

УДК 537.533.35:616.155.1-092.9-046.55

DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-3-13>



Влияние рентгеновского излучения на наномеханические свойства поверхности эритроцитов крыс при гиперхолестериновой диете

© И. А. Челнокова¹, А. Н. Шклярва¹, Е. В. Цуканова¹,
И. А. Никитина², М. Н. Стародубцева^{1,2}

¹Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель, Беларусь

²Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) выявить изменения параметров структурных и наномеханических свойств поверхности эритроцитов, вызванные действием рентгеновского излучения *in vitro* на цельную кровь крыс при гиперхолестериновой диете.

Материалы и методы. Кровь самцов крыс линии Wistar, содержащихся в течение двух месяцев на гиперхолестериновой диете, подвергали действию рентгеновского излучения (320 кВ) в дозах 1 и 100 Гр. Структурные, упругие и адгезионные свойства поверхности изолированных и фиксированных раствором глутарового альдегида эритроцитов на наномасштабе изучали с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Resolve в режиме записи PeakForceQNM на воздухе.

Результаты. Установлено увеличение жесткости поверхности эритроцитов при дозе 1 Гр и ее снижение практически до контрольных значений при дозе 100 Гр, которое сопровождалось увеличением размера средней ячейки мембранного скелета эритроцитов. При этом существенных изменений морфологии, адгезионных свойств и шероховатости рельефа эритроцитов не обнаружено.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что рентгеновское излучение (1–100 Гр) вызывает дозозависимую реорганизацию структуры и изменение жесткости поверхностного слоя эритроцитов на наномасштабе без изменения морфологии клеток у крыс на гиперхолестериновой диете.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, ионизирующее излучение, адгезия, модуль упругости, свойства поверхности, эритроциты.

Вклад авторов. Челнокова И.А., Шклярва А.Н., Цуканова Е.В., Никитина И.А., Стародубцева М.Н.: концепция и дизайн исследования, сбор материала и создание данных, получение экспериментальных данных, статистическая обработка, редактирование, обсуждение данных, обзор публикаций по теме статьи, утверждение рукописи для публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнялась в рамках Государственной программы научных исследований на 2021–2025 гг. «Природные ресурсы и окружающая среда», подпрограмма 3 «Радиация и биологические системы» в рамках задания «Природные ресурсы и окружающая среда 3.01» «Исследование».

влияния ионизирующего излучения в широком диапазоне доз и при вариабельности характеристик излучения на разных уровнях организации живого организма» (№ ГР 20210231).

Для цитирования: Челнокова ИА, Шклярва АН, Цуканова ЕВ, Никитина ИА, Стародубцева МН. Влияние рентгеновского излучения на наномеханические свойства поверхности эритроцитов крыс при гиперхолестериновой диете. *Проблемы здоровья и экологии*. 2021;18(3):105–115. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-3-13>

Effect of X-ray radiation on the nanomechanical properties of the erythrocyte surface of rats on a high-cholesterol diet

© Irina A. Chelnokova¹, Nastassia M. Shkliarava¹, Alena U. Tsukanava¹,
Irina A. Nikitina², Maria N. Starodubtseva^{1,2}

¹Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus

²Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

ABSTRACT

Objective. To reveal changes in the structural and nanomechanical properties of the erythrocyte surface caused by the action of X-ray radiation *in vitro* on the whole blood of rats on a high-cholesterol diet using the method of atomic-force microscopy.

Materials and methods. The blood of male Wistar rats being on a high-cholesterol diet for two months was exposed to X-ray radiation (320 kV) at doses of 1 and 100 Gy. The structural, elastic and adhesive properties of the surface of isolated and glutaraldehyde-fixed erythrocytes at the nanoscale were studied using the atomic-force microscope BioScope Resolve in PeakForce QNM mode in air.

Results. The study has identified an increase in the stiffness of the erythrocyte surface at a dose of 1 Gy and its decrease to almost control values at a dose of 100 Gy, which was accompanied by an increase in the size of the average cell of the erythrocyte membrane skeleton. At the same time, no significant changes in the morphology, adhesive properties and roughness of the relief of erythrocytes have been found.

Conclusion. The obtained data indicate that X-ray radiation (1–100 Gy) induces the dose-depending reorganization of the structure and changes in the stiffness of the erythrocyte surface layer at the nanoscale without changing the cell morphology for rats on a high-cholesterol diet.

Keywords: atomic-force microscopy, ionizing radiation, adhesion, elastic modulus, surface properties, erythrocytes.

Author contributions. Chelnokova I.A., Shkliarava N.M., Tsukanava A.U., Nikitina I.A., Starodubtseva M.N.: research concept and design, material collection and data creation, experimental data acquisition, statistical processing, editing, data discussion, review of publications on the topic of the article, approval of the manuscript for publication.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was carried out within the framework of the State Program of Scientific Research for 2021–2025 «Natural Resources and the Environment», subprogram 3 «Radiation and biological systems» within the framework of the task «Natural Resources and the Environment 3.01» «Variability of radiation characteristics at different levels of organization of a living organism» (No. GR 20210231).

For citation: Chelnokova IA, Shkliarava NM, Tsukanava AU, Nikitina IA, Starodubtseva MN. Effect of X-ray radiation on the nanomechanical properties of the erythrocyte surface of rats on a high-cholesterol diet. *Health and Ecology Issues*. 2021;18(3):105–115. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-3-13>

Введение

Клеточная мембрана участвует практически во всех взаимодействиях клетки с окружающей средой. Она характеризуется сложным молекулярным строением и согласованным динамическим взаимодействием между ее отдельными компонентами: фосфолипидами, холестерином, гликолипидами, различными белками, углеводами, молекулами воды, ионами металлов и неорганических солей. Состояние клеточной мембраны определяется целым рядом внешних и внутренних биохимических и биофизических факторов [1–3].

