

АТОМНАЯ СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРЕ И РЕИНФУЗИИ

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

НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

Atomic Force Microscopy of the Structure of Red Blood Cell Membranes in Acute Blood Loss and Reinfusion

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

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Цель исследования — изучение поверхностных неоднородностей мембран эритроцитов после острой массивной кровопотери и реинфузии крови, с помощью методов атомной силовой микроскопии (АСМ). **Материал и методы.** Эксперименты проводили на крысах-самцах под нембуталовым наркозом. Использовали гиповолемическую гипотензию в течение 60 минут с последующей реинфузией крови. **Фазы экспериментов:** контроль до кровопотери, через 5 минут от начала кровопотери, через 1 час после гипотензии, через 1 и 3 часа после реинфузии. **Изображения поверхности мембран** получали с помощью АСМ в режиме постоянного сканирования. Использовали пространственное спектральное преобразование поверхности. **Результаты.** Показано, что параметры наноперфорации являются собственными характеристиками мембран. Наибольшие изменения происходят в начальных стадиях переходных процессов: кровопотери и реинфузии. **Заключение.** Использование АСМ позволило наблюдать динамику изменений поверхностей мембран эритроцитов при острой тотальной кровопотере и дальнейшей реинфузии крови с разрешением до долей нанометров. **Ключевые слова:** кровопотеря, реинфузия, наноструктура, атомная силовая микроскопия.

Objective: to examine the surface heterogeneities of red blood cell membranes after acute massive blood loss and blood reinfusion, by using atomic force microscopy (AFM). **Materials and methods.** Experiments were carried out under nembutal anesthesia on male rats. Hypovolemic hypotension was induced during 60 minutes, followed by blood reinfusion. The experimental phases were as follows: control before blood loss; 5 minutes after its onset; 1 hour following hypotension; and 1 and 3 hours after reinfusion. Membrane surface images were obtained by AFM in the constant scanning mode. Spatial surface spectral transformation was used. **Results.** The nano-surface parameters were shown to be intrinsic characteristics of membranes. The greatest changes occurred at the early stages of transient processes: blood loss and reinfusion. **Conclusion.** The application of AFM permitted the authors to trace the time course of changes in the red blood cell membrane surfaces during acute total blood loss and further blood reinfusion to tolerances of fractions of nanometer. **Key words:** blood loss, reinfusion, nanostructure, atomic force microscopy.

Нарушения микрореологических свойств крови является важным патогенетическим фактором, затрудняющим доставку кислорода тканям в постреанимационном периоде. Ключевая роль в формировании микрореологического поведения крови принадлежит форменным элементам, прежде всего, эритроцитам, которые определяют состояние её текучести на уровне капилляров. Вязкость крови во многом зависит от структурно-функциональных свойств эритроцита: его формы, деформабельности и состояния поверхности мембраны [1]. Однако изучать изменения параметров поверхности мембран в эксперименте весьма затруднительно [2].

Перспективным методом исследования поверхности мембран клеток является метод сканирующей зондо-

вой микроскопии — атомно-силовая микроскопия (АСМ) [3, 4]. Данный метод позволяет наблюдать топографическое изображение объектов поверхности от 10 мкм до 10 нм и менее, строить их изображение и оценивать размеры в трехмерном пространстве. Но при решении практических задач реализация этого метода вызывает ряд существенных трудностей. Это, прежде всего, анализ и объективная оценка сложных, неоднородных поверхностей биологических мембран. Отсутствие единых подходов к анализу сложных поверхностей не позволяет адекватно интерпретировать полученные результаты [3, 5].

Цель настоящей работы — изучение поверхностных неоднородностей мембран эритроцитов после острой массивной кровопотери и реинфузии крови, с помощью методов АСМ.

