

СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ В ПЛАЗМЕ АТМОСФЕРНОГО БАРЬЕРНОГО РАЗРЯДА

В. А. Лапицкая¹, Т. А. Кузнецова¹, Г. Б. Мельникова¹, Т. Н. Толстая¹,
С. А. Чижик¹, Д. А. Котов², С. А. Никитюк², Т. Г. Кузнецова³

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

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
Минск, Беларусь

³Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Проведены исследования поверхности эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии после обработки низкотемпературной плазмой диэлектрического барьерного разряда в течение 1 мин. Оценивались морфологические характеристики как нативных эритроцитов, так и фиксированных глутаровым альдегидом. Выявлены структурные изменения поверхности эритроцитарной мембраны после обработки плазмой.

Ключевые слова: эритроциты, низкотемпературная плазма диэлектрического барьерного разряда (ДБР), атомно-силовая микроскопия (АСМ), мембрана, морфология поверхности.

Введение. В последнее десятилетие активно исследуются биологические эффекты низкотемпературной газоразрядной плазмы [1–3], основанные на совместном воздействии активных частиц, электрического поля и ультрафиолетового излучения. Активные частицы при этом остаются относительно холодными и не оказывают термического воздействия на обрабатываемые объекты. С другой стороны, установлена высокая стерилизационная эффективность плазмы в отношении различных микроорганизмов [1]. Это делает перспективным использование плазмы для обработки поврежденных эпителиальных поверхностей, в стоматологии и других областях медицины. Однако, механизмы влияния газоразрядной плазмы на ткани и клетки человека исследованы недостаточно. В экспериментах на эритроцитах было установлено, что при 15-минутном воздействии изменяется форма клеток, а после 30 мин снижается объем гемоглобина [2, 3]. Но для бактерицидного действия низкотемпературной плазмы достаточна обработка в течение 1–2 мин [1, 3], когда последствия для эукариотических клеток еще не будут столь катастрофичны.

Перспективным инструментом для изучения эффектов плазмы ДБР является атомно-силовая микроскопия с ее возможностями оценивать не только морфологию, но и широкий спектр физических свойств клеточных мембран

[4–6], которые вовлечены в механизмы патогенеза самых различных заболеваний человека [7–9].

Целью данной работы являлось изучение свойств поверхности эритроцитов до и после кратковременной (1 мин) обработки в низкотемпературной плазме диэлектрического барьерного разряда методами АСМ.

Материалы и методы исследований. В работе использованы образцы эритроцитов, фиксированные на пластинах слюды. Эритроциты для исследований выделяли из стабилизированной КЗЭДТА венозной крови пациентов. Венозную кровь центрифугировали 3 мин при 90g. Отделяли плазму, а полученный осадок трехкратно отмывали PbS (Phosphate Buffered Saline, «SIGMA», США). Одну часть эритроцитарной массы наносили на пластины слюды и высушивали, вторую (3 мкл суспензии эритроцитов) фиксировали в 700 мкл 0,5 %-ного буферного раствора глутарового альдегида в течение 30 мин. После фиксации отделяли эритроциты центрифугированием в течение 3 мин при 90g. К полученному осадку добавляли 700 мкл PbS, ресуспендировали и центрифугировали 3 мин при 90g, процедуру повторяли два раза, затем отмывали в 700 мкл дистиллированной воды, ресуспендировали и центрифугировали 3 мин при 90g, процедуру повторяли два раза. Осадок с эритроцитами наносили на пластинки слюды размером 1 × 1 см.

Образцы обрабатывали в течение 1 мин в низкотемпературной плазме диэлектрического барьерного разряда (ДБР). Мощность источника плазмы: 10–30 Вт. Расстояние от источника до образца – 20 мм.