Механические свойства являются одними из важных свойств клеточной мембраны. Параметры механических свойств зависят от химического состава и пространственной структуры клеточной мембраны [4, 5] и изменяются при действии разных факторов [3]. Химический состав мембраны клетки определяется соотношением между различными классами молекул, образующих липидный бислой и встроенными в него молекулами белка. К основной фракции мембранных липидов, наряду с фосфолипидами и гликолипидами, относят холестерол. Данное вещество является высокомолекулярным спиртом, играющим ключевую роль

в поддержании физических свойств мембраны и всей структуры поверхности клетки посредством взаимодействия как с другими липидами, так и с белками. Степень насыщенности клеточной мембраны холестерином определяет организацию липидного бислоя и, как следствие, влияет на ее механические свойства [6]. Содержание холестерина в крови и в мембране клеток меняется при диете с высоким содержанием липидов [7]. Такая диета не только повышает риски развития ожирения, но влияет, например, на морфологию основных клеток крови — эритроцитов посредством изменения липидного спектра клеточной мембраны [8, 9].

Механические свойства мембран эритроцитов определяются не только липидным бислоем, но и нековалентно связанным с ним спектрин-актиновым цитоскелетом, а также другими мембранными белками [2, 10]. Изменение механических свойств клеточной мембраны эритроцитов наблюдается при ряде патологий: серповидно-клеточной и железодефицитной анемиях, α -талассемии и др. [3, 11]. В ряде случаев изменение механических свойств, в частности повышение жесткости мембран эритроцитов, снижает их способности к деформации, тем самым уменьшает время циркуляции клеток в кровотоке [11].

Изменение механических свойств эритроцитов может способствовать развитию ряда заболеваний легких, сердца и почек [4, 6, 7, 9]. По мнению некоторых авторов, увеличение жесткости мембран эритроцитов при старении и развитии патологических состояний обусловлено ковалентными взаимодействиями между гемоглобином и спектрином [12].

Ионизирующее излучение может модифицировать структуру белков, включая белки цитоскелета. По данным Gwozdziński K. [13], спектрин, являясь наиболее радиочувствительным мембранным белком эритроцитов, способен подвергаться фрагментации и агрегации при воздействии ионизирующего излучения. Денатурация мембранных белков, вызванная действием γ -излучения, приводит к изменению таких механических параметров мембраны эритроцитов, как ее текучесть, модуль упругости и др. [14, 15, 16].

Механические свойства поверхности эритроцитов на наномасштабе и их изменения, вызванные действием ионизирующего излучения, можно оценить с помощью методов АСМ и использовать эти данные в качестве раннего диагностического маркера радиационно-индуцированной патологии.

Известно, что для получения качественных изображений при проведении рентгенологических исследований у пациентов с ожирением необходимо увеличение дозы рентгеновского излучения в сравнении с дозой для пациентов с нормальной массой тела [30]. Поэтому с практической точки зрения важно знать особенности действия рентгеновского излучения на поверхность клетки при повышении уровня холестерина в крови вследствие гиперхолестериновой диеты для планирования лучевого воздействия на пациентов с нарушением липидного обмена.

Цель исследования

Методом АСМ выявить изменения параметров структурных и наномеханических свойств поверхности эритроцитов, вызванные действием рентгеновского излучения *in vitro* на цельную кровь крыс при гиперхолестериновой диете.

Материалы и методы

До начала эксперимента было получено одобрение комитета по этике УО «Гомельский государственный медицинский университет» на проведение исследования (протокол № 2 от 24.03.2021 г.).

Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г.

Животные содержались в стационарных условиях вивария государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси» на полноценном стандартном пищевом рационе и со свободным доступом к воде, на 12/12-часовом режиме освещения и темноты, согласно установленным нормам. За 2 мес. до проведения эксперимента крысы содержались на гиперхолестериновой диете (к основному корму для 4 самцов добавляли ежедневно 10 г жира свиного перетопленного и желток одного куриного яйца).

Кровь самцов крыс линии Wistar (возрастом 9 мес., средняя масса животных — 500 г) объемом по 5 мл отбирали из воротной вены печени на фоне глубокого эфирного наркоза и помещали в пробирки с 3,2 % раствором 2-замещенного цитрата натрия в соотношении 9:1. Опытный образец объемом 2 мл облучали рентгеновским излучением на рентгеновском аппарате биологического назначения X-Rad 320 Precision X-ray Inc (напряжение на трубке — 320 кВ, мощность дозы — 98,8 сГр/мин, фильтр № 1 (2 мм Al) расстояние до объекта — 40 см) в дозах 1 и 100 Гр. Эритроциты осаждались центрифугированием в течение 10 мин при 300 g с последующей фиксацией 1 % глутаровым альдегидом в течение 15 мин при 37 °С с последующей двукратной отмывкой фосфатно-солевым буфером и дистиллированной водой. Фиксированные эритроциты наносили на стекла с адгезивным покрытием и высушивали при комнатных условиях.

Оценку механических свойств поверхностного слоя проводили с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Resolve в режиме записи PeakForceQNM in Air на воздухе иглой-зондом SCANASYST-AIR с радиусом закругления 2 нм с пиковой нагрузкой 500 пН. В каждой точке скана (250 нм × 250 нм, 256 × 256 пикселей, $f = 0,5$ Гц, F (пиковая) = 500 пН) автоматически проводилась запись силовой кривой, по параметрам которой в выбранной точке оценивалась сила адгезии и модуль Юнга.

Обработка полученных сканов проводилась в программе NanoScope Analysis 1.9. Определяли шероховатость (R_q) АСМ-изобра-

жений, полученных по каналу Height sensor. Пространственный период (T) оценивали с помощью построения кривых спектральной плотности (опция Power Spectral Density) для карт сил адгезии, по кривым определяли частоту, соответствующую ее максимуму, которую затем переводили в пространственный период (в нм).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы R-Studio и online статистического калькулятора Statistical Kingdom (<https://www.statskingdom.com>). Полученные данные проверялись на соответствие нормальному распределению методом Шапиро — Уилка. Данные представлены либо как среднее выборочное и границы 95% доверительного интервала ($M \pm DM$), либо медиана и границы интерквартильного интервала ($Me (LQ; UQ)$). Для проверки значимости различия между средними (средними выборочными или медианами) использовались методы одномерного дисперсионного анализа: критерий ANOVA и критерий Краскела — Уоллиса с поправкой Бонферрони.

