# НАРУШЕНИЯ НАНОСТРУКТУРЫ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНОЙ ЭМУЛЬСИЕЙ

В. В. Мороз, А. М. Черныш, Е. К. Козлова, В. А. Сергунова, О. Е. Гудкова, М. С. Федорова, А. К. Кирсанова, И. С. Новодержкина

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

## Impairments in the Nanostructure of Red Blood Cell Membranes in Acute Blood Loss and Their Correction with Perfluorocarbon Emulsion

V. V. Moroz, A. M. Chernysh, E. K. Kozlova, V. A. Sergunova, O. E. Gudkova, M. S. Fedorova, A. K. Kirsanova, I. S. Novoderzhkina

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Цель работы – изучить нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при кровопотере и методов коррекции мебранных структур с помощью перфторуглеродных эмульсий. Материал и методы. Эксперименты проводили на нелинейных крысах под нембуталовым наркозом. В качестве модели терминального состояния использовали гиповолемическую гипотензию в течение 60-и минут с последующей реинфузией крови, добавлением перфторана или раствора Рингера. Изображения фрагментов структуры поверхности мембран эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа (ACM) «Femtoscan». Проведено 27 опытов, просканировано на ACM 186 клеток, по которым получено изображение трех порядков в количестве 720 сканов. Результаты. В работе представлена динамика изменения параметра h, для различных фаз опыта. Через 5 минут гипотензии h, увеличилась более чем в 4,3 раза, а через 60 минут гипотензии эта величина снизилась до 4,7 нм. Высота второго порядка линейно возрастала на этапах: контроль — 5 минут — 60 минут гипотензии. К 60-й минуте гипотензии высоты I, II порядков были близки. Поверхность III порядка к 5-й минуте гипотензии изменялась слабо — увеличилась в 1,5 раза. Но к 60-й минуте гипотензии изменения тонких структур мембраны стали велики — h<sub>3</sub> увеличилась в 6,3 раза. Выводы. Показано, что кровопотеря вызывает нарушения микроструктуры мембран эритроцитов на всех уровнях ее организации: на уровне 600-1000 нм - «flick», на уровне 150-350 нм - спектриновый матрикс, в диапазоне 30-80 нм - состояние белков band 3. Перфторуглеродная эмульсия «перфторан» оказывает выраженное корректирующее действие на наноструктуру мембран эритроцитов на всех ступенях ее организации, восстанавливая наноструктуру мембран практически до уровня контроля. Ключевые слова: кровопотеря, мембрана эритроцита, наноструктура, атомная силовая микроскопия.

Objective: to study impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and methods to correct the membrane structures with perfluorocarbon emulsion. Materials and methods. Experiments were carried out on Nembutal-anesthesized outbred rats. The model of a terminal state was 60-minute hypotension, followed by blood reinfusion and addition of perfluorane or Ringer's solution. Images of fragments of the red blood cell membrane surface structure were obtained using a Femtoscan atomic force microscope (AFM). Twenty-seven experiments were performed; 186 cells were scanned on the AFM, which provided 720 images of three orders. Results. The paper shows the time course of changes in the index h<sub>i</sub> for different phases of an experiment. After 5-minute hypotension, h<sub>1</sub> increased by more than 4.3 times and after 60-minute hypotension, this value decreased to 4.7 nm. The second-order height rose linearly at the stages: control - at 5 minutes - at 60 minutes of hypotension. At 60 minutes of hypotension, the first- and second-order heights were similar. At 5 minutes of hypotension, the third-order surface slightly changed -- it increased by 1.5-fold. But at 60 minutes of hypotension, the changes in the fine structures of the membrane became great  $-h_3$  increased by 6.3 times. Conclusion. Blood loss has shown to induce impairments in the microstructure of red blood cell membranes at all levels of its organization: flick in the range of 600-1000 nm, spectrin matrix at 150-350 nm, proteins, band 3, at 30-80 nm. The perfluorocarbon emulsion «Perftoran» exerts a pronounced modulatory effect on the red blood cell membrane nanostructure at all steps of its organization, by restoring the membrane nanostructure practically to the control level. Key words: blood loss, red blood cell membrane, nanostructure, atomic force microscopy.

