

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕОЛОГИЧЕСКИХ, ЭЛЕКТРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Н. Антонова<sup>1</sup>, А. Александрова<sup>1</sup>, Е. Э. Константинова<sup>2</sup>, Г. Б. Мельникова<sup>2</sup>,  
Е. Цветкова<sup>3</sup>, И. Иванов<sup>1</sup>, А. С. Петровская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт механики Болгарской академии наук, София, Болгария

<sup>2</sup>Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Болгарское общество по биореологии, София, Болгария

*В статье представлено сравнительное исследование механических свойств индуцированного *in vitro* кровяного сгустка с помощью реологических, электрореологических методов и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Приводятся данные динамической вязкости и специфической электропроводимости, а также их анализ на основании морфологических характеристик тромба.*

**Ключевые слова:** *тромбообразование *in vitro*, реологический метод, электрореологический метод, атомно-силовая микроскопия.*

**Введение.** Агрегация эритроцитов и тромбоцитов наряду с деформируемостью клеток в значительной степени определяет параметры микроциркуляции крови. Этот процесс в связи с его клинической значимостью изучается в последнее время при многих заболеваниях, таких как гипертензия, диабет, тромбообразование, сердечно-сосудистые болезни (например, тромбодинамические свойства кровяного сгустка у больных с ишемической болезнью сердца). Исследование тромбодинамических и реологических свойств сгустка является перспективным методом для медицины, т. к. отражает состояние тромбоопасности для больного.

Благодаря активно развивающемуся методу АСМ к настоящему времени получены важные результаты в различных областях физики, биофизики и биологии, успешно проведен анализ локальных механических характеристик кровяных клеток и реологических свойств крови у пациентов. Преимущество АСМ – возможность изучения структуры (морфологии) и физико-механических свойств кровяных клеток – эритроцитов и тромбоцитов, которые являются основными участниками в образовании кровяного сгустка.

*Цель исследования – изучить механизмы формирования и тромбодинамические свойства кровяного сгустка при тромбообразовании *in vitro*, с помощью реологических, электрореологических и АСМ-методов.*

**Материалы и методы исследования.** Вязкость и специфическую электропроводимость нормальной и консервированной с CPD-адениновым раствором

крови (Национальный центр гематологии и переливания крови, София) измеряли ротационным вискозиметром Low Shear 30 Contraves (LS30) с коаксиальными цилиндрами и копии измерительной системы MS1/1 со встроенными электродами (разработана на базе LS30) и программным обеспечением. Соотношение крови/консервирующий раствор CPD-A1: 450 мл крови/63 мл хранили при 4 °С. Для инициирования коагуляции к образцу добавляли 2 %-ный водный раствор хлорида кальция  $\text{CaCl}_2$  (0,1 мл раствора на 1 мл крови). После его добавления образец сразу же помещали в зазор между цилиндрами и измерения проводили в условиях постоянного сдвигового течения при скоростях сдвига  $0,0237 \text{ с}^{-1}$  и  $0,0596 \text{ с}^{-1}$ . Контроль процесса коагуляции осуществляли путем мониторинга изменений вязкости крови одновременно с измерением специфической проводимости крови при температуре 37 °С [1–2].

В другом эксперименте измерения проводили через 30 мин после добавления раствора хлорида кальция к крови и формирования сгустка. Сгусток подвергали синусоидальному сдвиговому течению при различных частотах от 0,000222 Гц до 1,663 Гц и при максимальной скорости сдвига от  $0,00911 \text{ с}^{-1}$  до  $67 \text{ с}^{-1}$ . Оценивали динамическую вязкость  $\eta_v$  и упругость сгустка, определяя вязкоэластический модуль  $G$  (storage modulus) [3]. Анализ данных выполняли программными пакетами Jandel science и Sigma Plot, а также с использованием программного обеспечения, разработанного в Институте механики Болгарской академии наук.

Исследования структуры сгустка проводили в Институте тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси на атомно-силовом микроскопе NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Использовали стандартные кремниевые зонды NSC11 («MikroMasch», Эстония) с радиусом кривизны не более 30 нм и коэффициентом жесткости 3 Н/м (согласно спецификации производителя зондов). Образцы для исследований готовили согласно описанной ранее методике [4]. Из каждого образовавшегося кровяного сгустка (после 17-минутного нагружения сдвигом в зазоре между концентрическими цилиндрами реометра LS30) отбирали небольшую нефиксированную пробу, которую нанесли на покровное стекло, высушивали на воздухе при комнатной температуре.