Результаты и обсуждение

При гиперхолестериновой диете происходит изменение липидного состава мембран эритроцитов, что влияет как на механические свойства клеток, так и на их морфологию. Заболевания печени являются наиболее распространенными причинами изменения формы эритроцитов, вызванного липидами, из-за их широкого влияния на метаболизм

фосфолипидов и концентрацию фосфолипидов в плазме. Наиболее распространенными аномалиями формы эритроцитов при заболеваниях печени являются эхиноциты и акантоциты. Эти клетки образуются, когда мембраны эритроцитов содержат избыток холестерина по сравнению с фосфолипидами. Мишеневидные клетки (кодоциты) также могут наблюдаться при заболевании печени. Эта морфологическая форма является результатом избыточного накопления как холестерина, так и фосфолипидов и образуется позже в ходе развития заболевания (чем акантоциты) из-за более медленной скорости обмена фосфолипидов (по сравнению с холестерином). Мишеневидные эритроциты на световых микрофотографиях выглядят как клетки с бледной тонкой внешней частью и утолщением в центре, а на электроннограммах эти клетки выглядят как шляпы с полями (рисунок 1, б). В нашем опыте в популяции эритроцитов крови крыс, содержащихся на гиперхолестериновой диете в течение двух месяцев, наблюдалось наличие около 20 % аномальных форм (таблица 1). Среди аномальных форм были выделены: стоматоциты, кодоциты, эхиноциты (начальная стадия), сфероциты и неклассифицированные формы (около 4–8 % в зависимости от образца). На рисунке 1 представлены для сравнения трехмерные топографические изображения дискоидной и мишеневидной форм эритроцитов крысы.

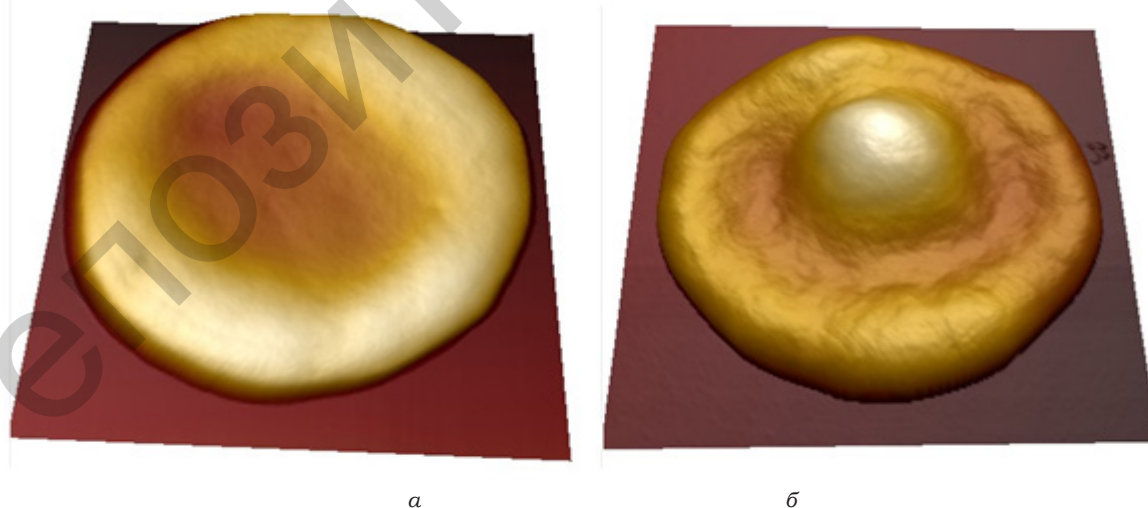


Рисунок 1. Трехмерные АСМ-изображения дискоидной (а) и мишеневидной (б) морфологических форм эритроцитов крыс, содержащихся на гиперхолестериновой диете

Размеры области сканирования: 6,7 мкм × 6,7 мкм (а), 7,0 мкм × 7,0 мкм (б)

Figure 1. Three-dimensional AFM images of the discoid (a) and target-like (b) morphological forms of the erythrocytes of the rats on a high-cholesterol diet

The scan sizes are 6.7 μm × 6.7 μm (a), 7.0 μm × 7.0 μm (b)

Таблица 1. Морфологические формы эритроцитов (в %) в контрольных и опытных образцах крови крыс, содержащихся на гиперхолестериновой диете

Table 1. Morphological forms of erythrocytes (%) in the control and experimental blood samples of the rats on a high-cholesterol diet

Виды эритроцитов	Контроль	1 Гр	100 Гр
Нормоциты	72,11 ± 7,25	87,30 ± 4,75	73,15 ± 8,36
Стоматоциты	4,08 ± 3,20	2,12 ± 2,05	2,78 ± 3,10
Кодоциты	4,76 ± 3,44	2,12 ± 2,05	5,56 ± 4,32
Эхиноциты I	4,76 ± 3,44	2,12 ± 2,05	2,78 ± 3,09
Сфероциты	5,44 ± 3,66	1,59 ± 1,78	11,11 ± 5,93
Прочие формы	8,84 ± 4,59	4,76 ± 3,04	4,63 ± 3,96

Данные представлены как средневыборочное и границы 95% доверительного интервала

В нашем опыте не обнаружено изменение соотношения разных морфологических форм эритроцитов в крови крыс при гиперхолестериновой диете после облучения их цельной крови *in vitro* рентгеновским излучением в дозах 1 и 100 Гр (таблица 1). Полученные результаты подтверждают данные многолетних исследований, свидетельствующие об отсутствии значительных изменений параметров морфологии эритроцитов при облучении ионизирующим излучением с

дозой до 200 Гр [17]. Для дальнейшего анализа параметров структурных и наномеханических свойств поверхности эритроцитов в нашей работе были выбраны дискоциты. По данным АСМ были измерены диаметр (D) и высота (h) дискоцитов, включенных в исследование (таблица 2). Не было обнаружено статистически значимых различий ($p > 0,05$, критерий ANOVA) в этих морфологических параметрах при облучении крови крыс рентгеновским излучением в разных дозах.

Таблица 2. Диаметр и высота эритроцитов контрольных и облученных образцов крови крыс, содержащихся на гиперхолестериновой диете

Table 2. Diameter and heights of erythrocytes of control and irradiated blood samples of the rats on a high-cholesterol diet

Показатель	Контроль	1 Гр	100 Гр
D, мкм	6,28 (5,89; 6,39)	5,89 (5,46; 6,23)	5,68 (5,58; 5,88)
h max, мкм	0,71 (0,58; 0,98)	0,56 (0,53; 0,70)	0,63 (0,55; 0,78)* ($p < 0,02$)
h min, мкм	0,55 (0,41; 0,72)	0,51 (0,45; 0,54)	0,62 (0,50; 0,64)

Данные представлены в виде медианы и границ интерквартильного интервала (Me (LQ; UQ))

Мы записали и изучили параметры АСМ-изображений участков поверхности эритроцитов размером 250 нм × 250 нм (рисунок 2). Такие малые участки поверхности клеток имеют размеры, сравнимые с пределом разрешения светового микроскопа, и не видны с помощью классических методов световой микроскопии.

