

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ
НА СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАНЫ
ЭРИТРОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ
МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

**Г. Б. Мельникова¹, Н. С. Кужель¹, Т. Н. Толстая¹, О. Н. Шишко²,
Е. Э. Константинова¹, С. А. Чижик¹**

¹ *Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

² *Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

Аннотация. Методом атомно-силовой микроскопии проведен анализ изменений морфологических и локальных механических свойств мембран эритроцитов и тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом и сахарным диабетом 2-го типа после инкубирования клеток крови в диапазоне температур 42–47 °С с интервалом 2 °С длительностью 40 и 60 мин.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия; эритроциты; тромбоциты; модуль упругости; сила адгезии; инкубирование при высоких температурах.

Введение. В литературе известно большое количество работ, в которых представлены результаты исследований влияния температурного фактора ($t > 50$ °С) на структуру и форму мембран эритроцитов практически здоровых людей. Показано, что в результате инкубирования при высоких температурах нарушается деформируемость [1], способность к обратимой агрегации и осмотическая резистентность эритроцитов. Это обусловлено денатурацией мембранных белков [2], а также гемолизом [3]. Исследователями [4] проанализирована термочувствительность эритроцитов различного «возраста». Менее всего устойчивы к воздействию температурного фактора клетки «среднего возраста» (время жизни в системе гемодинамики 2 месяца). Нарушение свойств мембран клеток обусловлено различными патологическими состояниями, однако установить изменения мембранных характеристик обычными широко используемыми методами не всегда представляется возможным. Таким образом, анализ свойств мембран клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов) при воздействии различных температур и длительности инкубирования, а также установление характерных для таких воздействий изменений представляется интересным. Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) – один из перспективных методов исследования механических свойств мембран биологических клеток на наноуровне. Использование данного метода позволяет на ранних стадиях нарушений функционального состояния клеток, в частности, эритроцитов и тромбоцитов оценить изменения структуры и упругих характеристик их мембран. Цель работы – с использованием метода АСМ изучить изменения механических свойств мембран эритроцитов и тромбоцитов после инкубирования клеток при температурах от 42 до 47 °С в течение 40 и 60 мин.

Материалы и методы. В работе использованы клетки крови пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) и сахарным диабетом 2-го типа (СД2). Средний возраст пациентов с ОКС составил $61,9 \pm 4,9$, СД2 – $55,6 \pm 5,2$ года.

Эритроциты для исследований выделяли из стабилизированной K_3 ЭДТА венозной крови пациентов, фиксировали 0,5%-ным раствором глутарового альдегида и наносили на подложки из слюды. Для выделения тромбоцитов венозную кровь стабилизировали 3,8%-ным раствором цитрата натрия. Методика выделения и фиксации тромбоцитов описана в работе [5].

После приготовления контрольных образцов кровь инкубировали при температуре 42–47 °С с интервалом 2 °С в течение 40 и 60 мин. После окончания каждого из периодов инкубирования выделяли эритроциты и тромбоциты, фиксировали 0,5 %-ным раствором глутарового альдегида и высушивали в течение 2 ч на подложках из слюды в условиях комнатной температуры.

Изменение упругих характеристик клеточных мембран оценивали путем измерения модуля упругости по модели Герца на атомно-силовом микроскопе NT-206 с использованием стандартных кремниевых зондов NSC 11, жесткость – 3 Н/м («MikroMash»). Силу адгезии рассчитывали на основании измеренных значений отрыва острия зонда от поверхности образца по модели Джонсона-Кенделла-Робертса.

Результаты и их обсуждение. Изучение зависимости необратимых изменений спектров флуоресценции клеточных мембран от температуры позволило авторам [6] установить два структурных перехода: первый – при температурах от 42 до 50 °С ($t_{1/2} = 46 \pm 1$ °С), второй – выше 52 °С. Аналогичные изменения получены нами по результатам АСМ-исследований. В результате изучения морфологии мембран эритроцитов и тромбоцитов при температуре ниже 45 °С изменений морфологических и механических свойств мембран тромбоцитов и эритроцитов не установлено.