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Черныш Александр Михайлович
E-mail: amchernysh@mail.ru

Материалы и методы

Эксперименты проводили на нелинейных крысах-самцах массой 450 грамм под нембуталовым наркозом (40 мг/кг внут-

рибрюшинно). В качестве модели терминального состояния использовали гиповолемическую гипотензию (АД 40 мм рт. ст.) в течение 60 минут с последующей реинфузией выпущенной крови. До кровопотери вводили гепарин внутривенно (500 МЕ/кг). Кровопотерю проводили из хвостовой артерии. Общий объем кровопотери составлял в среднем 15 мл/кг массы тела. Для исследования морфологических и топографических параметров поверхности мембран в ходе эксперимента на разных его этапах отбирали кровь и формировали монослои эритроцитов. Эксперименты состояли из следующих этапов: контроль до кровопотери, через 5 минут от начала кровопотери, через 1 час после гипотензии, через 1 и 3 часа после реинфузии крови.

Перед сканированием образца на АСМ качество нанесенного монослоя эритроцитов мазка крови оценивали на оптическом микроскопе. Проводили визуальную статистику различных форм клеток, начиная от дискотитов и заканчивая эхиноцитами. В работе изучали дискотиты.

Изображения поверхности мембран получали с помощью АСМ «Femtoscan» в режиме постоянного сканирования с использованием программного математического обеспечения этого микроскопа. В качестве зондов использовали стандартные кантилеверы fr N10 с углом при вершине $\leq 22^\circ$ и радиусом ~ 10 нм. Сила при сканировании в диапазоне 1,0–45 нН. Число точек сканирования — 512, поля сканирования: 10×10 мкм, 1500×1500 нм, 1000×1000 нм и до 50×50 нм.

Сканирование поверхности образцов проводили в контактно-режиме АСМ. Для уменьшения артефактов и деформации поверхности кантилевером перед сканированием клетки регистрировали кривые зависимости силы взаимодействия зонда с поверхностью от координаты $\Delta Z = F(Z)$ в выбранной точке. Выставлялось оптимальное значение силы для каждого сканированного образца. Получаемое изображение записывали 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.

Дальнейший анализ данных проводили по следующей схеме:

1. Измеряли макропараметры формы и размеров клеток из сканов 10×10 мкм:

— высота эритроцита H , — глубина впадины эритроцита h , — радиус эритроцита R . Статистическую обработку формы и размеров клеток проводили для образцов каждой стадии опыта.

2. Анализ структур поверхности мембран эритроцитов проводили из сканов размера от 1 мкм до $50-300$ нм. Для этого строилось сечение поверхности клетки, по которому оценивали микро- и наноструктуры поверхности. Из полученных ансамблей были выделены поверхности трех порядков: структуры с пространственными периодами $600-1200$ нм соответствовали I порядку, с периодами $250-350$ нм — II порядку и с периодами $50-250$ нм — III порядку. Выделение поверхностей I, II и III порядков выполняли с помощью пространственных спектральных окон Фурье — преобразований.

При построении поверхностей I, II и III порядков спектральные окна для пространственных периодов задавали, а распределение высот поверхностей соответствующих порядков являлись измеряемыми параметрами.

Статистическую обработку размеров клеток и полученных поверхностей мембран по их периодам и высотам выпол-

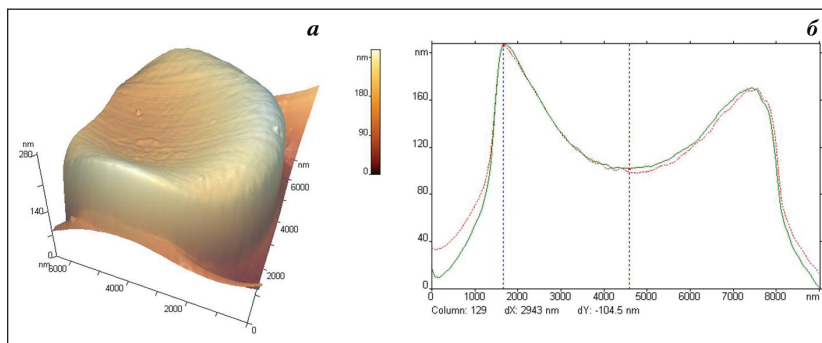


Рис. 1. Изображение эритроцита контрольного образца в поле сканирования 7000×9000 нм. а — трехмерное изображение; б — профиль клетки.