С помощью непараметрического аналога критерия ANOVA (критерия Краскала — Уоллиса) установлено существенное влияние дозы рентгеновского излучения при облучении цельной крови животных при гиперхолестериновой диете на упругие свойства (модуль упругости) поверхности их эритроцитов ($H = 22,5145$; $p = 0,00001$). Так, после облучения крови в дозе 1 Гр имеет место увеличение жесткости поверхности эритроцитов (поправка Бонферрони, $p = 0,009$), а увеличение дозы до

100 Гр снижает увеличенную жесткость клеток практически до значений, характерных для контрольных клеток (поправка Бонферрони, $p = 0,000001$) (рисунок 3, а). Похожая тенденция, наблюдаемая для средних значений сил адгезии для тех же участков поверхности эритроцитов (рисунок 3, б), не находит подтверждения при проведении статистического анализа с использованием критерия Краскала — Уоллиса ($H = 3,4786$; $p = 0,17760$).

Механические свойства поверхности эритроцитов определяются структурой поверхностного слоя клеток, который включает в себя гликокаликс, плазмалемму и актин-спектриновый мембранный скелет. При химической фиксации структур эритроцитов раствором глутарового альдегида происходит образование поперечных сшивок между белками цитоскелета, приводящее как к увеличению жесткости, так и к изменению

топографии поверхности клеток. При этом в местах прикрепления мембранного скелета к плазмалемме поверхность эритроцитов вытягивается вглубь пространства клетки, образуя структуры, контуры которых харак-

теризуют пространственную структуру актин-спектриновой сети. Эта ячеистая сеть наблюдается на всех АСМ-изображениях поверхности эритроцитов, но особенно ясно на картах сил адгезии (рисунок 2).

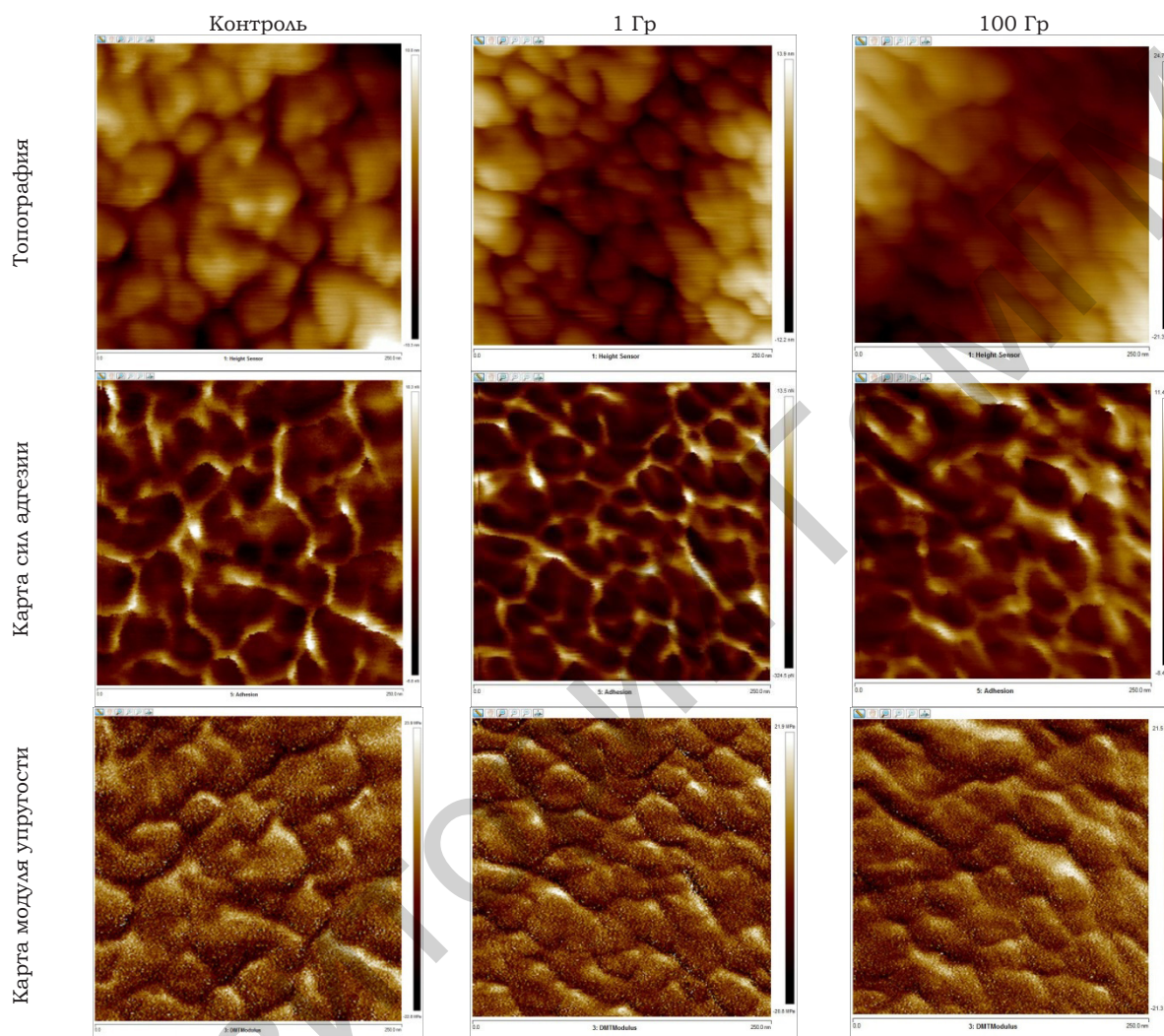


Рисунок 2. Типичные АСМ-изображения наномасштабных участков поверхности дискоцитов контрольного и опытных образцов крови крыс, содержащихся на гиперхолестериновой диете.