Одной из важных задач реаниматологии является изучение красных клеток крови при кровопотере. Нарушение структурных свойств клеток крови является од-

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Черныш Александр Михайлович E-mail: amchernysh@mail.ru ним из важных патогенетических факторов нарушения реологических свойств крови, а следовательно, и качества периферического кровотока [1]. Эритроциты выбраны в качестве объекта исследования, так как именно они определяют газотранспортную функцию и возникновение гипоксии при кровопотере. Перспективным методом коррекции функционального состояния эритроцитов является введение в кровь перфторуглеродной эмульсии, которая, помимо газотранспортной функции, обладает рядом других эффектов [2, 3]. Корригирующий эффект перфторана изучается с помощью различных методов: анализ биохимических показателей, регистрация реологических свойств эритроцитов, степень их ригидности и др. [4]. Важнейшим показателем функционирования эритроцита является стабильность наноструктуры мембраны на всех уровнях ее организации. Нарушения наноструктуры, как правило, вызывают изменения функций красных клеток крови [5, 6]. Наиболее перспективным методом изучения наноструктуры мембраны является метод сканирующей зондовой микроскопии, в частности, атомной силовой микроскопии [7—10]. Этот метод позволяет регистрировать наноструктуру мембраны в широком диапазоне ее изменений.

Цель работы — изучить нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при кровопотере и методов коррекции мембранных структур с помощью перфторуглеродных эмульсий.

#### Материал и методы

Эксперименты проводили на нелинейных крысах-самцах массой 450 г под нембуталовым наркозом (40 мг/кг внутрибрюшинно). В качестве модели терминального состояния использовали гиповолемическую гипотензию (АД 40 мм рт. ст.) в течение 60-и минут с последующей реинфузией крови, добавлением перфторана или раствора Рингера (1 мл/кг).

До кровопотери вводили гепарин внутривенно (500 МЕ/кг). Кровопотерю проводили из хвостовой артерии. Общий объем кровопотери составлял в среднем 15 мл/кг массы тела. В ходе экспериментов на разных этапах отбирали кровь и формировали монослои эритроцитов. Эксперимент проводился по двум схемам:

введение перфторана в дозе 3 мл/кг после реинфузии крови;

введение раствора Рингера в том же объеме и в те же сроки.

Изображения фрагментов структуры поверхности мембран эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа (ACM) «Femtoscan». В качестве зондов использовали кантилеверы fp C 10S (Super). Число точек сканирования — 512, поля сканирования: 10×10 мкм, 1×1 мкм.

Для формирования критериев количественных оценок изменений микроструктуры мембран, полученные фрагменты изображений поверхностей с помощью пространственного преобразования Фурье разлагали на три порядка, имеющие различные спектральные окна: І порядок —  $L_1$  в диапазоне 600—1000 нм, II порядок —  $L_2$  в диапазоне 150—350 нм, III порядок —  $L_3$  в диапазоне 30—80 нм.

Для устранения артефактов и измерения размеров объектов, полученных на скане, проводили программное отфильтровывание шумов, вычитание плоскости среднего наклона, усреднение по строкам.

Анализировали четыре фазы опытов: первая фаза — контроль, вторая фаза опыта — 5 минут гипотензии, третья фаза — 60 минут гипотензии, четвертая фаза опыта — 3 часа после реинфузии (2 часа после введения перфторана). Для каждой фазы опыта строили изображения фрагментов поверхностей мембран трех порядков, измеряли периоды L<sub>i</sub> и высоты h<sub>i</sub> для каждого порядка данной клетки. Высота h<sub>i</sub> отсчитывалась от средней линии, построенной программой «Femtoscan» (i-1, 2, 3). Методика разложения поверхности мембраны на три порядка подробно описана нами ранее [1, 7, 11].

Статистическую обработку полученных параметров поверхности мембран по их периодам и высотам проводили с помощью программного обеспечения «Origin». В частности,



**Рис. 1. Эритроцит в поле атомного силового микроскопа и его профиль (***a***), после 60 минут гипотензии и его профиль (***б***). Маркеры указывают максимальную и минимальную высоту эритроцита. На трехмерных изображениях показана цветная шкала высот.** 

строили гистограммы высот и периодов поверхностей, рассчитывали ошибки по ансамблям, проверяли значимость различий между результатами на всех фазах эксперимента.

Проведено 27 опытов на нелинейных крысах по острой кровопотере и дальнейшей реинфузии крови с добавлением перфторана или раствора Рингера. В результате было просканировано на ACM 186 клеток размером 10×10 нм, 186 фрагментов со сторонами 1,5×1,5 нм, по которым получено изображение трех порядков в количестве 720 сканов.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 показан внешний вид контрольного эритроцита, его профиль (рис. 1 *a*) и эритроцита после 60 минут гипотензии (рис. 1  $\delta$ ).

