированной воды. Конечная концентрация гемина в крови составляла в опытах 1,8 мМ.

На поверхности мембран образовывались домены разной величины — большие и малые (рис. 2, *c*, *c1*). Отличительная особенность дефектов при действии гемина состояла в том, что все домены образованы зернами одинаковой величины. Это дает возможность изучать механизмы образования таких доменов в клетке крови. [10]

В следующей работе был использован метод калиброванной электропорации. [9, 11, 12]. Этот метод позволяет определять скрытые, еще не проявляющиеся на физиологическом уровне повреждения мембран клеток. Исследуемая кровь (3 мл)

not added to RBC suspension (control) or added at concentrations 0.1 mM; 0.2 mM or 0.5 mM. The mixture was incubated for 1 hour at 20°C to form a monolayer of the cells.

As probes, the standard cantilevers fp N10 with an apex at an angle ≤22° and a radius of about 10 nm were used. The number of scan points: 512, field scanning: 10×10 μm, 1500×1500 nm, 800×800 nm and up to 150×150 nm.

Students employed various concentrations of zinc ions to obtain a wide range of damage of nanostructure of erythrocyte membranes. Each student carried out an assessment of damages individually, according to specificity of findings.

Hematin hydrochloride — hemin represented another example of toxic agent the effect of which was studied. Hemin is formed in a human body when hemoglobin enters the bloodstream and is undergone oxidation, for example, in the stomach. To prepare the working solution the chemically pure hemin (Sigma, USA) was used. 50 mg of dry hemin was dissolved in solution containing 1 ml of NaOH solution and 5 ml of distilled water. The final concentration of hemin in the blood in the in vitro experiments was 1.8 mM.

The domains of different size (large and small one) were revealed on the membrane surface. A distinctive feature of the defects under the action of hemin was that all the domains were formed by grains of the same size. This makes it possible to study the mechanisms of formation of these domains in an individual blood cell [10].

In the next study the method of calibrated electroporation was used [9, 11, 12]. This method allows to determine the hidden damage of cell membranes, when the damage is not yet manifested at a physiological level. The studied blood (3 ml) was placed in a quartz cuvette and was subjected to the effect of a high-energy pulsed electric field. As a result of the exposure, the electrical breakdown of erythrocyte membranes arose. Then, the students developed the kinetic curves that determined the quality of the membrane. For these curves the rate constant was estimated for each patient's membranes. When the membrane of RBC in the patient's blood was normal, the rate constant was in a certain range. If the cells (membrane) were damaged, the constant rate was above the normal range. Thus, the value of the rate constant evaluated the extent of damage of the membrane nanostructure. Students evaluated the effect of muscle relaxant Rocuronium bromide (Fresenius Kabi, USA) on erythrocyte membrane. In this experiment, the erythrocyte suspension was administered in 1.0, 0.5, and 0.25 μl of drug per 1 mL of solution. The obtained kinetic curves are shown in Fig. 4.

A separate fragment of the work included the evaluation of action of UV radiation on human blood. Students irradiated blood suspension by ultraviolet

помещалась в кварцевую кювету и подвергалась действию высокоэнергетического импульсного электрического поля. В результате воздействия возникал электрический пробой мембран эритроцитов. Затем студенты строили кинетические кривые, которые определяли качество мембран. По этим зависимостям оценивалась константа скорости для мембран исследуемого пациента. Если мембраны эритроцитов крови пациента в норме, то константа скорости лежит в определенном диапазоне. Если клетки (мембраны) повреждены, то константа скорости выше нормального диапазона. По величине константы оценивается степень повреждения наноструктуры мембран. Студенты оценивали действие миорелаксанта Рукорония Каби на мембраны эритроцитов. Для этого в суспензию эритроцитов вводили 1,0, 0,5 и 0,25 мкл препарата на 1 мл раствора. Полученные кинетические кривые представлены на рис. 4.

