ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПОСЛЕ КРОВОПОТЕРИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ЛАЗЕРНЫМ ОБЛУЧЕНИЕМ

В. В. Мороз, А. К. Кирсанова, И. С. Новодержкина, Е. К. Козлова, П. Ю. Борщеговская, У. А. Близнюк, В. В. Александрин, А. М.Черныш

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

Changes in the Surface of Red Blood Cell Membranes after Blood Loss and Their Correction with Laser Irradiation

V. V. Moroz, A. K. Kirsanova, I. S. Novoderzhkina, Ye. K. Kozlova, P. Yu. Borshchegovskaya, U. A. Bliznyuk, V. V. Aleksandrin, A. M. Chernysh

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

Цель исследования — выявить изменения микрорельефа поверхности мембран эритроцитов в процессе гипотензии и после реинфузии крови, а также возможность коррекции этих нарушений лазерным облучением (ЛО). Материал и методы. Опыты проведены на наркотизированных крысах-самцах массой 450 г. Моделью терминального состояния служила 1 ч гиполемическая гипотензия (АДср 45 мм рт. ст.) с последующей реинфузией выпущенной крови. Поставлено 2 группы опытов: контрольная и опытная, в которой через 1 ч после реинфузии крови проводили лазерное облучение в течение 2 мин. Мазки крови крыс исследовали с помощью атомно-силового микроскопа через 5 и 60 мин после кровопотери и через 1 и 3 ч после реинфузии крови. Результаты экспериментов показали, что после реинфузии крови вследствие активации процессов перекисного окисления липидов увеличивается размер эритроцита, изменяется его форма и рельеф поверхности мембраны эритроцита. ЛО, оказывая антиоксидантный эффект, восстанавливает проницаемость мембран и ультраструктуру поверхности мембран эритроцитов. *Ключевые слова:* кровопотеря, эритроциты, мембрана, перекисное окисление липидов, атомно-силовой микроскоп.

Objective: to reveal changes in the membrane surface microrelief during hypotension and after blood reinfusion and a possibility of correcting these impairments with laser irradiation (LI). *Materials and methods*. Experiments were carried out on anesthetized male rats weighing 450 g. The model of a terminal state was one-hour hypovolemic hypotension (mean blood pressure 45 mm Hg), followed by exsanguinated blood reinfusion. Two groups of experiments were made. These were control and experimental; in the latter laser irradiation was performed for 2 minutes an hour after blood reinfusion. Rat blood smears were examined on an atomic force microscope 5 and 60 minutes after blood loss and 1 and 3 hours after blood reinfusion. *Results*. The experiments have shown that after blood reinfusion the activated lipid peroxidation processes increase the size of a red blood cell and change its shape and its membrane surface relief. By producing an antioxidant effect, LI restores the permeability of red blood cell membranes and their surface ultrastructure. *Key words:* blood loss, red blood cells, membrane, lipid peroxidation, atomic force microscope.

Известно, что ключевая роль в формировании реологического поведения крови принадлежит форменным элементам и, прежде всего, эритроцитам, на долю которых приходится до 98% клеточных элементов крови. За последнее время достигнут значительный прогресс в изучении свойств эритроцитов и их молекулярной структуры. Он стал возможен благодаря появлению биофизических методов исследования, в частности, электронных и атомно-силовых микроскопов. Однако электронная микроскопия требует длительной подготовительной обработки образца и не всегда может определить изменения в тонких структурах мембраны эритроцита, этапы изменения формы эритроцита, каждый из которых имеет мор-

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Черныш Александр Михайлович E-mail: amchernysh@mail.ru фологические и функциональные особенности, а значит, и клиническую значимость. Преимуществом использования атомно-силового микроскопа (ACM) является высокое разрешение изображений клеток и возможность исследовать морфологические параметры и поверхность мембран без предварительной обработки [1, 2]. После специальной обработки эритроцитов, или исследовании их в физиологическом растворе, можно видеть структурные изменения белков цитоскелета и их функцию, наблюдая за их поведением во время свертывания или развертывания [3—5].

Исследования микрорельефа поверхности мембран эритроцитов при критических состояниях, а также возможность влиять на эти изменения, несомненно, представляют как научный, так и практический интерес.

Цель исследования — выявить нарушения морфологических параметров эритроцитов и изменения микрорельефа поверхности мембран с помощью АСМ в процессе гипотензии и после реинфузии крови, а также возможность коррекции этих нарушений лазерным облучением.