В норме диаметр эритроцита составлял 7100 нм. Максимальная высота тора дискоцита — 1500 нм, а высота впадины — 420 нм. После 60 минут гипотензии диаметр эритроцита — 8200 нм, максимальная высота впадины — 410 нм, при этом профиль эритроцита по сравнению с контролем существенно изменен.

Маркер профиля (пунктир на поверхности клетки) на объемном изображении эритроцита (рис. 1  $\delta$ ) проведен таким образом, чтобы показать смещенную впадину эритроцита и оценить ее высоту.

Для объективной оценки изменения параметров мембран, которые происходили на различных фазах опытов, исходные поверхности раскладывались на три порядка, как это описано выше. Высота и период каждого порядка, позволяли получить количественную оценку изменения данного параметра на каждой фазе опыта. На рис. 2 представлены данные отдельного опыта № 14 по всем стадиям эксперимента и по всем порядкам разложения. В частности, объемные изображения фрагментов мембран эритроцита I, II и III порядков для контроля (*a*), 60 минут гипотензии (*б*) и через 2 часа после введения перфторана (*в*). Для каждого фрагмента представлена цветная шкала высот. С целью представления 3D изображений различных порядков на одном рисунке (рис. 2), для цветных шкал высот необходимо было выбрать разные масштабы. Так, например, для первого порядка это 5 нм, а для 3-го порядка — 4 нм. Для I порядка (60 минут гипотензии) шкала имеет 12 нм, а для такого же I порядка, но после 2-х часов введения перфторана — 2,0 нм.

В контроле максимальная высота I порядка — 1,8 нм, II порядка — 1,1 нм, III порядка — 0,1 нм. Эти высот ты показаны на гистограмме абсолютных высот отдельно взятого опыта справа (рис. 2 *a*). При этом периоды составляли:  $L_1 = 851$  нм,  $L_2 = 266$  нм,  $L_3 = 47$  нм.

После 5 минут гипотензи<br/>и $\mathbf{h}_1$ увеличилась максимально и достигла величины 7,8 <br/>нм.

Через 60 минут гипотензии  $h_1$  снизилась до величины 4,7 нм и оставалась в 2,6 раза больше контроля.

Высота II порядка h<sub>2</sub> по мере нарастания гипоксии возрастала в 1,6 раза через 5 минут гипотензии и в 4,5 раза через 60 минут гипотензии.

Высота III порядка  $h_3$  возрастала в процессе гипотензии быстрее, чем в I и II порядке: в 1,7 раза — 5 минут гипотензии и более чем в 6,3 раз к 60-й минуте гипотензии и достигала величины 0,7 нм.



#### Рис. 2. Динамика изменения наноструктуры поверхности мембраны эритроцитов при кровопотере.

а — объемное изображение первого, второго и третьего порядков фрагментов мембраны в контроле и гистограмма изменений высот трех порядков — 5 минут гипотензии; б — объемное изображение первого, второго и третьего порядков фрагментов мембраны и гистограмма изменений высот этих порядков — 60 минут гипотензии; в — объемное изображение первого, второго и третьего порядков фрагментов мембраны и гистограмма изменений высот этих порядков — 60 минут гипотензии; в — объемное изображение первого, второго и третьего порядков фрагментов мембраны и гистограмма изменений высот этих порядков — 1 час после введения перфторана.



Рис. 3. Гистограмма изменения высот I, II, и III порядков после кровопотери, реинфузии и добавления раствора Рингера.

После введения перфторана в концентрации 3 мл/кг через час после реинфузии во всех опытах и во всех порядках фрагментов поверхности мембран наблюдали уменьшение высот h<sub>i</sub>. Для первого порядка — до 0,3, во втором порядке — до 0,5 и в третьем порядке — до 1,9 по отношению к контролю.

Для сравнительной оценки действия перфторана в третьей схеме опытов вводили раствор Рингера, имеющий близкий ионный состав и осмолярность к раствору перфторана. Результаты серии опытов по схеме 3 представлены на рис. 3. При введении раствора Рингера по мере роста гипоксии (времени гипотензии) численные параметры h<sub>i</sub> всех трех порядков возрастали. На четвертой фазе опыта, то есть через 2 часа после реинфузии, высоты всех трех порядков оставались существенно выше, чем в контроле. Так, высота первого порядка возрастала в 3,7 раза, второго порядка — в 1,8 раза, а третьего — в 1,5 раза по сравнению с контролем. Числовые данные этого опыта приведены на гистограмме абсолютных высот (рис. 3).