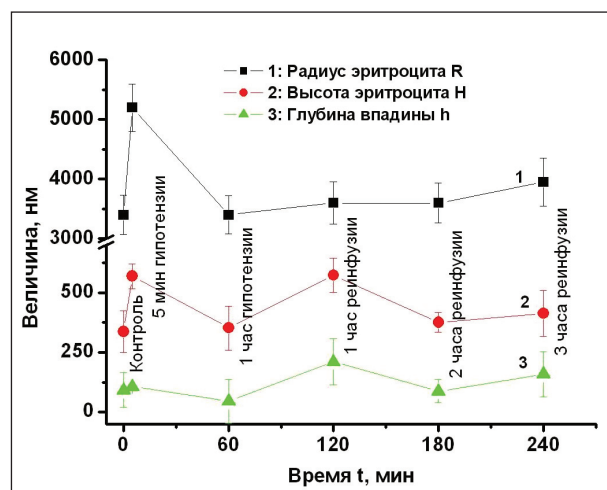


Рис. 2. Макропараметры эритроцита — высота дискотита — H , глубина его впадины — h и его радиус — R для различных фаз эксперимента.

няли с помощью программы «Origin». В частности, строили гистограммы высот и периодов поверхностей, рассчитывали ошибки по ансамблям, проверяли значимость различий между всеми стадиями эксперимента.

Проведено 15 опытов по острой тотальной кровопотере и дальнейшей реинфузии крови. Из образцов каждой из 5 стадий каждого из 15 опытов на АСМ сканировали по 3 изображения клеток в поле 10×10 мкм. Затем для каждой клетки сканировали по 3 фрагмента в поле 1500×1500 нм, а уже из этих фрагментов сканировали поля 1000×1000 нм и затем, менее 500×500 нм. Всего просканировано 220 клеток, на которых получено 612 сканов. Из них: в поле 10×10 мкм — 220 сканов, в поле 1000×1000 нм — 392 скана.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показан эритроцит контрольного образца.

Для каждой стадии опыта были получены среднестатистические значения величин радиуса R , высоты H и глубины впадины h эритроцита для «контрольных» образцов, «5 мин гипотензии», «1 часа гипотензии», «1 часа реинфузии», «2 часов реинфузии», «3 часов реинфузии» (рис. 2).

Наибольшие изменения по сравнению с контролем наблюдали в точках «5 мин гипотензии» и «1 часа реинфузии»: для точки «5 мин гипотензии» — в 1,5 раза для радиуса эритроцита, в 1,7 раза для высоты эрит-