Размер области сканирования: 250 нм × 250 нм, разрешение: 256 × 256 пикселей

Figure 2. Typical AFM images of the nanoscale areas of the discocyte surface of the control and experimental blood samples of the rats on a high-cholesterol diet.

The scanned area size is 250 nm × 250 nm and the resolution is 256 × 256 pixels.

Особенности структуры поверхности эритроцитов можно описать такими параметрами, как шероховатость и пространственный период. Шероховатость характеризует «вертикальную» (перпендикулярную плоскости мембраны) структуру поверхности эритроцитов, а пространственный период — «латеральную» (в плоскости мембраны) структуру поверхности эритроцитов.

Параметр шероховатости является чувствительным количественным показателем

состояния клеточной мембраны [24, 25]. Значения параметра шероховатости характеризуются высокой вариабельностью. В частности, они зависят от масштаба сканирования, т. е. от размеров анализируемого участка поверхности. С увеличением размеров участка поверхности шероховатость увеличивается [24]. Из литературных данных известно, что шероховатость поверхности эритроцитов может увеличиваться с течением времени после облучения [26, 27]. Нами не выявлено

изменение параметра шероховатости топографических изображений малых (250 нм × 250 нм) участков поверхности эритроцитов

после облучения крови крыс рентгеновским излучением (рисунок 3, в).

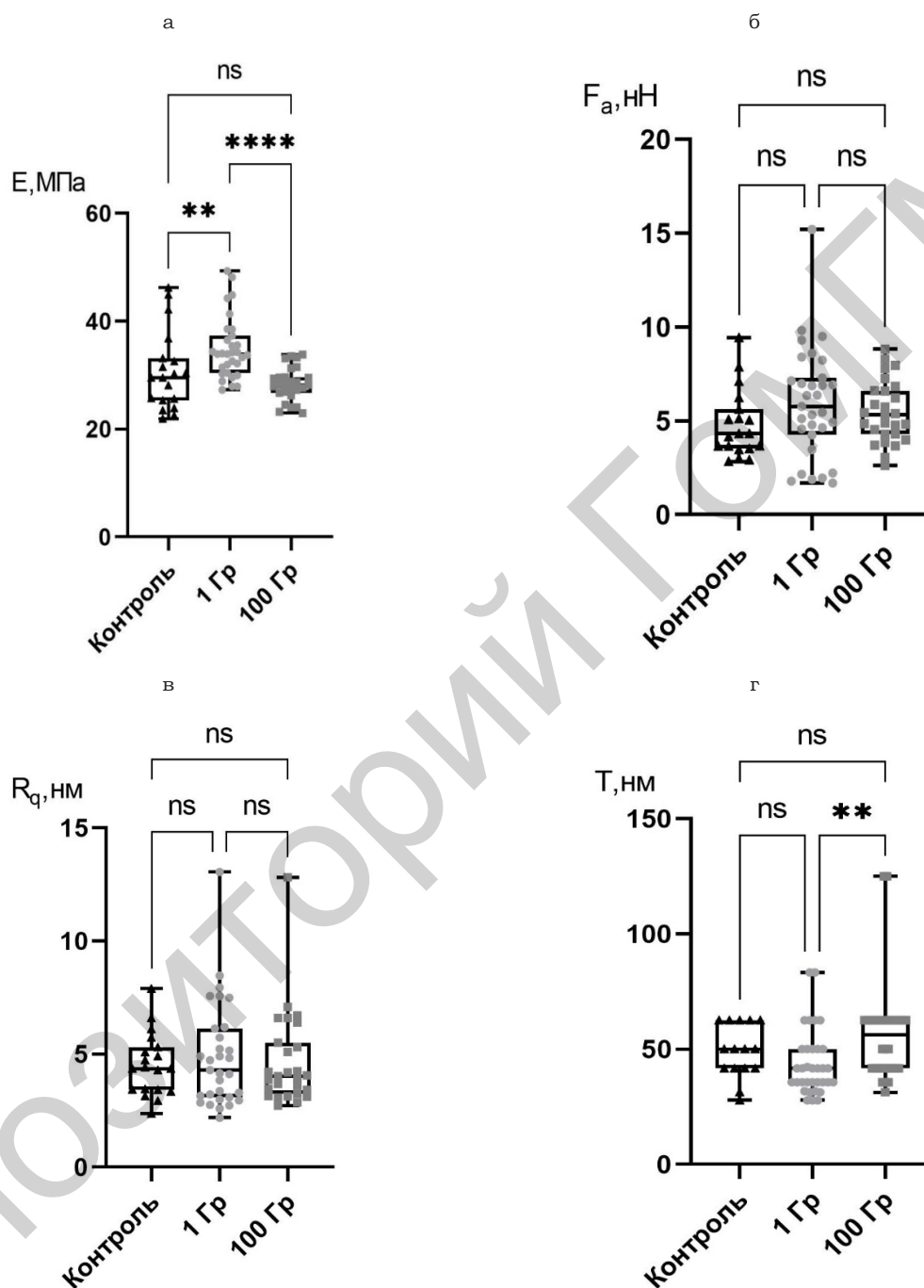


Рисунок 3. Влияние дозы рентгеновского излучения на параметры структурных и наномеханических свойств участков поверхности эритроцитов крыс при гиперхолестериновой диете: E — модуль упругости;

F_a — сила адгезии; R_q — шероховатость топографических карт; T — пространственный период.

Данные представлены как медиана, интерквартильный интервал, максимальное и минимальное значения, а также все медианные значения, рассчитанные для отдельных сканов, включенных в выборки. Непараметрический критерий Краскелла — Уоллиса, поправка Бонферрони: ns - $p > 0,01667$, ** $p < 0,00100$, **** $p < 0,00001$

Figure 3. Effect of the X-ray dose on the parameters of the structural and nanomechanical properties of the erythrocyte surface areas of the rats on a high-cholesterol diet

E is the elastic modulus, F_a is the adhesion force, R_q is the roughness of topographic maps, T is the spatial period. Data are presented as the Median, Interquartile Range, Maximum and Minimum values, as well as all median values calculated for individual scans included in the samples. Nonparametric Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction:

ns - $p > 0.01667$, ** $p < 0.00100$, **** $p < 0.00001$

Пространственная структура двумерной сети, какой и является мембранный скелет эритроцитов, описывается средним размером ячейки этой сети. Оценить этот параметр можно применив преобразование Фурье к АСМ-изображению поверхности (в нашем случае, к карте сил адгезии) и определив основную частоту (гармонику) в полученном спектре. Основную частоту можно перевести в пространственный период, значение которого и является средним размером ячейки мембранного скелета эритроцитов. Оцененный таким образом пространственный период карт сил адгезии для участков поверхности эритроцитов разных выборок представлен на рисунке 3, г.