При увеличении температуры инкубирования до 47 °С и длительности 40 мин в структуре мембран эритроцитов происходят изменения. Для эритроцитов характерно изменение формы. В исходных образцах клеток как правило встречаются дискоциты, после инкубирования при 47 °С в течение 60 мин происходит изменение формы клеток, появляются эхиноциты (рис. 1).

Такие клетки имеют форму шара с многочисленными выростами и визуализируются во всех исследуемых образцах после инкубирования крови при 47 °С в течение 60 мин.

Авторами работы [6] показано, что причиной образования эхиноцитов, помимо снижения воспроизводства молекул АТФ в клетке при старении эритроцита, является усиленное образование вещества лизолецитина в плазме крови человека, и повышенное содержание в ней жирных кислот. Указанные факторы изменяют соотношение поверхности внутреннего и внешнего слоев мембраны эритроцита за счет увеличения поверхности ее внешнего слоя, что и ведет к появлению выростов и трансформации клетки в эхиноцит.

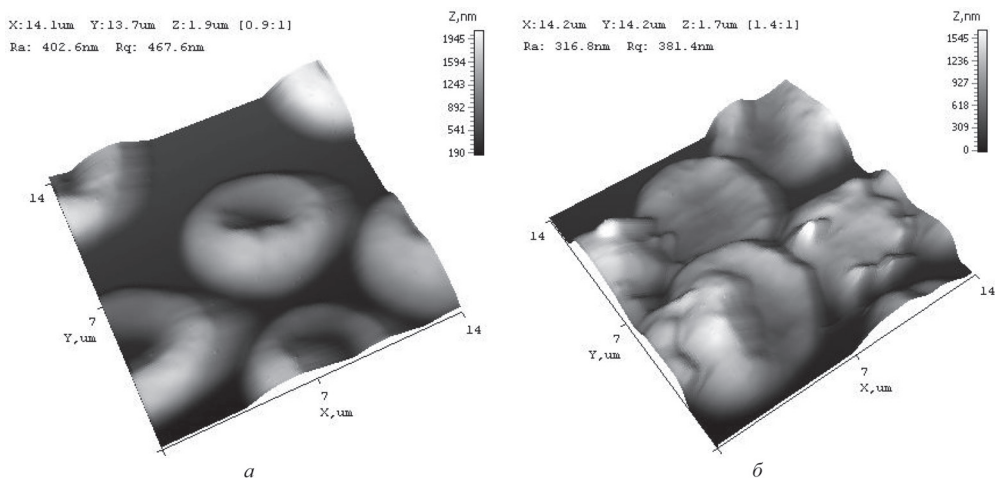


Рис. 1. АСМ-структура эритроцитов: *а* – до инкубирования; *б* – после инкубирования при 47 °С в течение 60 мин

Для тромбоцитов в результате инкубирования при 47 °С в течение 60 мин характерны изменения структуры мембран (рис. 2). Так, если до инкубирования для тромбоцитов характерна пористая поверхность, то после инкубирования поры закрываются и для поверхности характерна складчатая структура. При этом форма клетки и ее размеры остаются без изменений.

Наряду с отсутствием морфологических изменений не установлено различий механических свойств мембран клеток крови после их инкубирования при температуре 47 °С в течение 40 мин в группах пациентов с ОКС и СД2. После 60 мин воздействия температуры на клетки крови пациентов с СД2