Отдельный фрагмент работы — действие УФ излучения на кровь человека. Студенты облучали суспензию крови ультрафиолетовым излучением с длиной волны 340 нм (дальний УФ) в течение 2 и 5 минут. В результате получали кинетические кривые для каждой дозы УФ. Данный метод может применяться: для диагностики эффективности лечения заболеваний крови (сравнивается константы до и после лечения), для оценки степени повреждений крови при облучениях всеми видами ионизирующих излучений (рентген, гамма, пучки протонов, электронов, тяжелых частиц), действия фармакологических препаратов на мембраны клеток крови, для оценки действия факторов окружающей среды на мембраны клеток крови (на загрязненных производствах, в шахтах, в цементном и целлюлозном производствах), для оценки любых физико-химических воздействий на кровь человека.

Интересные научные результаты были получены в работе «Кинетика производных гемоглобина при действии на кровь человека нитрита натрия». Работа проводилась на современном спектрофотометре с автоматическим управлением компьютером Unico 2800 (USA). Диапазон длин волн 190–1100 нм через 0,5 нм.

Спектрофотометрия — физико-химический метод исследования растворов, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях. Исследуется зависимость оптической плотности от длины волны. Данный метод основан на законе Бугера — Ламберта — Бера — ослаблении пучка монохроматического света при распространении в светопоглощающей среде. Предварительно студенты исследовали спектры поглощения стекла и кварца. Стекло имело большое поглощение в УФ области (короче 300 нм). Поэтому при исследовании

radiation at a wavelength of 340 nm (deep UV) for 2 to 5 minutes. The kinetic curves were obtained for each dose of UV. This method can be employed for evaluating the effectiveness of treatment of blood disorders (when compared constants before and after treatment), to assess the degree of blood damage during irradiation by various types of ionizing radiation (X-ray, gamma, beams of protons, electrons, heavy particles), to determine the effect of pharmacological agents on blood cell membrane, for the action of factors of the environment assessment of cell membranes of blood cells (the contaminated factories, mines, cement and pulp production), to assess any physical-chemical impacts on human blood.

Interesting scientific results were obtained during the study course « Kinetics of hemoglobin derivatives under the in vitro action of sodium nitrite on human blood ». The work was performed with the aid of a spectrophotometer linked to computer automatic Unico 2800 program (USA). The wavelengths were within ranges of 190–1100 nm at a step of 0.5 nm.

Spectrophotometry belongs to physico-chemical methods of research based on the study of the absorption spectra in the ultraviolet (200–400 nm), visible (400–760 nm) and infrared (>760 nm) regions. Students study the dependence of optical density on the wavelength. This method is based on the law of Bouguer — Lambert — Beer — the weakening of the beam of monochromatic light propagating in the light-absorbing medium. Previously students have investigated the absorption spectra of quartz and glass. Glass has a larger absorption value within the UV region (shorter than 300 nm). Therefore, for studies of spectra of biological substances it is necessary to use only quartz cuvettes.

Students studied the content of components of hemoglobin (oxy-, deoxy — and methemoglobin) after the action of sodium nitrite. The first part of the experiments included 3 different concentrations of  $\text{NaNO}_2$ , added to the erythrocytes suspension. Evaluated spectra depend on the concentrations of hemoglobin derivatives. The second stage — 2  $\mu\text{l}$   $\text{NaNO}_2$  was introduced into 2.4 ml hemoglobin solution. Time-dependent kinetics of changes in concentrations of hemoglobin derivatives was recorded. This relationship is shown in Fig. 5.

Within 6 minutes concentrations of oxyhemoglobin and methemoglobin were equal, and after 10 minutes the concentration of methemoglobin reached 90%. This method can be used to diagnose methemoglobinemia, detect poisoning by nitrates, and installations of biologically based standards for JDC and MAC values of nitrates in various food products.