Особый интерес представляет динамика изменения каждого из порядков по мере проведения экспериментов: контроль — 5 мин гипотензии — 60 минут гипотензии — реинфузия — введение перфторана через час после реинфузии. Динамика этих изменений представлена на рис. 4 гистограммами относительных высот. Все данные гистограмм нормированы на контроль каждого порядка и усреднялись по всему массиву экспериментов.

Высота первого порядка возрастала уже к 5-й минуте гипотензии в 2 раза, к 60-й минуте гипотензии — в 2,2 раза, и после введения перфторана она снижалась до уровня 0,45 по отношению к контролю (рис. 4 *a*).

Высота второго порядка имела несколько иную динамику и почти линейно возрастала в 2 раза — через 5 минут гипотензии и в 3 раза к 60-й минуте гипотензии, после действия перфторана она снижалась до уровня 0,51 по отношению к контролю (рис. 4 б).

Наибольшая динамика роста высоты  $h_i$  наблюдалась в третьем порядке, когда высота  $h_3$  возросла более чем в 7 раз к 60-й минуте гипотензии (рис. 4  $\beta$ ).

Известно, что при кровопотере возникает гипоксия, интоксикация, происходит ряд системных изменений в организме, которые непосредственно влияют на красные клетки крови [12]. В работах В. В. Мороза и соавт. [13] показано, что при кровопотере клетки меняют свою форму в широких пределах. Однако макропараметры клетки — диаметр и высота — изменяются не существенно. На рис. 1 показан дискоцит в контроле и клетка после 60 минут гипотензии. Форма клетки изменена существенно, однако ее размер практически не изменен. В данной работе рассматриваются изменения наноструктуры мембран эритроцитов. Эти изменения не всегда напрямую коррелируют с формой и размером эритроцита. Так показано, что явление «flick» не меняет форму клетки, но существенно изменяет ее микроструктуру [14]. В работе рассматривается шероховатость фрагмента поверхности мембраны не в первичном виде в поле АСМ, но анализируются различные порядки этой поверхности, полученные с помощью пространственного Фурье-разложения: I порядок – пространственный период в диапазоне 600-1000 нм, II порядок в диапазоне 150-350 нм, III порядок — в диапазоне 30-80 нм. Данные параметры выбраны из структурных особенностей мембраны эритроцита. Размеры первого порядка коррелируют с «flick» [14] и представляют собой одномоментную реплику этого явления [7]. Изме-



Рис. 4. Нормированные гистограммы по полному статистическому ансамблю опытов I, II, и III порядков поверхностей фрагментов мембран для различных фаз опытов.

Обозначения порядков поверхностей и фаз опытов приведены на рисунке. По оси ординат относительные изменения высот.

нения параметров поверхности второго порядка могут быть связаны с изменениями спектринового матрикса, поскольку L<sub>2</sub> близок к размерам его ячеек [15, 16].

На рис. 2 приведены примеры поверхностей в 3D изображений I, II и III порядков для различных фаз опытов, а справа приведены гистограммы высот в численных значениях для этих же стадий одного демонстрационного опыта.

Через 5 минут гипотензии h<sub>1</sub> увеличилась более чем в 4,3 раза (7,8 нм), а через 60 минут гипотензии эта величина снизилась до 4,7 нм. Высота второго порядка при этом росла от 1,6 нм (5 минут гипотензии) до 5 нм (60 минут гипотензии).

Первые минуты кровопотери характеризуются высокой степенью стресса, а, следовательно, изменениями параметров наноструктуры мембраны. В наших опытах существенные изменения наноструктуры мембран проявлялись уже на первых минутах кровопотери: через 5 минут гипотензии высота первого порядка возросла в 4,3 раза. К 60-й минуте кровопотери восстанавливались компенсаторно-регуляторные реакции и поэтому высоты I порядка несколько снижались и оставались на уровне 4,5-5,5 нм. То есть, высота первого порядка уменьшилась почти в 1,7 раза за счет реализации адаптационных механизмов в клетке. К 60-й минуте в данном опыте высоты первого и второго порядка были близкими. Таким образом, в течение одного часа гипотензии наблюдалось изменение высот как для больших периодов (спектральное окно 600-1000 нм), что соответствовало явлению «flick» [7, 14], так и для спектрального окна 150-300 нм, что соответствовало изменениям спектриного матрикса [7, 15, 16].