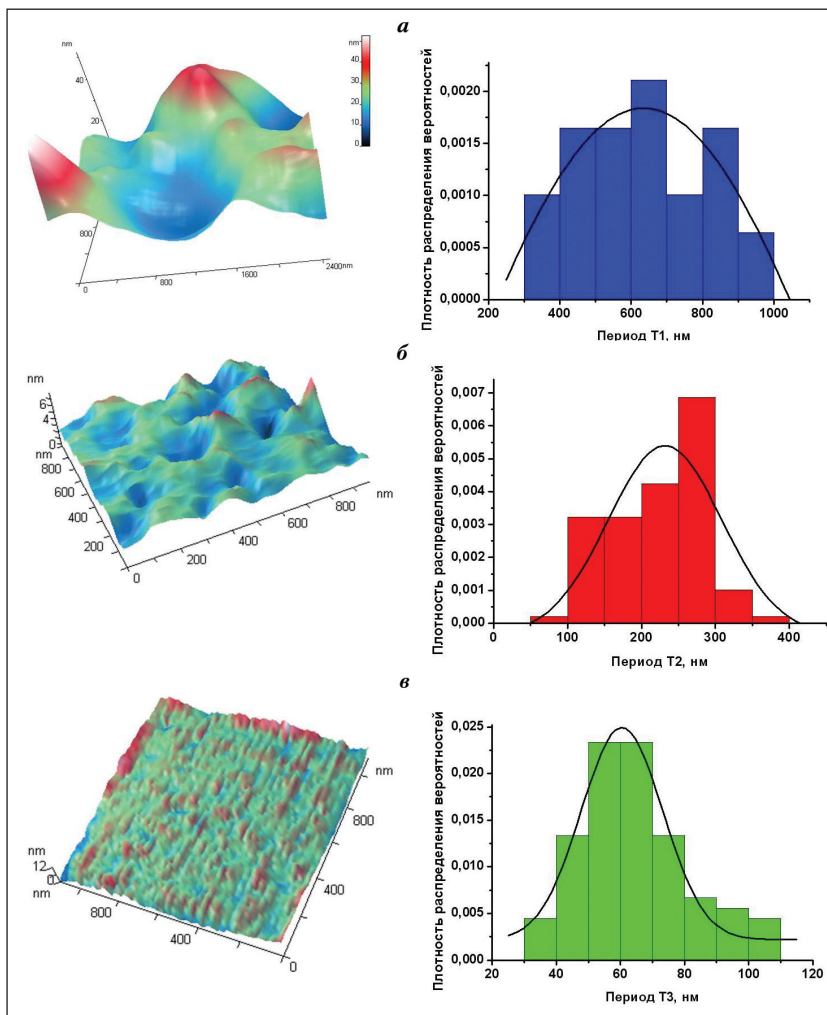


Рис. 3. Объёмные изображения фрагментов мембраны и гистограммы периодов для контрольной клетки.

а — I порядок поверхности в поле 2400×2400 нм; **б** — II порядок поверхности в поле 800×800 нм; **в** — III порядок поверхности в поле 1000×1000 нм.

роцита; для точки «1 час реинфузии» — в 1,8 раза для высоты эритроцита. В остальных точках изменение величин радиусов и высот эритроцитов были близки к контрольному значению и статистически были не различимы.

По ходу эксперимента эритроциты меняли форму в макромасштабе с большой вариабельностью. Дискциты становились близкими к эхиноцитам или промежуточным формам. В некоторых опытах впадина увеличивалась, в других могла уменьшаться для одной и той же фазы опыта. В ряде опытов клетки раздувались и впадина меняла знак. Поэтому среднеквадратические отклонения значений впадин велики, а уровень значимых различий для всех фаз эксперимента $p \geq 0,05$. Очевидно, для данной серии опытов параметр «глубина впадины» не информативен.

Относительный параметр h/H — (отношение глубины впадины к высоте эритроцита) значимо различался для всех фаз на уровне $p \leq 0,01$. Точка «5 минут кровопотери» уменьшилась по сравнению с контролем (0,28–0,18), так как высота клетки H

возросла, а впадина почти не изменилась. В точке «1 час гипотензии» это отношение становилось ещё ниже — 0,12, но уже за счёт резкого уменьшения глубины впадины h (хотя H тоже уменьшалась). При реинфузии h/H возросло выше контроля — 0,37.

В процессе проведения эксперимента эритроциты меняли не только свою форму и размеры, но изменялась и структура поверхности мембран. Регистрацию этих изменений проводили на сканах 1000×1000 нм и 500×500 нм. Однако, прямое сканирование поверхностей не позволяло получить количественные, информативные критерии оценки топографических изменений на поверхности мембран. Стандартные методы оценки шероховатости при сравнении поверхностей для разных стадий опытов не позволяли выявить значимые различия между ними. Это определялось тем, что отдельные составляющие сложного рельефа поверхности при анализе интегрировались, накладывались друг на друга и в результате информативные показатели усреднялись и оставались замаскированными.

Для регистрации указанных изменений использовали метод пространственного Фурье-разложения и получали поверхности трёх порядков, как это описано выше.

Для каждой анализируемой клетки на данной фазе опыта строили изображения поверхности всех трёх порядков. Затем измеряли периоды T_i и высоты h_i для каждого порядка для данной клетки. После этого соответствующие параметры для ансамбля клеток подвергали статистической обработке и всю процедуру повторяли для клеток следующей стадии эксперимента. В качестве примера на рис. 3 (а, б, в) приведены поверхности I, II и III порядков в объёмном изображении для контрольного образца и гистограммы периодов соответствующих порядков.