When performing the scientific Practicum the students have fulfilled all the objectives, mastered methods of atomic force microscopy, calibrated electroporation [14] and spectrophotometry. The results



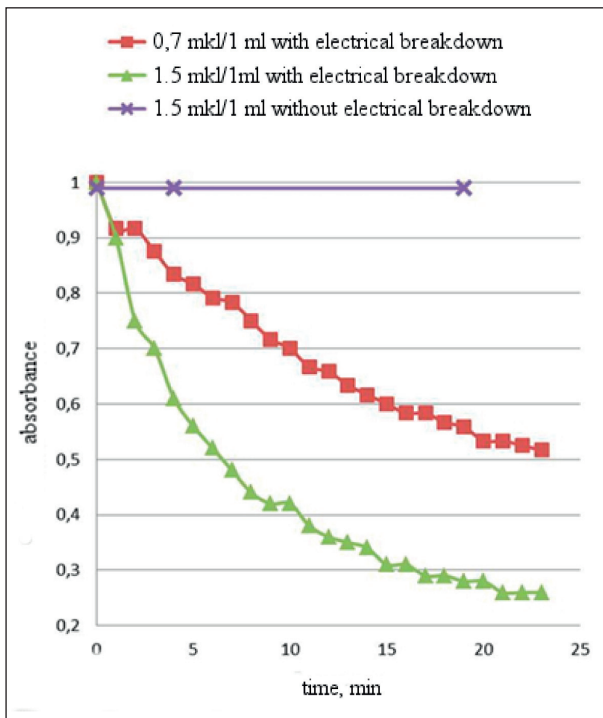


Рис. 4. Кинетические кривые при действии рукорония каби на мембраны эритроцитов.

Fig. 4. Kinetic curves under the action of rocuronium bromide on erythrocyte membrane.

Примечание. mkl – мкл; l – л; with electrical breakdown – с электропорацией; without – без. Здесь и для рис. 5: time, min – время, мин.

ях спектров биологических веществ необходимо использовать только кварцевые кюветы.

Исследовалось содержание компонент гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина) при действии нитрита натрия. В первой части работы в раствор эритроцитов вводили 3 разные концентрации  $\text{NaNO}_2$ . Получали концентрационные зависимости спектров компонент гемоглобина. На втором этапе вводили 20 мМ  $\text{NaNO}_2$  в 2,4 мл раствора гемоглобина. Регистрировали кинетику концентраций производных гемоглобина во времени. Эта зависимость представлена на рис. 5.

В течение 6 минут концентрации окси- и метгемоглобина стали равными, а через 10 минут концентрация метгемоглобина достигла 90%. Данный метод может применяться для диагностики метгемоглобинемии, выявления отравления нитратами, для установки биологически обоснованных норм ОДК и ПДК по содержанию нитратов в различных продуктах питания.

После выполнения рассмотренных работ студенты учились проводить математическую обработку полученных результатов с использованием специального программного обеспечения.

При выполнении работ Практикума студентами были решены все поставленные задачи, освоены методы атомной силовой микроскопии, калибро-

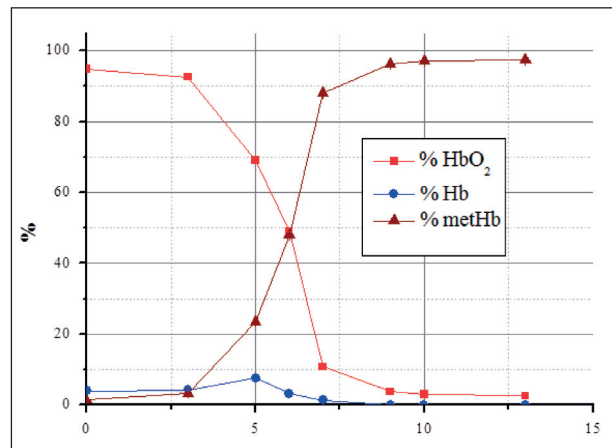


Рис. 5. Кинетика изменения концентраций производных гемоглобина во времени после воздействия  $\text{NaNO}_2$ .

Fig. 5. Kinetics of change of concentrations of hemoglobin derivatives after exposure of erythrocyte solution by  $\text{NaNO}_2$ .



Рис. 6. Профессор А. М. Черныш проводит заключительное занятие Практикума.

