

УДК [576.31+539.31]:539.25

Г. Б. Мельникова¹, Т. Н. Толстая¹, А. С. Петровская¹, О. Н. Шишко²,
Е. Э. Константинова¹, С. А. Чижик¹, Т. В. Мохорт²

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ

Проведено изучение структуры и свойств мембран эритроцитов и тромбоцитов пациентов с сахарным диабетом 2 типа методом атомно-силовой микроскопии. Оценено влияние температуры и времени инкубирования на локальные механические свойства клеток крови и агрегационные свойства эритроцитов. Установлена критическая температура и время инкубирования для эритроцитов, при которой происходят необратимые изменения свойств мембран эритроцитов. Показано, что для тромбоцитов характерны более высокие термостабильные локальные механические свойства мембраны по сравнению с эритроцитами.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, локальные механические свойства, степень оседания эритроцитов, эритроциты, тромбоциты, температура.

Введение. Известно, что структура клеточной мембраны неустойчива к воздействию внешних факторов. Температура является одним из неотъемлемых факторов окружающей среды, оказывающих постоянное воздействие на клеточную мембрану. Изучение структурно-функциональных изменений в результате температурных воздействий может быть использовано в качестве методического аспекта при анализе нарушений в клеточной мембране. Под воздействием температуры меняется состояние липидной фазы мембраны клетки.

К настоящему времени информация о структурно-функциональных изменениях в мембранах под воздействием температур получена на основании результатов о поведении липидов и белков в интактных эритроцитах и в их тенях. Можно выделить три диапазона температур, в которых наблюдаются различные типы откликов на тепловое воздействие [1]. В области ниже 25°C наблюдаются изменения в состоянии белкового компонента, вызванные структурными переходами в окружающих их липидах. Наиболее интересной для изучения является вторая область 25–46°C, в которой происходят структурные переходы, оказывающие регуляторное влияние на процессы жизнедеятельности клеток. В данном случае можно выделить две подобласти: 28–36°C (структурные изменения в липидах типа плавления) и 42–46°C, в которых перестройка эритроцитарной мембраны происходит за счет инициации ее в липидной фазе и белковых компонентах. В третьей области температур (выше 46°C) установлены необратимые переходы в мембране эритроцитов, а также потеря ряда ее функциональных свойств. Воздействие температур от 43 до 54°C приводит к изменению формы клеток — образованию сфероцитов, в области от 55 до 77°C установлено разрушение мембран эритроцитов. Выше 45°C наблюдаются изменения эластичности клеток, а также структуры спектрина, входящего в их состав. Нарушается способность к обратимой агрегации и осмотическая резистентность эритроцитов. Это обусловлено денатурацией мембранных белков [2], а также гемолизом [3].

Клетки различного "возраста" обладают различной термочувствительностью — менее всего устойчивы к воздействию температурного фактора клетки "среднего возраста", время жизни которых в системе гемоциркуляции составляет 2 месяца [4].

¹Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси. 220072, г. Минск, ул. П. Бровки, 15; э-почта: galachkax@gmail.com; ²Белорусский государственный медицинский университет. 220116, г. Минск, просп. Дзержинского, 83; э-почта: tat_mokh@mail.ru. Поступила 23.03.2018.

Изменения свойств тромбоцитов под воздействием температур практически не изучены. Описанные выше результаты получены с использованием ряда трудоемких методов, а также требуют выделения мембранных компонентов и применения дополнительного анализа липидов и белков в растворах с использованием красителей. В настоящей работе предлагается использование метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) для анализа на наноуровне изменений упругих свойств эритроцитарных мембран под воздействием температур. Считаем наиболее интересным для исследований диапазон температур от 40 до 50°C, в котором возможно оценить как липидную перестройку в мембране, так и изменение форм клеток.

Цель настоящей работы — оценка влияния воздействия различных температур на упругие свойства мембран эритроцитов и тромбоцитов методом атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методика исследования. В работе использованы клетки крови пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2). Средний возраст пациентов среди женщин составил 53.6 ± 4.7 лет, среди мужчин — 56.8 ± 3.4 года.

Эритроциты для исследований выделяли из стабилизированной венозной крови пациентов этилендиаминтриацетатом калия $K_3ЭДТА$ (Aldrich), фиксировали 0.5% раствором глутарового альдегида и наносили на подложки из слюды при температуре $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Для выделения тромбоцитов венозную кровь стабилизировали 3.8% раствором цитрата натрия.

Степень агрегации эритроцитов (САЭ) определяли по скорости их оседания в стандартизованных стеклянных капиллярах диаметром 3 и длиной 200 мм (Dräger & Heerhorst GmbH & Co. KG, Германия) [5]. Параметры агрегации эритроцитов оценивали по графику $h(t)$, построенному путем фиксации границы "плазма-эритроциты", каждые 10 мин (рис. 1).

Образцы крови также инкубировали при температуре 41–47°C с интервалом 2°C в течение 40 и 60 мин. После окончания каждого из периодов выделяли эритроциты и тромбоциты, фиксировали 0.5% раствором глутарового альдегида на подложках из слюды для дальнейших проведенных исследований методом АСМ. Методика выделения и фиксации клеток описана в работе [6].

Изменение упругих характеристик клеточных мембран оценивали путем измерения модуля упругости по модели Джонсона–Кенделла–Робертса (ДКР) на атомно-силовом микроскопе NT-206 (ОДО "Микротестмашины", Беларусь) с использованием стандартных кремниевых зондов NSC 11, жесткость мембраны — 3 Н/м ("MikroMacsh"), радиус кривизны — 50 нм. Силу адгезии рассчитывали на основании измеренных значений отрыва острия зонда от поверхности образца.

Относительное изменение параметров E и F после воздействия температуры рассчитывали по формулам (1) и (2) соответственно:

$$\delta_E = \frac{E_T - E_{исх}}{E_{исх}}, \quad (1)$$

$$\delta_F = \frac{F_T - F_{исх}}{F_{исх}}. \quad (2)$$

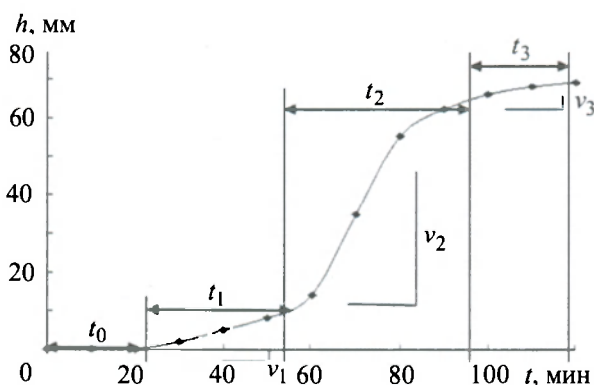


Рис. 1. Зависимость положения границы "плазма-эритроциты" от времени $h(t)$: t_0 — латентный период АЭ; t_1 — длительность начального периода АЭ; t_2 — длительность основного процесса АЭ; t_3 — длительность завершающей стадии АЭ; v_1 — скорость начального периода АЭ; v_2 — скорость основного процесса АЭ; v_3 — скорость на завершающей стадии АЭ