В таблице приведены средние значения периодов и высот поверхностей I, II и III порядков и их среднеквадратического отклонения по соответствующим ансамблям. Для I порядка периоды «контроля» и «5 минут кровопотери» близки и достоверно различаются лишь только для $p \geq 0,05$, то есть различия слабые. Такие же слабые различия отмечены для высот этих же фаз эксперимента для поверхностей III порядка. Все остальные значения периодов и высот для первых трёх фаз экспериментов различались значимо ($p \leq 0,01$).

Периоды T и высоты h поверхностей I, II и III порядков
для фаз экспериментов: контроль, 5 минут, 1 час гипотензии

Параметр	T , контроль (нм)	T , 5 минут (нм)	T , 1 час (нм)	h , контроль (нм)	h , 5 минут (нм)	h , 1 час (нм)
I порядок	625±32	720±34	540±26	3,5±0,21	2,7±0,24	1,8±0,11
II порядок	220±12	280±11	182±14	2,8±0,12	2,0±0,06	0,5±0,02
III порядок	64±3,8	116±5,6	62±4,4	0,9±0,04	1,0±0,04	0,2±0,01

На рисунках 4, 5 и 6 представлены зависимости средних значений по ансамблям клеток периодов T_1 , T_2 и T_3 и высот h_1 , h_2 и h_3 для всех стадий экспериментов с указанием среднеквадратичного отклонения. За счет большой экспериментальной статистики и высокой вероятности выполнения события (точности опытов) среднеквадратичные отклонения малы.

Из рисунков 4а, 5а и 6а следует, что в точке «5 мин гипотензии» высоты поверхностей уменьшались по сравнению с контрольными значениями: для I порядка от 3,5 нм до 2,7 нм, для II порядка от 2,8 до 2,0 нм. Для III порядка высота несколько увеличивалась: от 0,9 до 1,0 нм. Увеличение h_3 , очевидно, незначимо и определялось ошибкой эксперимента на малой статистике.

Для периодов T_i поверхностей в этой точке наблюдалось увеличение их значений по отношению к контрольным: для II порядка — в 1,3 раза, для III порядка — в 1,8 раза (рис. 5, б и 6, б). Для I порядка различия в 1,1 раз были значимы лишь для $p \geq 0,05$. На уровне $p \leq 0,01$ эти различия становились не значимыми (рис. 4, б). Таким образом, расстояния между структурами поверхности мембраны становились больше, особенно это увеличение характерно для II и III порядков поверхностей.

В самом начале эксперимента, уже через 5 минут от начала кровопотери микропараметры мембран эритроцитов претерпевали существенные изменения. Поверхность мембраны реагировала на изменение состояния за короткое время.

В точке «1 час гипотензии» высоты поверхностей всех трех порядков уменьшались. Для I порядка высота h_1 уменьшалась относительно контрольного значения в 1,9 раза, для II порядка — в 5,6 раза, для III порядка — в 4,5 раза. Следовательно, поверхность клетки становилась более ровной и гладкой.

В этой же точке, наблюдалось уменьшение периодов поверхностей для всех трех порядков, как это было и для высот. Периоды уменьшались по сравнению с значениями в точке «5 мин гипотензии»: для I порядка — в 1,3 раза, для II порядка — в 1,6 раза, для III порядка — в 1,9 раза. По сравнению с соответствующими контрольными значениями периоды уменьшались: для I порядка — в 1,1 раза, для II порядка — в 1,25 раза, для III порядка — в 1,04

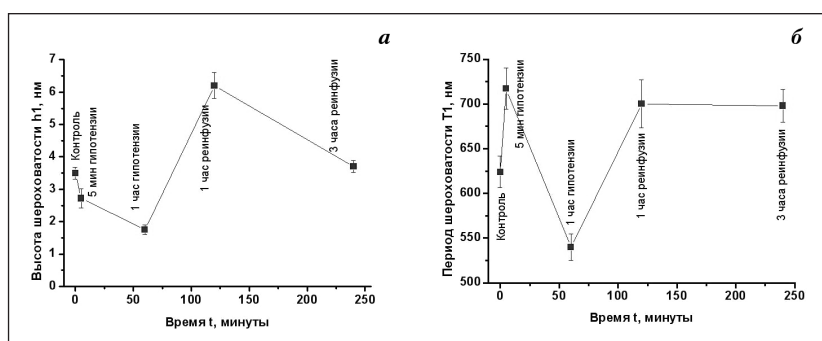


Рис. 4. Зависимость высоты (а) и периода (б) поверхностей I порядка для всех фаз эксперимента: контроль, 5 мин гипотензии, 1 час гипотензии, 1 час реинфузии, 2 часа реинфузии, 3 часа реинфузии.