В работе представлена динамика изменения параметра h<sub>i</sub> для различных фаз опыта (рис. 4). Изменения высоты первого порядка соответствуют изме-

#### Литература

- Мороз В. В., Черныш А. М., Козлова Е. К. и соавт. Атомная силовая микроскопия структуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и реинфузии. Общая реаниматология 2009; V (5): 5–9.
- Александрин В. В., Кожура В. Л., Новодержкина И. С., Мороз В.В. Ранние постишемические нарушения мозгового кровотока и их коррекция перфтораном. Общая реаниматология 2006; II (3): 12–17.
- Мороз В. В., Крылов Н. Л. Некогда спорные, но сегодня решенные вопросы применения перфторана в клинике. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН; 1999. 25–32.
- Ковеленов А. Ю., Лобзин Ю. В., Светлов В. Н. Новые возможности клинического применения перфторорганических соединений. Эффективность перфторана в терапии тяжелых форм вирусных гепатитов. Биомед. журнал 2004; V (21): 86–89.
- Turrini F., Mannu F., Arese P. et al. Characterization of the autologous antibodies that opsonize erythrocytes with clustered integral membrane proteins. Blood 1993; 81 (11): 3146–3152.
- D'Agostino D. P., Colomb D. G., Dean J. B. Effects of hyperbaric gases on membrane nanostructure and function in neurons. J. Appl. Physiol. 2008; 106 (3): 996–1003.
- Moroz V. V., Chernysh A. M., Kozlova E. K. et al. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. J. Crit. Care 2010; 25 (3): 539.e1–539.e12.
- Ji X. L., Ma Y. M., Yin T. et al. Application of atomic force microscopy in blood research. World J. Gastroenterol. 2005; 11 (11): 1709–1711.

нениям, описанным выше. Высота второго порядка линейно возрастала на этапах: контроль — 5 минут — 60 минут гипотензии. К 60-й минуте гипотензии высоты I, II порядков были близки. Поверхность III порядка к 5-й минуте гипотензии изменялась слабо — увеличилась в 1,5 раза. Но к 60-й минуте гипотензии изменения тонких структур мембраны стали велики:  $h_3$  увеличилась в 7,1 раза. Таким образом, с ростом гипоксии, по-видимому, менялось структурное состояние белков band 3, что и проявилось в изменениях наноструктуры поверхности 3 порядка.

Введение раствора Рингера в качестве модели-заменителя перфторана не приводило к корригирующему действию структуры мембраны, и после 3-х часов реинфузии размеры величины высот h<sub>i</sub> оставались практически на уровне гипотензии.

Введение перфторана через час после реинфузии во всех опытах приводило к существенному сглаживанию шероховатости клетки, во всех фрагментах мембраны наблюдали уменьшение высот I, II и III порядков. Эти уменьшения стремились к контрольным величинам соответствующих высот.

### Выводы

Таким образом, показано, что кровопотеря вызывает нарушения микроструктуры мембран эритроцитов на всех уровнях её организации: на уровне 600—1000 нм — «flick», на уровне 150—350 нм — спектриновый матрикс, в диапазоне 30—80 нм — состояние белков band 3. Перфторуглеродная эмульсия «перфторан» оказывает выраженное корригирующее действие на наноструктуру мембран эритроцитов на всех ступенях её организации, восстанавливая наноструктуру мембран практически до уровня контроля.

- Girasole M., Cricenti A., Generosi R. et al. Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after treatment with a dihydropyridinic drug. Appl. Phys. Lett. 2000; 76: 3650–3652.
- Betz T., Bakowsky U., Müller M. et al. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. Bioelectrochemistry 2007; 70 (1): 122–126.
- Черныш А. М., Козлова Е. К., Мороз В. В. и соавт. Поверхность мембран эритроцитов при калиброванной электропорации: исследование методом атомной силовой микроскопии. Бюлл. эксперим. биологии и медицины 2009; 148 (9): 347–352.
- Новодержкина И. С., Кирсанова А. К., Кожура В. Л. Острая массивная кровопотеря: механизмы компенсации и повреждения. Анестезиология и реаниматология 2002; 6: 9–13.
- Мороз В. В., Кирсанова А. К., Новодержкина И. С. и соавт. Мембранопротекторное действие перфторана на мембраны эритроцитов при острой кровопотере. Общая реаниматология 2011; VII (1): 5–10.
- Park Y., Best C. A., Auth T. et al. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2010; 107 (4): 1289–1294.
- Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y. et al. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy. Biophys. J. 1998; 74 (5): 2171–2183.
- Guha T., Bhattacharyya K., Bhar R. 'Holes' on erythrocyte membrane and its roughness contour imaged by atomic force microscopy and lateral force microscopy. Curr. Sci. 2002; 83 (6): 693–694.

Поступила 31.01.11