По данным литературных источников, в полностью растянутом состоянии актин-спектриновой сети эритроцитов молекула спектрина имеет длину около 190 нм [18, 19]. Однако спектриновые филаменты нативного нерастянутого мембранного скелета эритроцитов меньше в длину. Их длина меньше 60–70 нм [19]. По данным А. Nans с соавторами, среднее расстояние между точками прикрепления актин-спектриновой сети к мембране эритроцитов в норме приблизительно равны $46,0 \pm 16$ нм [20]. Эти значения хорошо совпадают с полученными нами данными для эритроцитов крысы при гиперхолестериновой диете контрольных образцов.

В литературных источниках имеются данные об уменьшении модуля упругости эритроцитов человека, измеренного с помощью АСМ, с увеличением дозы рентгеновского излучения до 2 Гр [21]. Кроме того, в опыте с эритроцитами хомячков при облучении *in vivo* рентгеновским излучением в дозе 2–12 Гр также было обнаружено уменьшение жесткости эритроцитов и уменьшение процентного содержания в них цитоскелетного белка — альфа-спектрина, что свидетельствует о структурных перестройках поверхностного слоя эритроцитов на нано- и микромасштабном уровне [4, 28]. В наших опытах с кровью крыс, содержащихся на гиперхолестериновой диете, при воздействии рентгеновского излучения *in vitro* получено увеличение жесткости поверхности эритроцитов при дозе 1 Гр и уменьшение жесткости поверхности клеток при увеличении дозы с 1 до 100 Гр. Второе изменение (уменьшение) жесткости поверхности эритроцитов при увеличении дозы рентгеновского излучения соответствует данным литературных источников [28]. При этом данное уменьшение жесткости поверхности клеток

сопровождается уменьшением размеров ячейки мембранного скелета эритроцитов, о чем свидетельствуют результаты анализа пространственного периода карт сил адгезии участков поверхности эритроцитов. Именно «расслабление», потеря порядка в структуре актин-спектриновой сети и/или уменьшение мест прикрепления актин-спектриновой сети к плазмалемме являются механизмами, объясняющими уменьшение жесткости поверхности эритроцитов при действии рентгеновского излучения. В нативной мембране тетрамеры спектрина являются основным структурным компонентом мембранного скелета эритроцитов, поддерживающими ее механическую стабильность. Разрыв связей между спектрином, анкирином и белком полосы 3 приводит к диссоциации тетрамеров спектрина до димеров. Доля димеров в норме не превышает 10 % [29]. Нарушение динамического баланса между тетрамерными и димерными формами спектрина, вызванное действием ионизирующего излучения, приводит к изменениям в мембранном скелете эритроцитов с разной степенью выраженности [28].

Увеличение жесткости поверхности эритроцитов при дозе облучения 1 Гр может соответствовать сгущению сети мембранного скелета эритроцитов крысы при гиперхолестериновой диете, однако данные статистического анализа пространственного периода не позволяют пока сделать это утверждение.

Заключение

Установлено повышение жесткости поверхности эритроцитов крысы при гиперхолестериновой диете после облучения цельной крови *in vitro* в дозе 1 Гр и ее снижение практически до контрольных значений после облучения в дозе 100 Гр, которое сопровождалось увеличением размера средней ячейки мембранного скелета эритроцитов. При этом существенных изменений морфологии, адгезионных свойств и шероховатости рельефа эритроцитов не обнаружено.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что рентгеновское излучение (1–100 Гр) вызывает реорганизацию структуры и изменение жесткости поверхностного слоя эритроцитов на наномасштабе без изменения морфологии клеток у крыс на гиперхолестериновой диете. Причем механизмы радиационно-индуцированных изменений свойств поверхностного слоя клеток, включая их мембранный скелет, зависят от полученной кровью дозы рентгеновского излучения.