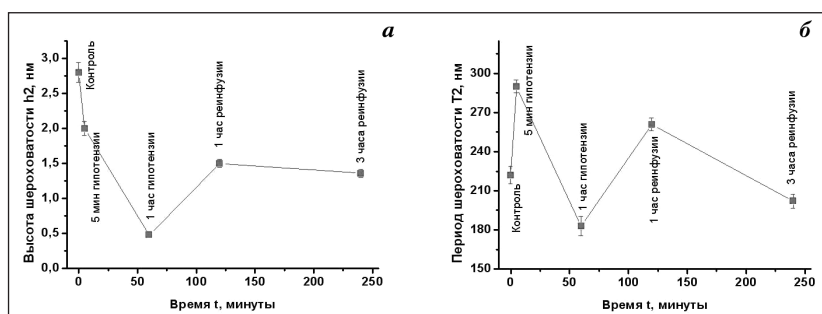


Рис. 5. Зависимость высоты (а) и периода (б) поверхностей II порядка для всех фаз эксперимента: контроль, 5 мин гипотензии, 1 час гипотензии, 1 час реинфузии, 2 часа реинфузии, 3 часа реинфузии.

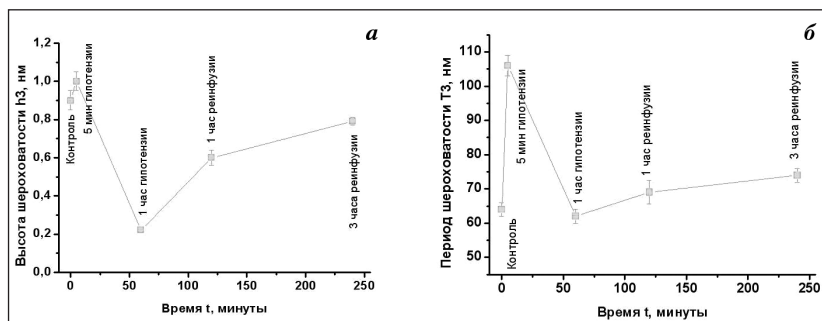


Рис. 6. Зависимость высоты (а) и периода (б) поверхностей III порядка для всех фаз эксперимента: контроль, 5 мин гипотензии, 1 час гипотензии, 1 час реинфузии, 2 часа реинфузии, 3 часа реинфузии.

раза. На этой фазе эксперимента наблюдались самые большие отклонения микропараметров поверхностей мембран по сравнению с контролем.

В точке «1 час реинфузии» наблюдалось увеличение высот h по сравнению с точкой «1 час гипотензии». Особенно сильное возрастание высот происходило для I порядка поверхности. Структур 600–1200 нм на поверхности мембраны становилось больше. Их высота увеличивалась по сравнению со значением в точке «1 час гипотензии» в 3,3 раза, а относительно контрольного значения — в 1,8 раза. Для II и III порядка также наблюдалось увеличение высот поверхности мембраны, но до контрольных значений их высоты не доходили.

В этой же точке значения периодов T_i для всех трех порядков поверхностей возрастали по сравнению со значениями в точке «1 час гипотензии», и становились больше контрольных значений: для I порядка — в 1,1 раза, для II порядка — в 1,2 раза, для III порядка — в 1,2 раза.

К точке «3 часа реинфузии» структура поверхности мембраны стремилась вернуться в исходное состояние. Для I и III порядков значения высот поверхностей было приближено к контрольным значениям, для II порядка — оставалось на уровне точки «1 час реинфузии».