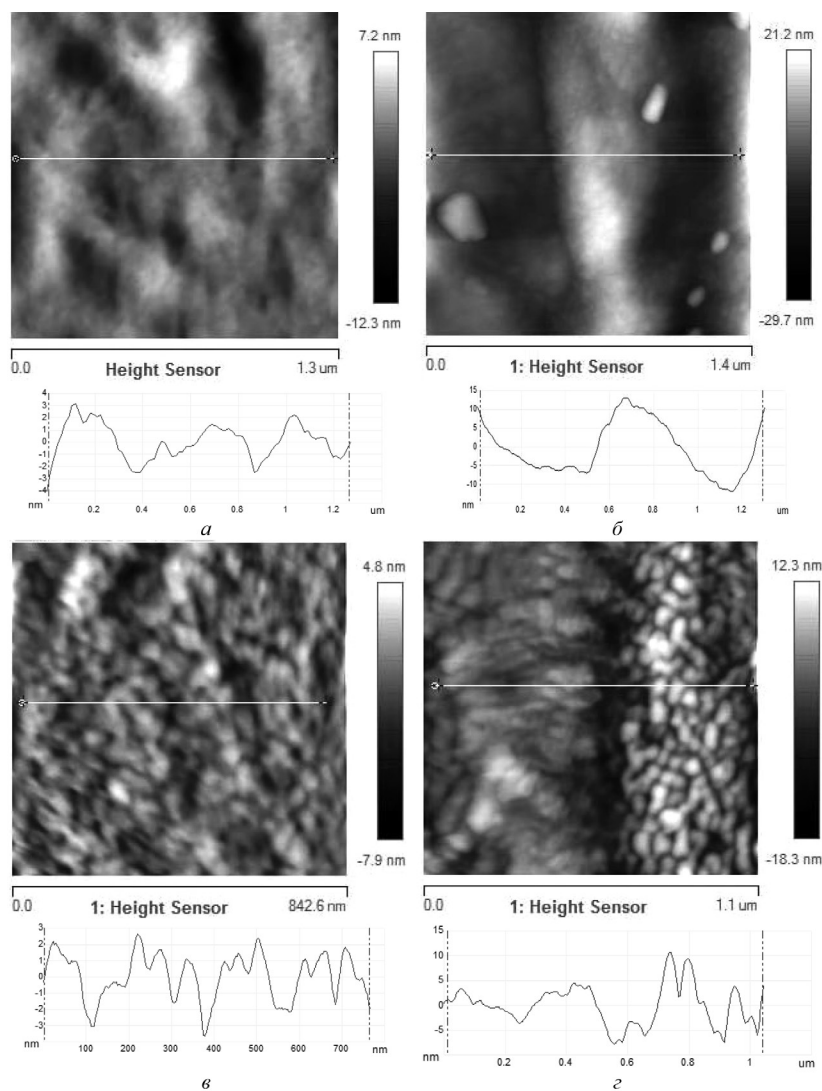
Исследования структуры проводились на АСМ Dimension FastScan (Bruker, США) в режиме PeakForce Tapping QNM с использованием стандартных кремниевых кантилеверов типа MPP-12120-10 (производство Bruker, США) с радиусом закругления острия 42 нм, с жесткостью консоли 5,8 Н/м.

Результаты и обсуждение. Форма эритроцитов в виде двояковогнутого диска сохранялась во всех образцах и не отличалась от контроля. Морфологические параметры эритроцитарной поверхности, напротив, изменялись под воздействием низкотемпературной плазмы, а также зависели от способа подготовки образцов.

Результаты эксперимента представлены в виде АСМ-изображений небольших участков мембраны (около 1 мкм²) на верхней поверхности эритроцитарного тора (см. рис.).

Рельеф мембранной поверхности нативных эритроцитов (см. рис., а) более сглаженный, чем у клеток с химической фиксацией (см. рис., в). После воздействия плазмы ДБР поверхность мембраны нативных эритроцитов в целом сохраняла свою структуру. Однако, встречались отдельные эритроциты, у которых вдоль верхней линии тора появлялся складчатый прогиб глубиной 5–10 нм.