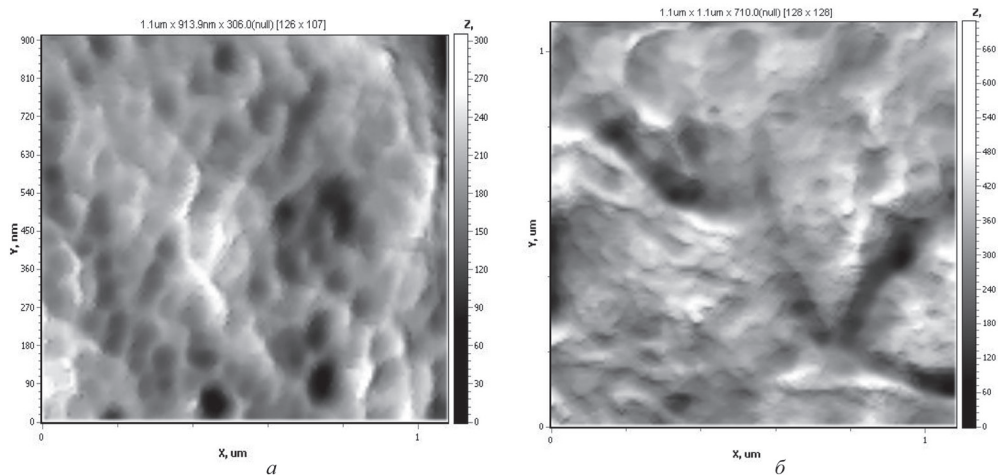


Рис. 2. АСМ-структура (режим латеральных сил) мембраны тромбоцита: *а* – до инкубирования; *б* – после инкубирования при 47 °С в течение 60 мин

установлено уменьшение значений модуля упругости на 25% по сравнению с исходными. Для клеток крови пациентов с ОКС и тромбоцитов пациентов с СД2 значения данного показателя не изменяются. Изменения механических характеристик мембран клеток крови обусловлены патологическими особенностями состава мембран эритроцитов. В результате термического воздействия происходят необратимые изменения, связанные с химическими превращениями белков и липидов мембраны.

Заключение. По итогам проведенного исследования выявлено, что на изменения свойств мембран клеток крови влияет не только температура, но и длительность инкубирования. Установлены изменения формы эритроцитов после воздействия температуры 47 °С в течение 60 мин: имеет место трансформация дискоцитов в эхиноциты как в случае ОКС, так и при СД2. Для мембран эритроцитов больных СД2 характерно снижение модуля упругости на 25% в ответ на тепловое воздействие, в остальных случаях изменений не установлено. Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о более высокой термостабильности мембран тромбоцитов по сравнению с мембранами эритроцитов, независимо от характера патологии. Полученные результаты указывают на необходимость исследования в дальнейшем влияния температур выше 47 °С на морфологические и механические свойства клеток крови и определение влияния процессов деструкции белков и гемолиза на свойства мембран эритроцитов и тромбоцитов. Таким образом, АСМ может быть рекомендован как дополнительный способ оценки структурных и локальных механических свойств мембран клеток в процессе изучения влияния на их функциональный статус различных температурных режимов, а также для доклинических исследований свойств препаратов, повышающих терморезистентность клеточных мембран в условиях различных патологических процессов.

Работа выполнена в рамках задания 2.2 подпрограммы «Эффективные теплофизические процессы и технологии» ГПНИ «Энергетические системы, процессы и технологии».

Список использованных источников

1. Measurement of the temperature-dependent threshold shear-stress of red blood cell aggregation / H. J. Lim [et al.] // *Rev Sci Instrum.* – 2009. – 80 (9). – P. 96–101.
2. Rakow, A. L. Effect of heat treatment on the elasticity of human erythrocyte membrane / A. L. Rakow, R. M. Hochmuth // *Biophys J.* – 1975. – 15 (11). – P. 1095–1100.
3. The effect of hyperthermia on human erythrocyte / L. J. Zuo [et al.] // *J. of East China Normal University (Natural Science).* – 1988. – 03.
4. Vaar, S. Osmotic resistance of heat-damaged erythrocytes / S. Vaar // *J. Clin. Path.* – 1967. – 20. – P. 239–243.
5. Influence of polyacrylic acid nanoparticles on the elastic properties of RBCs membranes in patients with diabetes mellitus type 2 / G. B. Melnikova [et al.] // *Series on Biomechanics.* – 2015. – Vol. 29, № 4. – P. 12–29.
6. Черницкий, Е. А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. – Минск : Наука и техника, 1981. – 216 с.