Fig. 6. Professor A. M. Chernysh holds final session of the Practicum.

obtained in four works were produced by mathematical processing using specialized software of the lab.

Data obtained during the Practicum by AFM confirmed the presence of defects in nanostructures of red blood cells membranes during prolonged storage of donor PRBC, as well as the action of toxins on erythrocyte membrane. The results of applying of the calibrated electroporation, as seen from the kinetic curves (Fig. 7), showed the effectiveness of the method for detecting the hidden damages of erythrocytes membranes after action of muscle relaxant or ultraviolet radiation. Kinetics of hemoglobin derivatives concentrations, obtained by spectrophotometry, showed the increase of methemoglobin under the influence of nitrate.

At the final lesson the results obtained by each student were discussed and the comparative analysis of these results was carried out.



ванной электропорации [14] и спектрофотометрии. Были получены научные результаты проведенных работ, произведена их математическая обработка с использованием специализированных программ лаборатории.

Данные, полученные в ходе практикума методом атомно-силовой микроскопии, подтвердили наличие дефектов наноструктуры мембран эритроцитов при длительном хранении донорской эритроцитарной взвеси, а также при действии токсинов на мембраны эритроцитов. Результаты применения калиброванной электропорации, как видно из кинетических кривых (рис. 4), свидетельствовали об эффективности метода обнаружения скрытых повреждений мембран эритроцитов после действия миорелаксанта и ультрафиолетового излучения. Кинетика концентраций производных гемоглобина, полученная методом спектрофотометрии, демонстрировала нарастание метгемоглобинемии при действии нитратов.

На заключительном занятии были обсуждены результаты, полученные каждым студентом, и проведен сравнительный анализ этих результатов. При обсуждении студенты отметили, что освоенные в ходе практикума методы и получаемые с их помощью данные имеют широкие перспективы в медицинской диагностике.

В организации и проведении Практикума активное участие принимали ведущий научный сотрудник НИИ ОР, доктор физико-математических наук, профессор Е. К. Козлова и старший научный сотрудник НИИ ОР кандидат биологических наук В. А. Сергунова.

### Заключение

Проведенный Практикум отличался от традиционных методов обучения тем, что основной целью ставил получение научных результатов студентами. В данной статье приведены лишь примеры отдельных результатов выполненных работ. Каждая работа требовала выполнения ряда взаимозависимых последовательных операций и получения целого комплекса конечных оценочных величин. Например, концентрационные и временные зависимости зарождения локальных нанодефектов мембран, временные и дозовые зависимости образования метгемоглобина при облучении крови УФ, получение семейства кинетических кривых при действии на кровь миорелаксантов и ионов тяжелых металлов. При этом в каждой работе задавались персональные начальные условия эксперимента. Поэтому каждый студент выполнял задание самостоятельно и получал личный результат.

Professor E. K. Kozlova, PhD/DSci (Physics & Mathematics), Leading Scientist, and V. A. Sergunova, PhD, Senior Scientist, actively contributed to the organization and conducting the Practicum.

### Conclusion

Described Student's Practicum differed from the traditional methods of teaching because its main aim was to gain research experience through the obtaining scientific results. This paper contains examples of various results of the performed course. Each work required performing the number of interdependent sequential operations and obtaining a whole complex of final evaluated variables. As examples, the concentration and time dependences of origin of the local membranes nanoscale defects, time and dose dependences of methemoglobin formation during UV irradiation of blood, a family of kinetic curves under the action of muscle relaxants and heavy metal ions on blood were determined during the course of education. Moreover, for each study individual initial experimental conditions were thoroughly set up. Therefore, each student performed the task by himself, independently, and gained personal experience to obtain the specific results.

On May 11, 2016 the Scientific Student Conference at the Department of Medical and Biological Physics of Sechenov First Moscow State Medical University was held, where all students presented the results of their works.

Students noted that techniques acquired during Practicum and data obtained by employed methods exhibited broad perspectives for medical diagnostics. The conference was attended by representatives of the University administration and students of biophysics, biochemistry, bioengineering, biotechnology specialties and other related fields. The conference was very successful.