Поверхность клеток в контрольных образцах с использованием химической фиксации демонстрирует более сложную структурную организацию. Мембрана формирует плотно расположенные округлые выпячивания диаметром около 50 нм и высотой 2–3 нм (профильная кривая на рис., в). Эти структуры



АСМ-изображения поверхности мембраны эритроцитов: *a*, *б* – эритроциты в кровяной плазме (незафиксированные), до и после обработки низкотемпературной плазмой ДБР соответственно; *в*, *г* – фиксированные в глютаровом альдегиде до и после обработки низкотемпературной плазмой ДБР соответственно, поле 1×1 мкм

предположительно являются результатом молекулярных сшивок между глютаровым альдегидом и аминок группами белков, входящих в состав мембранного цитоскелета. Таким образом, регулярность глобул, выявляемых АСМ-зондом, может отражать строго упорядоченное расположение структурных элементов эритроцитарного цитоскелета. После воздействия низкотемпературной плазмой на поверхности эритроцитов выявляются две зоны, четко различающиеся на АСМ-изображениях топографии. В области наружной окружности

тора границы между глобулами сглаживаются и профили регистрируют незначительные перепады высот (см. рис., 2, слева). В зоне внутренней половины эритроцитарного тора (см. рис., 2, справа) «грануляция» поверхности, напротив, становилась более контрастной, поскольку глубина борозд между выпячиваниями возрастала, достигая 10 нм и более. Эти две зоны разделяются узкой впадиной, глубиной около 15 нм.

Выявленные изменения эритроцитарной поверхности позволяют предположить, что плазма ДБР оказывает существенное влияние на эритроцитарную мембрану, связанное с реорганизацией ее цитоскелета.

Заключение. Кратковременное (1 мин) действие низкотемпературной плазмы диэлектрического барьерного разряда на нативные эритроциты провоцирует формирование отдельных мембранных складок, не вызывая видимых изменений в тонкой структурной организации мембранной поверхности. Химическая фиксация глутаровым альдегидом усложняет рельеф клеточной поверхности и позволяет выявить и оценить изменения, вызванные действием плазмы ДБР. Эти изменения имеют разнонаправленный характер в разных участках эритроцитах и предположительно связаны с реорганизацией эритроцитарного цитоскелета.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № Ф17-118.

Литература

1. Семенов, А. П. Воздействие низкотемпературной аргоновой плазмы слаботочных высоковольтных разрядов на микроорганизмы / А. П. Семенов [и др.] // Прикладная физика. – 2014. – № 3. – С. 47–50.
2. Трофимова, С. В. Анализ структурных изменений прокариотических и эукариотических клеток под воздействием излучения плазмы искрового разряда / С. В. Трофимова, И. П. Иванова, М. Л. Бугрова // Биол. науки. – 2013. – Т. 4. – С. 130–133.
3. Иванова, И. П. Исследование механизмов биоцидного действия излучения плазмы искрового разряда / И. П. Иванова, С. В. Трофимова, И. М. Пискарев // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 2. – С. 20–30.
4. Погоцкая, И. В. Определение модуля упругости нанопокрывтий методом атомно-силовой микроскопии / И. В. Погоцкая, Т. А. Кузнецова, С. А. Чижик // Механика машин, механизмов и материалов. – 2011. – Т. 16, № 3. – С. 43–48.
5. Кузнецова, Т. А. Микрозонды для определения силы адгезии и удельной поверхностной энергии методом атомно-силовой микроскопии / Т. А. Кузнецова, Н. В. Чижик, Т. И. Ширяева // Приборы и методы измерений. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 41–45.
6. Micro-and nanoscale testing of tribomechanical properties of surfaces S. A. Chizhik [et al.]. Recent Advances in Mechatronics / Ed.: R. Jabłoński [et al.]. – Berlin : Springer, 2007. – P. 541–545.
7. Матюхина, Т. Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитарных мембран / Т. Г. Матюхина, С. О. Пантелей, Т. А. Кузнецова // 6-й Бел. семинар по скан. зондовой микроскопии : сб. докл., Минск, 12–15 октября 2004 г. / ИТМО им. А. В. Лыкова НАН Беларуси. – 2004. – С. 97–101.
8. Стародубцева, М. Н. Пероксинитрит-индуцированные структурные перестройки в эритроцитарных мембранах / М. Н. Стародубцева, Т. Г. Кузнецова, Т. А. Кузнецова // Весці НАН Беларусі. Серія біолаг. навук. – 2006. – № 3. – С. 96–99.
9. Стародубцева, М. Н. Особенности пойкилоцитоза, вызванного действием активных форм азота / М. Н. Стародубцева [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 117–121.