**Результаты и обсуждение.** В условиях вискозиметрического течения крови мы установили, что процесс коагуляции до образования тромба можно разделить на два этапа: начальный процесс коагуляции и интенсивная коагуляция. В начальном периоде наблюдалось постепенное увеличение кажущейся вязкости и уменьшение электропроводимости крови. Во время интенсивной коагуляции определена функция экспоненциального роста вязкости (вязкости от времени) при постоянной скорости сдвига. Было установлено, что при скоростях сдвига от  $0,0175 \text{ с}^{-1}$  до  $1,25 \text{ с}^{-1}$  после добавления раствора хлорида кальция вязкость увеличивается с 16 000 мПа до 60 000 мПа. Оба этапа характеризуются параллельным уменьшением электропроводимости исследуемого образца [1–3]. Установлено, что образование кровяного сгустка зависит от интенсивности реометрического потока [1–3].

В работах [2, 5] показано, что существует температурная зависимость в процессе коагуляции. Временные параметры, характеризующие коагуляцию при 25 °С, характеризуются более высокими значениями, чем при 37 °С. Это означает, что при высоких температурах свертывание крови происходит быстрее. В полученных ранее наших результатах было показано [2], что относительное изменение  $\sigma - \Delta\sigma$  также увеличивается с повышением температуры до 37 °С. С повышением значений гематокрита относительное изменение электропроводимости ( $\Delta\sigma$ ) уменьшается [1, 2].

В условиях вискозиметрического синусоидального течения крови установлено, что сформированный сгусток обладает вязкоэластическими свойствами и упругостью – вплоть до нарушения его внутренней структуры [1, 3]. При больших нагрузках начинается пластическое течение и предел упругости меняется порядка  $3 \cdot 10^3$  Н/м<sup>2</sup> [1, 5, 6].

Время свертывания  $t_c$  в вискозиметрических приборах зависит от условий процесса и коррелирует с реологическими параметрами сгустка. В частности,  $t_c$  тоже увеличивается с ростом температуры [5].

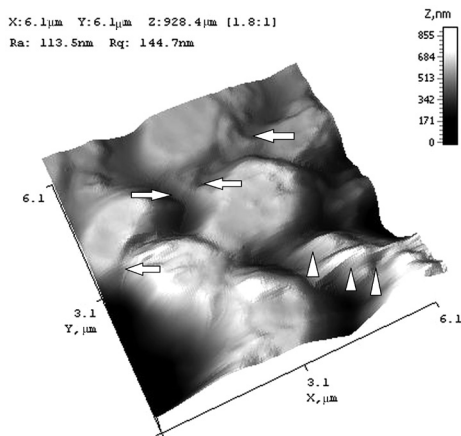


Рис. 1. 3D АСМ-изображение топографии сгустка, образованного при сдвиговом потоке при  $\gamma = 0,0237$  с<sup>-1</sup> (→ – псевдоподии, формирующие «мостики» между тромбоцитами;  $\Delta$  – толстые фибриновые нити в периферии сгустка)

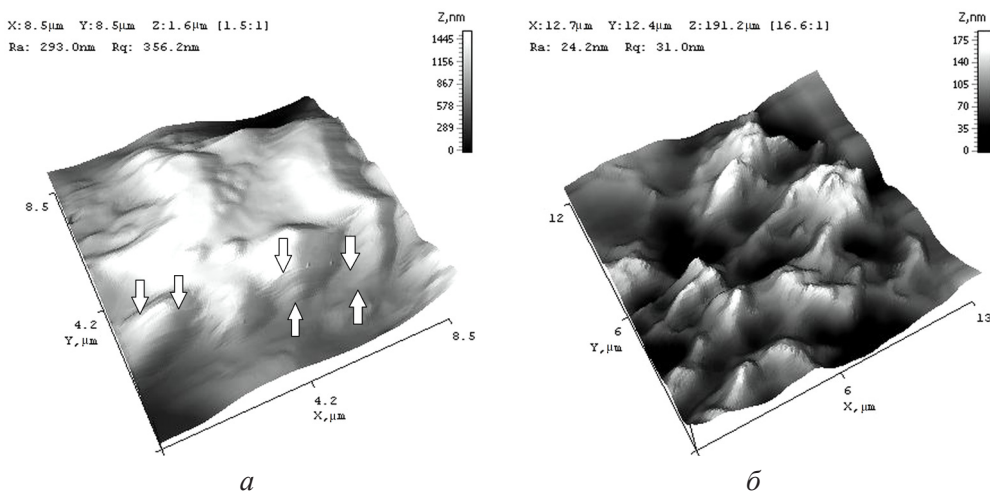


Рис. 2. 3D-топография поверхности сгустка, образованного при сдвиговом потоке при  $\gamma = 0,0237$  с<sup>-1</sup>. Тонкие параллельные нити фибрина (а) обозначены стрелками (↓)

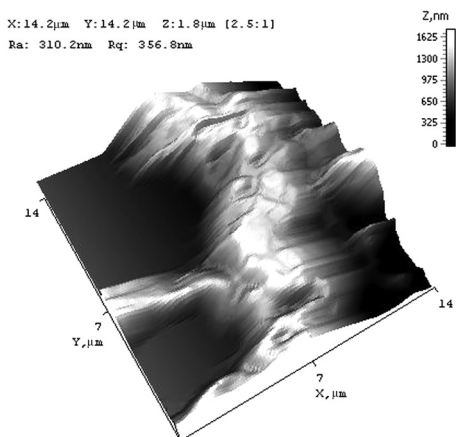


Рис. 3 АСМ-изображение эритроцитов, формирующих монетные столбики в сгустке, образованного при сдвиговом потоке  $\gamma = 0,0237 \text{ с}^{-1}$

На основании проведенного изучения структуры тромба (рис. 1, 2) методом АСМ показано формирование цитоплазматических псевдоподий, образующих межклеточные «мостики» и осуществляющие «мостиковые» взаимодействия при агрегации тромбоцитов и образовании тромбов на ранней и поздней стадии клеточной активации [7–10]. На изображении представлено скопление (кластеры) из активированных тромбоцитов, формирующих сгусток. Подобную модель «мостикового» взаимодействия за счет образования «мостиков» между эритроцитами описывают Li и соавторы [7]. Эти наблюдения подтверждают наличие «мостикового» взаимодействия при одновремен-

ной агрегации тромбоцитов и эритроцитов в процессах микроциркуляции и коагуляции крови. Межклеточные «мостики» соединяют клетки и состоят из белков, участвующих в взаимодействии эритроцитов и тромбоцитов [7].

На основании изученной ультраструктуры установлено наличие фибриновых нитей в сгустках (см. рис. 2). Предполагаем, что в образовании кровяного сгустка участвуют тонкие и толстые нити.

Методом АСМ также проведено изучение морфологических характеристик эритроцитов в кровяном сгустке, включая формирование монетных столбиков («gouleaux») (рис. 3).

В последнее время эти процессы привлекают все больший интерес и в связи с их клинической значимостью при многих заболеваниях, таких как сахарный диабет, гипертензия и многие другие. Для будущих исследований интересным является также измерение модуля упругости тромбоцитов и эритроцитов в кровяном сгустке.

**Закключение.** Сравнительное исследование образования кровяного сгустка реологическими и электрореологическими методами [1–3] отражает состояние тромбоопасности для больных и является клинически важным. Введение реологических и электрореологических методов для изучения процесса коагуляции и тромбогенезиса может быть использовано как дополнительный метод исследования в гемореологии.

Применение АСМ для количественного и качественного исследования физико-механических и морфологических свойств кровяных клеток (тромбоцитов и эритроцитов) в сгустке имеет важное значение при клинических исследованиях больных тромбоэмболической болезнью сердца и сосудов [4, 14, 15, 17]. Сравнение полученных методом АСМ локальных механических характеристик

эритроцитов и тромбоцитов с реологическими свойствами крови у пациентов с высоким уровнем агрегации эритроцитов и тромбоцитов свидетельствует об изменении микрореологических характеристик клеток, участвующих в процессе формирования кровяного сгустка [14, 16, 17]. Комплексный подход при использовании современных методов исследования роли факторов риска в развитии тромбозов и тромбозэмболических осложнений имеет клиническое значение для использования стандартных схем фармако-тромбопрофилактики [15, 17].

*Исследование было проведено в рамках совместного исследовательского проекта между Институтом механики Болгарской академии наук и Институтом тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси: «Механические и электрические свойства крови и экспериментальная оценка локальных упругих характеристик биологических клеток методами контактной механики. Сравнительное исследование». Работа выполнена также в рамках проекта двустороннего сотрудничества 2016 – Болгария – Австрия (№ ДНТС 01/10): «Сравнительное изучение кинетики образования тромбов» («A comparative study of the kinetic of clot (thrombus) formation»), финансируемого Болгарским национальным научным фондом.*