11 мая 2016 года на кафедре медицинской и биологической физики Первого МГМУ им. И. М. Сеченова прошла Научная студенческая конференция, на которой все студенты МБФ-4 выступили с докладами, посвященными результатам своей работы. Студенты отметили, что освоенные в ходе практикума методы и получаемые с их помощью данные имеют широкие перспективы в медицинской диагностике. На конференции присутствовали представители руководства университета и студенты специальностей биофизика, биохимия, биоинженерия, биотехнология и других смежных специальностей. Конференция прошла с большим успехом.

## Литература

1. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>. PMID: 22854216
2. Костин А.И., Майорова О.А., Ложкин А.В., Почтарь М.Е., Демичева М.И., Кузмичев В.А., Луговская С.А., Наумова Е.В., Кисиличина Д.Г., Андрейцева Э.В., Долгов В.В. К вопросу о контроле качества эритроцитсодержащих компонентов крови, обедненных лейкоцитами. *Трансфузиология*. 2011; 12 (2): 12-33.
3. Berezina T.L., Zaets S.B., Morgan C., Spillert C.R., Kamiyama M., Spolarics Z., Deitch E.A., Machiedo G.W. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6-12. <http://dx.doi.org/10.1006/jsre.2001.6306>. PMID: 11792145
4. Hess J.R., Sparrow R.L., van der Meer P.F., Acker J.P., Cardigan R.A., Devine D.V. Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion*. 2009; 49 (12): 599-603. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02275.x>. PMID: 20163690
5. Мороз В.В., Голубев А.М., Черныш А.М., Козлова Е.К., Васильев В.Ю., Гудкова О.Е., Сергунова В.А., Фёдорова М.С. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 5-13. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-1-5>
6. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Хорошилов С.Е., Онуфриевич А.Д., Костин А.И. Нарушения морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов при длительном хранении эритроцитарной взвеси (исследование при помощи атомной силовой микроскопии). *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2015; 159 (3): 390-394. <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-015-2975-9>. PMID: 26212816
7. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp. Cell Res.* 2015; 337 (2): 192–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07.009>. PMID: 26169694
8. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.E. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.02.007>. PMID: 20381299
9. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Fedorova M., Kuzovlev A. Opposite effects of electroporation of red blood cell membranes under the influence of zinc ions. *Acta Bioeng. Biomech.* 2012; 14 (1): 3–13. PMID: 22741531
10. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. <http://dx.doi.org/10.1038/srep06033>. PMID: 25112597
11. Черныш А.М., Козлова Е.К., Мороз В.В. Способ выявления повреждения мембран эритроцитов. Патент РФ на изобретение № 2487356.
12. Козлова Е.К., Черняев А.П., Алексеева П.Ю., Близиук У.А., Черныш А.М., Назарова М.А. Диагностика состояния биологических мембран после воздействия  $\gamma$ -излучения в малых дозах. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2005; 45 (6): 653–656. PMID: 16454330
13. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavialova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1-2): 88-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.035>. PMID: 26626224
14. Гудкова О.Е., Козлов А.П. Неоднородность распределения электрических трансмембранных потенциалов при дефибриляции сердца. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (6): 38-47. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-6>
15. Сергунова В.А., Козлова Е.К., Мягкова Е.А., Черныш А.М. Измерение упруго-эластичных свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (3): 39-44. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-39-44>
16. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Алексеева С.В. Особенности мембран эритроцитов недоношенных новорожденных при многоплодной беременности. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (1): 12-24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-12-24>