Список литературы

1. Sugihara K. Self-assembled lipid structures as model systems for studying electrical and mechanical properties of cell membranes. *Chimia International Journal for Chemistry*. 2016;70(11):805-809.
DOI: <https://doi.org/10.2533/chimia.2016.805>
2. Shi Y, Cai M, Zhou L, Wang H. The structure and function of cell membranes studied by atomic force microscopy. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;73:31-44.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.012>
3. Jani VP, Lucas A, Jani VP, Munoz C, Williams AT, Ortiz D, et al. Numerical model for the determination of erythrocyte mechanical properties and wall shear stress in vivo from intravital microscopy. *Front Physiol*. 2020;10:1562.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01562>
4. Shi Y, Cai M, Zhou L, Wang H. Measurement of mechanical properties of naked cell membranes using atomic force microscope puncture test. *Talanta*. 2020 Apr;210:120637.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120637>
5. Steinkühler J, Sezgin E, Urbančič I, Eggeling C, Dimova R. Mechanical properties of plasma membrane vesicles correlate with lipid order, viscosity and cell density. *Commun Biol*. 2019;2:337.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0583-3>
6. Molugu TR, Brown MF. Cholesterol effects on the physical properties of lipid membranes viewed by solid-state nmr spectroscopy. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1115:99-133.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-04278-3_5
7. Wang L, Xu F, Zhang XJ, Jin RM, Li X. Effect of high-fat diet on cholesterol metabolism in rats and its association with Na⁺/K⁺-ATPase/Src/pERK signaling pathway. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2015;35(4):490-494.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1458-6>
8. Široká M, Franco C, Guľašová Z, et al. Nuclear factor-κB and nitric oxide synthases in red blood cells: good or bad in obesity? A preliminary study. *Eur J Histochem*. 2020;64(1):3081.
DOI: <https://doi.org/10.4081/ejh.2020.3081>
9. Kim OY, Lee SM, An WS. Impact of blood or erythrocyte membrane fatty acids for disease risk prediction: focusing on cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Nutrients*. 2018;10(10):1454.
DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10101454>
10. Schillers H. Measuring the elastic properties of living cells. *Methods Mol Biol*. 2019;1886:291-313.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5_17
11. Yip R, Mohandas N, Clark MR, Jain S, Shohet SB, Dallman PR. Red cell membrane stiffness in iron deficiency. *Blood*. 1983;62(1):99-106.
DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V62.1.99.99>
12. Fortier N, Snyder LM, Garver F, Kiefer C, McKenney J, Mohandas N. The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood*. 1988;71(5):1427-1431.
13. Gwoździński K. Ionizing radiation-induced structural modification of human red blood cells. *Radiat Environ Biophys*. 1991;30(1):45-52.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01595573>
14. Mahmoud SS, El-Sakhawy E, Abdel-Fatah ES, Kelany AM, Rizk RM. Effects of acute low doses of gamma-radiation on erythrocytes membrane. *Radiat Environ Biophys*. 2011;50(1):189-198.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0333-x>
15. Spyratou E, Dilvoi M, Patatoukas G, Platoni K, Makropoulou M, Efstathopoulos EP. Probing the effects of ionizing radiation on young's modulus of human erythrocytes cytoskeleton using atomic force microscopy. *J Med Phys*. 2019;44(2):113-117.
DOI: https://doi.org/10.4103/jmp.JMP_95_18
16. Heydarian A, Khorramymehr S, Vasaghi-Gharamaleki B. Short-term effects of X-ray on viscoelastic properties of epithelial cells. *Proc Inst Mech Eng H*. 2019;233(5):535-543.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0954411919837563>
17. Effects of ionizing radiation on blood and blood components: A survey. Iaea-tecdoc-934. 1997;28(13):42. [date of access 2021 July 8]. Available from: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_934_prn.pdf
18. Liu SC, Derick LH, Palek J. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol*. 1987; 104(3):527-536.
DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.104.3.527>
19. Lux SE 4th. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016;127(2):187-199.
DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>
20. Nans A, Mohandas N, Stokes DL. Native ultra-structure of the red cell cytoskeleton by cryo-electron tomography. *Biophys J*. 2011;101(10):2341-2350.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.050>
21. Bitler A, Dover RS, Shai Y. Fractal properties of cell surface structures: A view from AFM. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2018;73:64-70.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.034>
22. Messmann, R., Gannon, S., Sarnaik, S., Johnson, R.M. Mechanical properties of sickle cell membranes. *Blood*. 1990;75(8):1711-1717.
23. Heydarian A, Khorramymehr S, Vasaghi-Gharamaleki B. Short-term effects of X-ray on viscoelastic properties of epithelial cells. *Proc Inst Mech Eng H*. 2019;233(5):535-543.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0954411919837563>
24. Antonio, P.D., Lasalvia, M., Perna, G., Capozzi, V. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(12):3141-3148.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.08.001>
25. Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, et al. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(5):1268-1276.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.01.014>
26. Walpurgis K, Kohler M, Thomas A, et al. Effects of gamma irradiation and 15 days of subsequent ex vivo storage on the cytosolic red blood cell proteome analyzed by 2D-DIGE and Orbitrap MS. *Proteomics Clin Appl*. 2013;7(7-8):561-570.
DOI: <https://doi.org/10.1002/prca.201300009>
27. López-Canizales AM, Angulo-Molina A, Garibay-Escobar A, et al. Nanoscale Changes on RBC Membrane Induced by Storage and Ionizing Radiation: A Mini-Review. *Front Physiol*. 2021;12:669455.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.669455>
28. Zhang B, Liu B, Zhang H, Wang J. Erythrocyte stiffness during morphological remodeling induced by carbon ion radiation. *PLoS One*. 2014;9(11):e112624.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112624>
29. Blanc L, Salomao M, Guo X, An X, Gratzner W, Mohandas N. Control of erythrocyte membrane-skeletal cohesion by the spectrin-membrane linkage. *Biochemistry*. 2010;49(21):4516-4523.
DOI: <https://doi.org/10.1021/bi1003684>
30. Madder RD, VanOosterhout S, Mulder A, Ten Brock T, Clarey AT, Parker JL, Jacoby ME. Patient body mass index and physician radiation dose during coronary angiography. *Circ Cardiovasc Interv*. 2019;12(1):e006823.

References

1. Sugihara K. Self-assembled lipid structures as model systems for studying electrical and mechanical properties of cell membranes. *Chimia International Journal for Chemistry*. 2016;70(11):805-809. DOI: <https://doi.org/10.2533/chimia.2016.805>
2. Shi Y, Cai M, Zhou L, Wang H. The structure and function of cell membranes studied by atomic force microscopy. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;73:31-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.012>
3. Jani VP, Lucas A, Jani VP, Munoz C, Williams AT, Ortiz D et al. Numerical model for the determination of erythrocyte mechanical properties and wall shear stress in vivo from intravital microscopy. *Front Physiol*. 2020;10:1562. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01562>
4. Shi Y, Cai M, Zhou L, Wang H. Measurement of mechanical properties of naked cell membranes using atomic force microscope puncture test. *Talanta*. 2020 Apr;210:120637. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120637>
5. Steinkühler J, Sezgin E, Urbančić I, Eggeling C, Dimova R. Mechanical properties of plasma membrane vesicles correlate with lipid order, viscosity and cell density. *Commun Biol*. 2019;2:337. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0583-3>
6. Molugu TR, Brown MF. Cholesterol effects on the physical properties of lipid membranes viewed by solid-state nmr spectroscopy. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1115:99-133. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-04278-35>
7. Wang L, Xu F, Zhang XJ, Jin RM, Li X. Effect of high-fat diet on cholesterol metabolism in rats and its association with Na⁺/K⁺-ATPase/Src/pERK signaling pathway. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2015;35(4):490-494. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1458-6>
8. Široká M, Franco C, Guľašová Z, et al. Nuclear factor-κB and nitric oxide synthases in red blood cells: good or bad in obesity? A preliminary study. *Eur J Histochem*. 2020;64(1):3081. DOI: <https://doi.org/10.4081/ejh.2020.3081>
9. Kim OY, Lee SM, An WS. Impact of blood or erythrocyte membrane fatty acids for disease risk prediction: focusing on cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Nutrients*. 2018;10(10):1454. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10101454>
10. Schillers H. Measuring the elastic properties of living cells. *Methods Mol Biol*. 2019;1886:291-313. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-517>
11. Yip R, Mohandas N, Clark MR, Jain S, Shohet SB, Dallman PR. Red cell membrane stiffness in iron deficiency. *Blood*. 1983;62(1):99-106. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V62.1.99.99>
12. Fortier N, Snyder LM, Garver F, Kiefer C, McKenney J, Mohandas N. The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood*. 1988;71(5):1427-1431. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01595573>
13. Gwoździński K. Ionizing radiation-induced structural modification of human red blood cells. *Radiat Environ Biophys*. 1991;30(1):45-52. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01595573>
14. Mahmoud SS, El-Sakhawy E, Abdel-Fatah ES, Kelany AM, Rizk RM. Effects of acute low doses of gamma-radiation on erythrocytes membrane. *Radiat Environ Biophys*. 2011;50(1):189-198. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0333-x>
15. Spyratou E, Dilvoi M, Patatoukas G, Platoni K, Makropoulou M, Efstathopoulos EP. Probing the effects of ionizing radiation on young's modulus of human erythrocytes cytoskeleton using atomic force microscopy. *J Med Phys*. 2019;44(2):113-117. DOI: https://doi.org/10.4103/jmp.JMP_95_18
16. Heydarian A, Khorrammehr S, Vasaghi-Gharamaleki B. Short-term effects of X-ray on viscoelastic properties of epithelial cells. *Proc Inst Mech Eng H*. 2019;233(5):535-543. DOI: <https://doi.org/10.1177/0954411919837563>
17. Effects of ionizing radiation on blood and blood components: A survey. Iaea-tecdoc-934. 1997;28(13):42. [date of access 2021 July 8]. Available from: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_934_prn.pdf
18. Liu SC, Derick LH, Palek J. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol*. 1987;104(3):527-536. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.104.3.527>
19. Lux SE 4th. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016;127(2):187-199. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>
20. Nans A, Mohandas N, Stokes DL. Native ultrastructure of the red cell cytoskeleton by cryo-electron tomography. *Biophys J*. 2011;101(10):2341-2350. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.050>
21. Bitler A, Dover RS, Shai Y. Fractal properties of cell surface structures: A view from AFM. *Semin. Cell Dev Biol*. 2018;73:64-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.034>
22. Messmann, R., Gannon, S., Sarnaik, S., Johnson, R.M. Mechanical properties of sickle cell membranes. *Blood*. 1990;75(8):1711-1717.
23. Heydarian A, Khorrammehr S, Vasaghi-Gharamaleki B. Short-term effects of X-ray on viscoelastic properties of epithelial cells. *Proc Inst Mech Eng H*. 2019;233(5):535-543. DOI: <https://doi.org/10.1177/0954411919837563>
24. Antonio, P.D., Lasalvia, M., Perna, G., Capozzi, V. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(12):3141-3148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.08.001>
25. Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, et al. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(5):1268-1276. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.01.014>
26. Walpurgis K, Kohler M, Thomas A, et al. Effects of gamma irradiation and 15 days of subsequent ex vivo storage on the cytosolic red blood cell proteome analyzed by 2D-DIGE and Orbitrap MS. *Proteomics Clin Appl*. 2013;7(7-8):561-570. DOI: <https://doi.org/10.1002/prca.201300009>
27. López-Canizales AM, Angulo-Molina A, Garibay-Escobar A, et al. Nanoscale Changes on RBC Membrane Induced by Storage and Ionizing Radiation: A Mini-Review. *Front Physiol*. 2021;12:669455. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.669455>
28. Zhang B, Liu B, Zhang H, Wang J. Erythrocyte stiffness during morphological remodeling induced by carbon ion radiation. *PLoS One*. 2014;9(11):e112624. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112624>
29. Blanc L, Salomao M, Guo X, An X, Gratzner W, Mohandas N. Control of erythrocyte membrane-skeletal cohesion by the spectrin-membrane linkage. *Biochemistry*. 2010;49(21):4516-4523. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi1003684>
30. Madder RD, VanOosterhout S, Mulder A, Ten Brock T, Clarey AT, Parker JL, Jacoby ME. Patient body mass index and physician radiation dose during coronary angiography. *Circ Cardiovasc Interv*. 2019;12(1):e006823. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.118.006823>

Информация об авторах / Information about the authors

Челнокова Ирина Александровна, младший научный сотрудник, аспирант лаборатории экспериментальных биологических моделей, ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6812-753X>
e-mail: irenachelnokova@gmail.com

Шклярова Анастасия Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных биологических моделей, ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6365-3856>
e-mail: nastenassa@mail.ru

Цуканова Елена Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных биологических моделей, ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5535-9294>
e-mail: elenatsukanova14@gmail.com

Никитина Ирина Александровна, к.б.н., заведующий кафедрой биологической химии, УО «Гомельский государственный медицинский университет»

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5871-440X>
e-mail: nikkitina@gmail.com

Стародубцева Мария Николаевна, д.б.н., доцент, профессор кафедры медицинской и биологической физики, УО «Гомельский государственный медицинский университет»; главный научный сотрудник лаборатории экспериментальных биологических моделей, ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8516-0884>
e-mail: marvsta@mail.ru

Irina A. Chelnokova, junior researcher, graduate student at the Laboratory of Experimental Biological Models, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6365-3856>
e-mail: irenachelnokova@gmail.com

Nastassia M. Shkliarava, junior researcher at the Laboratory of Experimental Biological Models, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6365-3856>
e-mail: nastenassa@mail.ru

Alena U. Tsukanava, junior researcher at the Laboratory of Experimental Biological Models, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6365-3856>
e-mail: elenatsukanova14@gmail.com

Irina A. Nikitina, PhD (Biol), Head of the Department of Biological Chemistry, Gomel State Medical University

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5871-440X>
e-mail: nikkitina@gmail.com

Maria N. Starodubtseva, DBiolSc, Associate Professor, Professor at the Department of Medical and Biological Physics, Gomel State Medical University, Chief Researcher at the Laboratory of Experimental Biological Models, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8516-0884>
e-mail: marvsta@mail.ru

Corresponding author / Автор, ответственный за переписку

Челнокова Ирина Александровна
e-mail: irenachelnokova@gmail.com

Irina A. Chelnokova
e-mail: irenachelnokova@gmail.com

Received / Поступила в редакцию 09.07.2021

Revised / Поступила после рецензирования 23.08.2021

Accepted / Принята к публикации 20.09.2021