В целом через 4 часа после начала проведения опыта (1 час гипотензия и последующая реинфузия), и для высот, и для периодов поверхности мембран I и III порядков значения стремились к исходным, для II порядка — оставались на уровне точки «1 час реинфузии».

Полученные экспериментальные результаты позволили показать динамику изменений макропараметров клетки и микропараметров поверхностей мембран эритроцитов в процессе острой тотальной кровопотери и дальнейшей реинфузии крови.

Известно, что кровопотеря вызывает изменения формы и размеров эритроцитов. Это можно наблюдать уже в оптическом микроскопе. Глубокие изменения были показаны с помощью электронной микроскопии [6, 7]. Однако более детальное изучение этих процессов было затруднено ограничениями указанных методов микроскопии. Использование атомной силовой микроскопии позволило наблюдать изменения, происходящие на поверхности мембран с разрешением по высотам до долей нанометров [8].

Острая массивная кровопотеря вызывала быструю реакцию мембранных поверхностей. Эта реакция наблюдалась в наших экспериментах уже через 5 минут с начала кровопотери: высоты неоднородностей поверхностей

всех порядков уменьшались, а пространственные периоды увеличивались. Поверхность мембран становилась более гладкой и менее шероховатой. Эти изменения, по-видимому, связаны с реакцией клеток на стрессорные факторы: адреналин, гормональные воздействия.

Изменения параметров I порядка могло быть вызвано стремлением клетки к переходам от дискоцитов в другие промежуточные формы.

В норме, когда идет адекватный обмен кислорода, поверхность мембран изначально имеет некоторые определенные средние значения высот и пространственных периодов (рис. 3 и см. таблицу). Такая поверхность определяется структурой спектринового матрикса эритроцита и состоянием белковых молекул. Средний размер спектриновых ячеек ~200–300 нм [4].

Стрессорные агенты вызывали, по-видимому, нарушения спектриновой сети [9], а, следовательно, и структуры эритроцитарной мембраны. В наших экспериментах эти изменения наблюдались на всех уровнях микроповерхностей.

Здесь интересен и другой вопрос: как быстро возникает мембранная реакция на кровопотерю? Вероятно, реакция следует быстрее, чем показано в наших опытах, но это требует дополнительного изучения. В частности, необходима фиксация образцов крови на более коротких промежутках времени после начала кровопотери и через такие же промежутки необходимо контролировать начало процесса реинфузии.

Через 3 часа после реинфузии и высоты пространственных периоды стремились к восстановлению начальных величин. Частично это произошло. Для I и III порядков поверхности восстановились практически до контрольного уровня. Для II порядка только до уровня 1 часа после начала реинфузии.

Экспериментальные данные процесса релаксации мембран представляет особый интерес. При кровопотере спектриновый матрикс мог повреждаться необратимо [9, 10], и именно поэтому поверхность II порядка, размеры которой соизмеримы с ячейками матрикса, не возвращалась к исходным параметрам. Параметры III порядка определяются поверхностными белковыми структурами, расстояния между которыми изменялись обратимо.

Использование атомной силовой микроскопии позволило наблюдать динамику изменений, происходящих на поверхности мембран эритроцитов при острой тотальной кровопотере и дальнейшей реинфузии крови с разрешением до долей нанометров.

Литература

1. Радаев С. М., Остапченко Д. А., Розенберг Ю. М. и соавт. Влияние перфторана на структурные и функциональные свойства эритроцитов у больных с травмой и кровопотерей. *Medline ru. Росс. биомед. журн.* 2004; 5 (27): 104–108.
2. Betz T., Bakowsky U., Müller M. R. et al. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry* 2007; 70 (1): 122–126.
3. 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.
4. Yamashina S., Katsumata O. Structural analysis of red blood cell membrane with an atomic force microscope. *J. Electron. Microsc.* 2000; 49 (3): 445–451.
5. Guha T., Bhattacharyya K., Bhar R. et al. Holes on erythrocyte membrane and its roughness contour imaged by atomic force microscopy and lateral force microscopy. *Curr. Science* 2002; 83 (6): 693–694.
6. