

Выводы

Полученные с помощью атомно-силовой микроскопии данные указывают на существенные отличия значений микромеханических (фрикционных) свойств и характера их температурных зависимостей для иммортализованных фибробластов и эпителиальных клеток рака легкого человека (A549), что указывает на различия в структурно-функциональном состоянии их белков кортикального цитоскелета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стародубцева, М. Н. Анализ релаксационных состояний полимеров и биополимеров на основе карт латеральных сил, получаемых методом атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоренков // Вестник Фонда фундаментальных исследований. — 2010. — № 4. — С. 51–57.
2. Starodubtseva, M. N. Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy / M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, I. A. Nikitina // Micron. — 2012. — Vol. 43, № 12. — P. 1232–1238.
3. Characterization of cell elasticity correlated with cell morphology by atomic force microscope. / Q. Guo [et al.]. // J. Biomech. — 2012. — Vol. 45, № 2. — P. 304–309.
4. Cancer cell detection in tissue sections using AFM / M. Lekka [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. — 2012. — Vol. 518, № 2. — P. 151–156.
5. The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures / A. N. Ketene [et al.] // Nanomedicine. — 2012. — Vol. 8, № 1. — P. 93–102.
6. Swaminathan, V. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines / V. Swaminathan [et al.] // Cancer. Res. — 2011. — Vol. 71, № 15. — P. 5075–5080.
7. Dynamics of protein nitration in cells and mitochondria / K. S. Aulak [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 2004. — Vol. 286. — P. H30–H38.

УДК 616.155.1

ИЗМЕНЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ КРОВИ

Стародубцева М. Н., Петренёв Д. Р., Егоренков Н. И.

**Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь**

Введение

Изменение механических свойств и морфологии эритроцитов при хранении крови является одним из важных аспектов развития посттрансфузионных осложнений [1]. Эти изменения происходят в результате ряда химических процессов, вызванных нарушениями нормальных для эритроцитов условий существования (физиологических условий), обусловленными изъятием крови и изоляцией ее от организма и включающими истощение эритроцитов по АТФ, перекисное окисление липидов, потерю асимметрии липидного бислоя и потерю части фосфолипидов в результате везикуляции, реорганизацию мембранного скелета и др. [2, 3]. Изменение механических свойств эритроцитов включает изменение их деформируемости (оценивается по изменению отношения площади поверхности к объему клетки или модуля упругости мембраны), вязкости цитоплазмы, осмотической резистентности клеток и способности к агрегации. Изменение морфологии эритроцитов включает трансформацию нормоцитов-дискоцитов (легко деформируемой формы эритроцитов) в эхиноциты с морфологическим индексом 1 (слабо деформируемую форму эритроцитов) или в сфероэхиноциты (форму эритроцитов, практически не способную к деформациям в кровотоке) [2, 4].

Микроскопия латеральных сил (МЛС) является одним из методов (опций) атомно-силовой микроскопии (АСМ), используемых для изучения механических (фрикционных) свойств поверхностей. При этом для характеристики фрикционных свойств поверхностей используют параметры боковых (латеральных) сил — сил трения, возникающих между острием АСМ-зонда и поверхностью изучаемого объекта при ее сканировании (скольжении наноразмерного зонда-индентора по поверхности). Значения этих сил зависят, в основном, от структурно-релаксационного состояния белков цитоскелета [5].

Цель

Сравнительный анализ параметров механических свойств, определяемых с помощью микроскопии латеральных сил и методом осмотического гемолиза, от времени хранения эритроцитов.

Материалы и методы исследования

Опыты проведены с использованием эритроцитарной массы, полученной из ГУЗ «Гомельская областная станция переливания крови». Эритроцитарную массу хранили в течение 40 дней в стерильных условиях при температуре 4–6 °С. Относительную концентрацию гемолизированных эритроцитов в гипотонических солевых растворах (S/S_0) определяли как отношение интенсивности света ($\lambda = 680$ нм), прошедшего через кювету с исследуемой суспензией эритроцитов после 20 минутной инкубации в гипотонических солевых растворах, к интенсивности света, прошедшего через кювету с суспензией эритроцитов в изотоническом (153 мМ) растворе NaCl. Осмотическое давление солевого раствора (π) рассчитывали по формуле:

$$\pi = 2 \times 0,93 \times RT \times C,$$

где C — концентрация NaCl в растворе; R — газовая постоянная; T — температура; коэффициент 0,93 — осмотический коэффициент для раствора NaCl. Трансмембранную разность осмотического давления ($\Delta\pi$) оценивали как разность осмотических давлений

$$\Delta\pi = 2 \times 0,93 \times RT (C_{\text{iso}} - C),$$

где $C_{\text{iso}} = 0,153$ М (концентрация NaCl в изотоническом растворе). Параметры осмотического гемолиза ($\Delta\pi_{50\%}$ и k) определяли при аппроксимировании зависимостей $S/S_0(\Delta\pi)$ логистической функцией вида

$$\frac{S}{S_0} = \frac{a}{1 + \exp(-k \cdot (x - \Delta\pi_{50\%}))},$$

где a — постоянная.

Для световой и атомно-силовой микроскопии монослой эритроцитов наносили на специально подготовленные лабораторные предметные стекла и высушивали без химической фиксации (мазок). Относительное количество нормоцитов-дискоцитов и эхиноцитов с морфологическим индексом 1 (EI, эхиноциты-дискоциты с единичными выступами) (N/N_0) оценивали как отношение количества нормоцитов и EI (N) к общему количеству эритроцитов в суспензии (N_0). АСМ-исследования клеток проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашины», Беларусь) в контактном режиме сканирования с использованием игл-зондов CSC38 («MicroMash»): уровни А и В, коэффициент жесткости 0,01–0,08 Н/м. Сканирование проводили при стандартных комнатных условиях: влажность 55 ± 10 % и температура 22 ± 5 °С. Записывали изображения рельефа (топографию) и карты латеральных сил. Параметры сил трения (F_f — средние силы трения на участке поверхности площадью $1,5 \text{ мкм} \times 1,5 \text{ мкм}$, σ_f — среднеквадратическое отклонение сил трения от среднего значения на участках с такой же площадью) оценивали при сканировании этих участков поверхности клетки в двух противоположных направлениях. АСМ-изображения обрабатывали с помощью программы «SurfaceXplore 1.3.11» («МикроТестМашины», Беларусь).

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологический анализ эритроцитов, выполненный с помощью световой микроскопии, показал, что процентное содержание дискоцитов-нормоцитов и эхиноцитов с морфологическим индексом 1 (EI) в популяции клеток уменьшается с увеличением времени хранения эритроцитарной массы) и становится меньше 10 % к концу четвертой недели (рисунок 1а). Эхиноциты EI в отличие от эхиноцитов с морфологическими индексами 2 и 3 (EII и EIII) при определенных условиях могут трансформироваться в нормоциты-дискоциты (например, при возврате клеток в кровотоки).

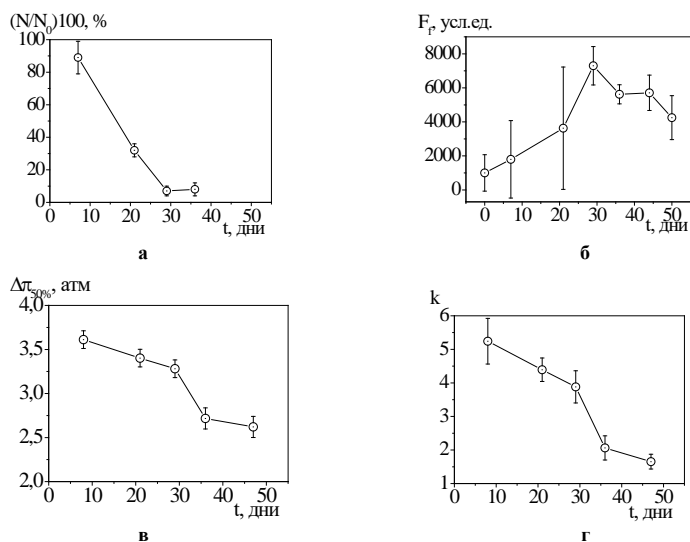


Рисунок 1 — Изменение морфологии и механических свойств эритроцитов при их хранении: относительное количество (N/N_0) нормоцитов и эхиноцитов EI в образцах эритроцитарной массы (а), значение силы трения (F_f) между острием АСМ-зонда и поверхностью эритроцитов (б), параметры осмотического гемолиза ($\Delta\pi_{50\%}$ и k) (в, г). На рисунках а, в и г данные представлены как среднее выборочное значение и границы 95 % доверительного интервала ($n = 2-10$). На рисунке б данные представлены в виде $F_f \pm \sigma$, рассчитанных для участков поверхности клеток размером $1,5 \text{ мкм} \times 1,5 \text{ мкм}$, $256 \text{ пикселей} \times 256 \text{ пикселей}$

Оцененные с помощью МЛС параметры фрикционных свойств для поверхности эритроцитов (F_f и σ_f) существенно зависят от времени хранения эритроцитарной массы (рисунок 1б). Эти результаты были получены при комнатной температуре ($22 \text{ }^\circ\text{C}$), то есть в условиях, когда отклик биологических клеток на механическое воздействие соответствует по характеру отклику аморфного вещества (например, аморфного полимера), находящегося в так называемом состоянии «мягкого стекла». Для биологических клеток структурно-релаксационное состояние «мягкого стекла» реализуется при физиологических температурах и близких к ним температурах, не превышающих температуры тепловой денатурации белков [5]. Как известно, аморфные низкомолекулярные вещества могут находиться в стеклообразном (твердом) и текучем (жидком) состояниях, а аморфные полимеры (высокомолекулярные вещества, включая биополимеры) — в стеклообразном, высокоэластическом и вязко-текучем состояниях. Оцениваемые с помощью МЛС силы трения поверхности биологических клеток определяются, в основном, механическими свойствами приповерхностного, контактирующего с мембраной слоя цитоскелета [5, 6]. В случае эритроцитов цитоскелет, представляющий из себя гексагональную спектрин-актиновую сетку, состоящую из филаментов спектрина, соединенных актином, является двумерным (корковым) и доступным для АСМ-зонда.