Материалы и методы

Работа выполнена на 17 нелинейных наркотизированных нембуталом (40 мг/кг) крысахсамцах массой 450 г. Моделью терминального состояния служила острая кровопотеря с 1-часовым периодом артериальной гипотензии (АДср 45 мм рт. ст.) и последующей реинфузией выпущенной крови. До кровопотери вводили гепарин (500 МЕ/кг внутривенно). Кровопотерю проводили из хвостовой артерии. Объем кровопотери составил в среднем 15 мл/кг. Поставлено 2 группы опытов: контрольная и опытная, в которой через 1 час после реинфузии крови проволили лазерное облучение (ЛО) в течение 2-х минут путем наложения световода на область хвостовых сосудов аппаратом АЛОК-1 (длина волны 632,8 нм, мощность излучения 1 мВт).

Измеряли размеры эритроцита (продольный диаметр, высоту и глубину впадины) и рельеф мембранной поверхности. Для этого на подложке формировали монослой эритроцитов из капли артериальной крови. Пробы крови брали в исходном состоянии, через 5 мин от начала кровопотери, через 1 час после гипотензии и через 1 и 3 часа после реинфузии крови. На данном этапе исследования в круг наших интересов входило изучение только дискоидных форм эритроцитов.

Исследование изучаемых параметров эритроцита проводили с помощью ACM «Femtoscan» в режиме постоянного сканирования с использованием программного математического обеспечения этого микроскопа. В качестве зондов использовали стандартные кантилеверы fp N10 с углом при вершине ≤22° и радиусом ~10 нм. Сила при сканировании в диапазоне 1,0–45 нН. Сканирование поверхности образцов проводили в контактном режиме ACM.

Для уменьшения артефактов и деформации поверхности клетки кантилевером перед сканированием регистрировали кривые зависимости силы взаимодействия зонда с поверхностью от координаты $\triangle Z = F(Z)$ в выбранной точке. Выставлялось оптимальное значение силы для каждого сканированного образца. Получаемое изображение записывалось в виде распределения силы вдоль поверхности образца Z (X,Y). В режиме «высоты» получали топографический снимок поверхности мембраны клеток, а режим «отклонения» давал более четкое описание наноскопических деталей поверхности.

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

Для исследования поверхности мембран эритроцитов была разработана методика разложения исходного спектра по-



Рис. 1. Изменения морфологических параметров дискоцита после кровопотери, реинфузии крови и лазерного облучения.

верхности мембран эритроцитов на спектральные составляющие, обозначенные как 1, 2 и 3 порядок. Подробно методика выделения поверхностей трех порядков изложена ранее [6]. Всего сканировано 220 клеток, на которых получено 512 сканов.

Статистическую обработку полученных поверхностей мембран клеток по их периодам и высотам выполняли с помощью программы «Origin», строили гистограммы высот и периодов поверхностей, рассчитывали ошибки по ансамблям, проверяли нулевые гипотезы значимости различий.

Результаты и обсуждение

Во время гипотензии и в постреанимационном периоде встречались дискоциты различной измененной формы: эллипсовидные; клетки, принимавшие форму диска; дискоциты с небольшими выростами в центре впадины и др. Наблюдалось также небольшое количество эхиноцитов. На 5-й мин гипотензии количество измененных форм дискоцитов достоверно увеличивалось за счет уменьшения числа нормальных дискоцитов (85 и 15%, соответственно); на 60-й мин количество нормальных дискоцитов увеличивалось до 83%, через 3 ч после реинфузии крови преобладали измененные формы дискоцитов (95%).

Динамика изменения размеров клетки в процессе кровопотери и после реинфузии в обеих группах опытов представлена на рис. 1. На 5-й минуте от начала кровопотери продольный диаметр и высота эритроцитов

Таблица 1

Изменение морфологических параметров дискоцита после кровопотери, реинфузии крови и лазерного облучения (нм) (*M*±*m*)

Этапы исследования	Диаметр	Высота клетки	Глубина впадины	
Исходные данные (<i>n</i> =12)	6552,5±168,8	344,8±50,18	-92,4±17,23	
5 мин от начала кровопотери (<i>n</i> =9)	11110,0±232,0*	569,0±35,0*	108,0±7,13*	
1 ч гипотензии (<i>n</i> =12)	6509,0±255,7	353,0±35,13	$-46,2\pm29,2$	
1 ч после реинфузии крови (<i>n</i> =9)	8128,0±774,6	574,0±43,7*	211,0±72,3*	
3 ч после реинфузии крови (<i>n</i> =9)	8642,0±555,6*#	413,0±35,3*#	158,0±27,1*#	
3 ч после реинфузии крови (лазерное облучение) (<i>n</i> =9)	6686,4±434,6	300,8±31,2	$-69,0\pm 17,73$	

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — достоверные различия по отношению к исходу; # — достоверные различия между контрольной и опытной группами.



Рис. 2. Изменения высоты шероховатости мембран эритроцитов в процессе гипотензии, после реинфузии крови и лазерного облучения.

увеличивались в 1,7 раза по сравнению с исходными данными. Впадина исчезала. На 60-й минуте гипотензии размер клеток восстанавливался до исходных величин, что, по-видимому, связано с компенсаторной централизацией кровообращения. У 83% эритроцитов появлялась впадина, которая была в 2 раза меньше, но достоверно не отличалась от исходной величины. Через 1 и 3 ч после реинфузии размеры изучаемых параметров клетки вновь увеличивались по сравнению с предыдущим периодом. На месте впадины появлялась выпуклость (табл. 1).

Увеличение размера дискоцита, в частности, высоты клеток и появление выпуклости на месте впадины свидетельствует об их набухании.

Динамика микрорельефа поверхности мембран эритроцитов 1, 2 и 3 порядка показана на рис. 2.

Через 5 мин от начала кровопотери высота шероховатости поверхности мембран эритроцитов 1 и 2 порядка снижалась, а расстояние между выступами (период), напротив, увеличивалось, что, по-видимому, связано с механическим растяжением мембраны при набухании. Через 1 ч гипотензии с восстановлением нормальных размеров клетки высота шероховатости и её период снижались по сравнению с исходными данными и предыдущим периодом наблюдения. Через 1 ч после реинфузии крови высота шероховатости увеличивалась во всех порядках: в 1-м порядке в 3,6, во 2-м — в 3 раза и в 3-м порядке — в 2 раза по сравнению с периодом гипотензии. Через 3 ч после реинфузии крови высота шероховатости и период в 1-м и 2-м порядках снижались. Высота шероховатости и период в 3-м порядке, в отличие от динамики шероховатости в 1-м и 2-м порядках, через 5 мин после кровопотери и 3 ч после реинфузии крови увеличивались. Следует отметить, что увеличение высоты структур 3-го порядка в эти периоды по времени совпадали с периодами наибольшего набухания клеток (табл. 2).

Таким образом, наибольшее набухание клеток, изменение их формы (ранняя стадия перехода дискоцита в эхиноцит) и увеличение микрорельефа поверхности мембраны эритроцита во всех порядках исследования наблюдались после реинфузии крови.

Ранее нами было отмечено, что этот период характеризуется активацией процессов свободнорадикального окисления, инициирующих перекисное окисление липидов (ПОЛ), на фоне сниженной активности антиоксидантных систем [7].

Из данных литературы известно, что основными мишенями свободных радикалов являются липиды мембран и мембранные белки. Пероксидация клеточных мембран приводит к уплотнению, либо деструкции липидного бислоя, повышению его микровязкости, образованию пор на поверхности мембран, сокращению площади белок-липидных контактов, нарушению мембранной проницаемости и функциональной активности ферментов [8-10]. Окислительная модификация мембранных белков сопровождается образованием сшивок между молекулами белка цитоскелета, что приводит к увеличению жесткости мембран [11]. При исследовании эритроцитов после пероксидации (in vitro) было обнаружено снижение (до 50%) способности белка 4.1 влиять на связывание спектрина с актином, наблюдались также изменения структуры спектрина [12]. Отмечалась также высокая степень корреляции между конформационными изменениями мембранных белков при пероксидации и формой клетки [13]. В основе механизма трансформации дискоцита в эхиноцит, под действием окисляющих агентов, лежит нарушение целостности мембраны, в частности, отделение липидного бислоя от мембранного цитоскелета. В результате некоторого растяжения мембраны появ-

Таблица 2

Высота и период микрошероховатости на поверхности мембран эритроцитов после кровопотери, реинфузии крови и лазерного облучения (нм) (*M*±*m*)

Этапы исследования	1-й порядок		2-й порядок		3-й порядок	
	высота	период	высота	период	высота	период
Исход (<i>n</i> =9)	3,25±0,06	635,0±6,85	2,71±0,06	231,74±4,81	0,86±0,01	60,49±0,31
5 мин гипотензии (<i>n</i> =9)	2,75±0,23	722,1±11,1*	2,01±0,04*	308,63±1,55*	0,95±0,03*	107,05±0,95*
1 ч гипотензии (<i>n</i> =9)	$1,75\pm0,2^*$	467,5±9,06*	$0,49{\pm}0,01*$	179,04±2,24*	$0,22{\pm}0,01{*}$	62,46±0,92
1 ч после реинфузии крови (<i>n</i> =9)	6,32±0,21*	683,2±11,7	$1,48\pm0,02*$	263,98±0,83*	$0,45\pm0,02*$	64,74±1,18*
3 ч после реинфузии крови (<i>n</i> =9)	2,41±0,09*	652,0±6,03#	1,19±0,06*#	196,63±3,33*#	0,83±0,02#	71,08±1,06*#
3 ч после реинфузии крови						
(лазерное облучение) (<i>n</i> =15)	2,44±0,1*	593,0±25,1	0,40±0,08*	91,68±7,28*	0,25±0,02*	52,5±2,8*

ляются выросты, в основном содержащие липиды. Белковый анализ этих выростов показал, что они содержали очень мало белков мембранного скелета спектрина и актина, но были обогащены трансмембранными белками полосы 3, а также 4.1 и 7 [10]. Увеличение молекулярных структур на поверхности мембран эритроцитов при действии на них свободными радикалами *in vitro* наблюдали на АСМ исследователи из Китая [14].

Таким образом, опираясь на собственные данные и данные литературы, можно заключить, что набухание эритроцитов, изменение их формы и увеличение шероховатости на поверхности мембран эритроцитов связаны с активацией процессов ПОЛ в постреинфузионном периоде.

Сравнение образцов крови в контрольной и опытной группах через 3 ч после реинфузии крови показало, что после лазерного облучения размеры клетки восстанавливались до исходной величины, появлялась отсутствующая в контрольной группе впадина, глубина которой достоверно не отличалась от исходной (табл. 1).

Высота шероховатости на поверхности первого порядка через 3 ч после реинфузии достоверно не отличалась от таковой в контрольной группе, поскольку к этому периоду дискоидная форма эритроцита начинала восстанавливаться в обеих группах опытов. Высота шероховатости и период на поверхности 2 и 3 порядка после лазерного облучения были достоверно ниже, чем в контрольной группе опытов (табл. 2).

Таким образом, ЛО способствовало восстановлению размера эритроцита и рельефа его поверхности.

Известно, что одним из механизмов действия ЛО является его коррегирующее влияние на механизмы адаптации и компенсации физиологических процессов на всех уровнях организации живой материи [15]. На молекулярном уровне ЛО оказывает активирующее влияние на антиоксидантные ферменты плазмы крови и эритроцитов [8]. Исследования действия ЛО на целые эритроциты или их мембраны *in* vitro обнаружили повышение активности Na/K-АТФазы [16–18]. Низкоинтенсивное ЛО увеличива-

Литература

- Мороз В. В., Черныш А. М., Козлова Е. К. и соавт. Атомно-силовая микроскопия структуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и реинфузии. Общая реаниматология 2009; V (5): 5–9.
- Zhang P. C., Bai C., Huang Y. M. et al. Atomic force microscopy study of fine structures of the entire surface of red blood cells. Scanning Microsc. 1995; 9 (4): 981–989.
- Muller D. J., Engel A. Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. Nat. Protoc. 2007; 2 (9): 2191–2197.
- Frederix P. L., Bosshart P. D., Engel A. Atomic force microscopy of biological membranes. Biophys. J. 2009; 96 (2): 329–338.
- Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y. et al. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed μ atomic force microscopy. Biophys. J. 1998; 74 (5): 2171–2183.
- Черныш А. М., Козлова Е. К., Мороз В. В. и соавт. Поверхность мембран эритроцитов при калиброванной электропарации: исследование методом атомной силовой микроскопии. Бюлл. эксперим. биол. мед. 2009; 148 (9): 347–353.
- Кирсанова А. К., Кожура В. Л., Новодержкина И. С., Паршина Е. Ю. Влияние лазерного облучения на интенсивность свободноради-

ет активность ацетилхолинэстеразы, что свидетельствует об участии этого фермента в адаптивных процессах нативных эритроцитов. Предполагают, что изменения активности ферментов связано с их структурно-функциональной перестройкой под действием ЛО и переводом белковых молекул в более выгодное на данный момент конформационное состояние [15, 19].

ЛО повышает осмотическую резистентность мембран эритроцитов, устойчивость их к действию детергентов, увеличивает текучесть мембран эритроцитов даже после короткого времени экспозиции [20]. И, наконец, ЛО, также как в наших экспериментах, приводило к уменьшению размера молекулярных структур на поверхности мембран эритроцитов, увеличенных после действия на них свободных радикалов [14].

Таким образом, опираясь на данные литературы о механизмах действия ЛО, можно объяснить его положительное действие на восстановление размера эритроцита и его формы активирующим влиянием ЛО на ферменты антиоксидазной защиты и активного транспорта. Уменьшение шероховатости 2 и 3 порядка, возможно, связано либо с погружением изучаемых структур в липидный бислой, вследствие снижения его вязкости, либо с изменением конформационного состояния активных центров трансмембранных белков, выступающих на поверхность мембран эритроцитов.

Заключение

Исследование на ACM размеров эритроцита после кровопотери показало, что эритроциты очень быстро (через 5 мин) реагируют на кровопотерю изменением проницаемости мембран и также быстро восстанавливают свои размеры при компенсации кровообращения. Активация процессов ПОЛ после реинфузии крови приводит к увеличению размера, изменению формы эритроцитов и увеличению шероховатости на его поверхности. ЛО, оказывая антиоксидантный эффект, восстанавливает проницаемость мембран и ультраструктуру мембранной поверхности эритроцитов.

кального окисления при гиповолемической гипотензии и после реинфузии (экспериментальное исследование). Общая реаниматология 2005; I (2): 53—55.

- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука; 1972.
- Wang J. Y., Wang L. P., Ren Q. S. Atomic force microscope observation on biomembrane before and after peroxidation. Biophys. Chem. 2007; 131 (1–3): 105–110.
- Liu S. C., Derick L. H., Duquette M. A., Palek J. Separation of lipid bilayer from the membrane skeleton during discocyte-echinocyte transformation of human erythrocyte ghosts. Eur. J. Cell Biol. 1989; 49 (2): 358–365.
- Стародубцева М. Н., Кузнецова Т. Г., Егоренков Н. И. АСМ-исследование эритроцитов, кренированных активными формами азота. VII Междунар. семинар. 1—6 ноября 2006. Минск; 148—152.
- Becker P. S., Cohen C. M., Lux S. E. The effect of mild diamide oxidation on the structure and function of human erythrocyte spectrin. J. Biol. Chem. 1986; 261 (10): 4620–4628.
- Betz T., Bakowsky U., Muller M. R. et al. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. Bioelectrochemistry 2007; 70 (1): 122–126.

- Cui Y., Guo Z., Zhao Y. et al. Reactive effect of low intensity He-Ne laser upon damaged ultrastructure of human erythrocyte membrane in fenton system by atomic force microscopy. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai) 2007; 39 (7): 484–489.
- Брилль Г. Е. Молекулярно-клеточные основы терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Саратов; 2000.
- Kassak P., Sikurova L., Kvasnicka P., Bryszewska M. The response of Na/K-ATFase of human erythrocytes to green laser light treatment. Physiol. Res. 2006; 55 (2): 189–194.
- Kilanczyk E., Palecz D., Bryszewska M. Effect of red laser light on Na/K-ATPase activity in human trythrocyte membranes sensitized with Znphthalocyanine. J. Clin. Laser Med. Surg. 2002; 20 (2): 71–75.
- Moroz A. M. Na/K-ATPase activity in erythrocytes after the erect of laser radiation. Ukr. Biokhim. Zh. 1983; 55 (6): 674–676.
- Kujawa J., Zavodnik L., Zavodnik I., Bryszewska M. Low-intensity near-infrared laser radiation-induced changes of acetylcholinesterase activity of human erythrocytes. J. Clin. Laser Med. Surg. 2004; 21 (6): 351–355.
- Monem A. S., Ali F. M., Al-thani N. J., Ali S. A. Membrane solubilization in erythrocytes as a measure of radiation exposure to fast neutrons. Phys. Med. Biol. 1999; 44 (2): 347–355.

Поступила 18.12.09