## Литература

1. Antonova, N. Rheological coagulation test of blood and viscoelasticity of blood clots / N. Antonova // In: Proceedings of the 9<sup>th</sup> National Congress on Theoretical and Applied Mechanics, Varna, Bulgaria, 19-22 Sept. 2001. – Varna, Bulgaria, 2001. – P. 136–141.
2. Ivanov, I. Observations on the blood electrical conductivity changes at coagulation and under flow / I. Ivanov // In: Antonova, N. (Ed.), Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Eurosummer School on Bio rheology and Symposium on Micro Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems, Varna, Bulgaria, 17–20 Sept. 2006. – Varna, Bulgaria, 2006. – P. 77–80.
3. Антонова, Н. Реологические аспекты свертывания и времязависящие свойства крови в процессе консервации / Н. Антонова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2002. – № 3 (11). – С. 46–49.
4. Investigation of the kinetics of coagulation and morphological observations of blood clot formation / A. Alexandrova [et al.] // J. Series on Biomech. – 2017. – Vol. 31, № 4. – P. 34–42.
5. Левтов, В. А. Реология крови / В.А. Левтов, С.А. Регирер, Н.Х. Шадрина // – Москва, Медицина, 1982.
6. Elasticity and fracture strain of whole blood clots / P. Riha [et al.] // Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 1999. – Vol. 21. – P. 45–49.
7. К доказательству «мостикового» взаимодействия при агрегации эритроцитов / К. Ли [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология : тезисы 3-го Всемирного конгресса «Controversis in Thrombosis and Hemostasis» (CiTH) совместно с 8-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 20–22 окт. 2016 г., Москва. – 2016. – № 3. – С. 251.
8. Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes / F. A. Carvalho [et al.] // ACS NANO. – 2010. – Vol. 4, № 8. – P. 4609–4620.
9. Guanyong, L. Probing membrane proteins using atomic force microscopy / L. Guanyong, X. Ning, D. J. Wang // Cell. Biochem. – 2006. – Vol. 97. – P. 1191–1197.
10. The melding of nanomedicine in thrombosis imaging and treatment: a review. / V. Karagkiozaki [et al.] // Logothetidis Future Sci. – 2016. – OA, 2(2). – FSO113.
11. Atomic force microscopy of fibrin networks and plasma clots during fibrinolysis / A. Blinc [et al.] // Fibrinolysis & Proteolysis. – 2000. – Vol. 14 (5). – P. 288–299.

12. Fibrinogen-induced erythrocyte aggregation: erythrocyte-binding site in the fibrinogen molecule / N. Maeda [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – Vol. 904. – P. 81–91.
13. Rampling, M. W. The binding of fibrinogen and fibrinogen degradation products to the erythrocyte membrane and its relationship to haemorheology / M. W. Rampling // Acta Biol. Med. Ger. – 1981. – Vol. 40. – P. 373–378.
14. Platelet response heterogeneity in thrombus formation / I. C. Munnix [et al.] // Thromb. Haemost. – 2009. – Vol. 102. – P. 1149–1156.
15. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope / M. Radmacher [et al.] // Biophysical Journal. – 1996. – Vol. 70. – P. 556–567.
16. Белова, Н. И. Маркеры активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза популяции коренного населения ненецкого автономного округа / Н. И. Белова, Н. А. Воробева // Тромбоз, гемостаз и реология, тезисы 3-го Всемирного конгресса «Controversis in Thrombosis and Hemostasis» (СiТН) совместно с 8-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 20–22 окт. 2016 г., Москва. – 2016. – № 3. – С. 57.
17. Structure and mechanical properties of erythrocytes and platelets with acute coronary syndrome / E. Konstantinova [et al.] // In: Book of abstract of the 5<sup>th</sup> Eurosummer School on Biorheology and Symposium on Micro and Nanomechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems, Varna, Bulgaria, 1-5 Sept. 2015. – Varna, Bulgaria, 2015. – P. 42.

УДК 576.32/36

## ВКЛАД ДЛИНЫ ЗОНДА АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА В ЗНАЧЕНИЯ КАЖУЩЕГОСЯ МОДУЛЯ ЮНГА НАТИВНЫХ НЕЙРОНОВ

**А. В. Анкудинов<sup>1,2</sup>, М. М. Халисов<sup>2,3</sup>, В. А. Пеннийнен<sup>3</sup>,  
С. А. Подзорова<sup>3</sup>, К. И. Тимошук<sup>2,3</sup>, Б. В. Крылов<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информаци-  
онных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>3</sup>*ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Россия*

*Исследованы нативные сенсорные нейроны. Обнаружена зависимость измеряемого в атомно-силовом микроскопе кажущегося модуля Юнга клеток от отношения высоты зонда к длине консоли используемого кантилевера. Для объяснения результата анализируются деформации консоли в двух крайних случаях: скользящий и заземленный контакт зонда с поверхностью.*

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, физиология, модуль Юнга, клетки.

**Введение.** В последнее время перспективными считаются исследования модуля Юнга нативных клеток методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) [1, 2]. Большой интерес представляет определение степени влияния различных фармакологических препаратов на клетку [3–5]. Недавно нам удалось выявить воздействие на сенсорные нейроны веществ с анальгетическим эффектом.