Зависимость сил трения эритроцитов от времени их хранения описывается кривой с максимумом (в течение первых четырех недель наблюдается увеличение сил трения). Увеличение сил трения клеток при комнатной температуре их оценки, то есть сил трения клеток, находящихся в состоянии «мягкого стекла», наблюдается также в случае обработки эритроцитов глутаровым альдегидом (сшивающим белки химическим соединением) и пероксинитритом (сильнейшим окислителем биополимеров, вызывающим в зависимости от его концентрации окислительную деструкцию или сшивку их

макромолекул). Так как изменение структурно-релаксационных свойств веществ связано с изменением их молекулярной подвижности, а изменение структурно-релаксационных свойств полимеров — с изменением их сегментальной подвижности (химическая сшивка ее уменьшает), то можно предполагать, учитывая характер изменения фрикционных свойств эритроцитов при хранении, что в течение первых четырех недель хранения в его поверхностном слое преобладают процессы, связанные с уменьшением молекулярной подвижности (например, сегментальной подвижности, обусловленной процессами сшивки макромолекул). Так как находящийся в жидком состоянии бислой мембраны не может оказать существенного влияния на определяемые с помощью МЛС силы трения, то это, вероятнее всего, макромолекулы белков (цитоскелета, мембраны, гликокаликса). Определенный вклад может внести и возможный уход с поверхности клетки низкомолекулярных веществ. Отметим, что модуль упругости поверхности эритроцитов увеличивается, в основном, после четырех недель хранения эритроцитов (*in vitro*) [7, 8]. Параметры осмотической резистентности эритроцитов ($\Delta\pi_{50\%}$ и k) также медленно изменялись в течение четырех недель хранения эритроцитарной массы и только после четырех недель, когда практически все обратимые формы эритроцитов трансформировались в необратимые, наблюдалось значительное изменение этих параметров (рисунок 1в, г). Согласно морфологическим данным, 90 % клеток к концу четвертой недели хранения находятся в форме сферозхиноцитов. Сферозхиноциты не способны к сколько-нибудь заметным обратимым деформациям, поэтому характеризуются низким значением осмотической резистентности.

Выводы

Установлено, что кроме существенных изменений осмотической резистентности эритроцитов, наблюдающихся после четырех недель хранения (*in vitro*), имеют место существенные изменения параметров механических (фрикционных) свойств поверхностного слоя эритроцитов в течение первых четырех недель.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roback, J. D. Vascular effects of the red blood cell storage lesion / J. D. Roback // Hematology. — 2011. — P. 475–479.
2. Kor, D. J. Red blood cell storage lesion / D. J. Kor, C. M. Van Buskirk, O. Gajic // Bosnian journal of basic medical sciences. — 2009. — Vol. 9, Suppl. 1. — P. S21–S27.
3. Chaudhary, R. Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage / R. Chaudhary, R. Katharia // Blood Transfus. — 2012. — Vol. 10. — P. 59–62.
4. Bessis, M. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale / M. Bessis // Nouv. Rev. Fr. Hemat. — 1972. — Vol. 12, № 6. — P. 721–746.
5. Starodubtseva, M. N. Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy / M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, I. A. Nikitina // Micron. — 2012. — Vol. 43, № 12. — P. 1232–1238.
6. Стародубцева, М. Н. Анализ релаксационных состояний полимеров и биополимеров на основе карт латеральных сил, получаемых методом атомно-силовой микроскопии / М. Н. Стародубцева, Н. И. Егоров // Вестник Фонда фундаментальных исследований. — 2010. — № 4. — С. 51–57.
7. Optical tweezers as a new biomedical tool to measure zeta potential of stored red blood cells / D. C. N. Silva [et al.] // PLoS one. — 2012. — Vol. 7, № 2. — P. e31778.
8. Evolution of adverse changes in stored RBCs / E. Bennett-Guerrero [et al.] // Proc. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104, № 43. — P. 17063–17068.

УДК 546.173+546.175]:[616.15:616.12-005.4

КОНЦЕНТРАЦИЯ НИТРИТ- И НИТРАТ-ИОНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Стародубцева М. Н., Серикова Е. В., Липская Е. А., Воронаев Е. В.

**Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь**

Введение

Множество факторов вызывают развитие сердечно-сосудистой патологии. Все они запускают один или два основных механизма, вовлекающих в патологический процесс три типа клеток: эндотелиальные, мышечные и клетки крови (в основном лейкоциты).