Поступила 01.02.16

## References

1. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>. PMID: 22854216
2. Kostin A.I., Maiorova O.A., Lozhkin A.V., Pochtar M.E., Demicheva M.I., Kuzmichev V.A., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., Kisilichina D.G., Andreitseva E.V., Dolgov V.V. K voprosu o kontrole kachestva eritrotsitsoedershashchikh komponentov krovi, obednennykh leukotsitami. [Anent the quality control of leukodepleted blood components containing RBC]. *Transfuziologiya*. 2011; 12 (2): 12-33. [In Russ.]
3. Berezina T.L., Zaets S.B., Morgan C., Spillert C.R., Kamiyama M., Spolarics Z., Deitch E.A., Machiedo G.W. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6-12. <http://dx.doi.org/10.1006/jsre.2001.6306>. PMID: 11792145
4. Hess J.R., Sparrow R.L., van der Meer P.F., Acker J.P., Cardigan R.A., Devine D.V. Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion*. 2009; 49 (12): 599-603. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02275.x>. PMID: 20163690
5. Moroz V.V., Golubev A.M., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Vasilyev V.Yu., Gudkova O.E., Sergunova V.A., Fedorova M.S. Izmeneniya struktury poverkhnosti membran eritrotsitov pri dlitelnom khraneniі donorskoi krovi. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Structural changes in the surface of red blood cell membranes during long-term donor blood storage. *General Reanimatology*]. 2012; 8 (1): 5-13. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-1-5>. [In Russ.]
6. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Khoroshilov S.E., Onufrievich A.D., Kostin A.I. Narusheniya morfologii i nanostrukturny membran eritrotsitov pri dlitelnom khraneniі eritrotsitarnoi vzvesi (issledovanie pri pomoshchi atomnoi silovoi mikroskopii). [Disorders in the morphology and nanostructure of erythrocyte membranes after long-term storage of erythrocyte suspension: atomic force microscopy study]. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny*. 2015; 159 (3): 390-394. <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-015-2975-9>. PMID: 26212816. [In Russ.]
7. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp. Cell Res.* 2015; 337 (2): 192–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07.009>. PMID: 26169694
8. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.E. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.02.007>. PMID: 20381299
9. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Fedorova M., Kuzovlev A. Opposite effects of electroporation of red blood cell membranes under the influence of zinc ions. *Acta Bioeng. Biomech.* 2012; 14 (1): 3–13. PMID: 22741531
10. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. <http://dx.doi.org/10.1038/srep06033>. PMID: 25112597
11. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V. Sposob vyyavleniya povrezhdeniya membran eritrotsitov. Patent RF na izobreteniye № 2487356. [Method of detection of red blood cells membrane damage. RF patent for invention № 2487356]. [In Russ.]
12. Kozlova E.K., Chernysh A.P., Alekseyeva P.Yu., Bliznjuk U.A., Chernysh A.M., Nazarova M.A. Diagnostika sostoyaniya biologicheskikh membran posle vozdeystviya  $\gamma$ -izlucheniya v malyykh dozakh. [The diagnostic of membranes' state after exposure of gammaradiation of small doses]. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioecologiya*. 2005; 45 (6): 653–656. PMID: 16454330. [In Russ.]
13. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavialova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1-2): 88-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.035>. PMID: 26626224
14. Gudkova O.E., Kozlov A.P. Neodnorodnost raspredeleniya elektricheskikh transmembrannykh potentsialov pri defibrillyatsii serdtsa. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Non-uniformity of the distribution of electrical transmembrane potentials in cardiac defibrillation. *General Reanimatology*]. 2015; 11 (6): 38-47. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-6>. [In Russ.]
15. Sergunova V.A., Kozlova E.K., Myagkova E.A., Chernysh A.M. Izmerenie uprugoe-elastichnykh svoystv membran nativnykh eritrotsitov *in vitro*. *Obshchaya Reanimatologiya*. [In vitro measurement of the elastic properties of the native red blood cell membrane. *General Reanimatology*]. 2015; 11 (3): 39-44. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-39-44>. [In Russ.]
16. Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V. Osobennosti membran eritrotsitov nedonoshennykh novorozhdennykh pri mnogoplodnoi beremennosti. *Obshchaya Reanimatologiya*. [The specific features of red blood cell membranes in premature neonates due to multiple pregnancy. *General Reanimatology*]. 2014; 10 (1): 12-24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-12-24>. [In Russ.]

Submitted 01.02.16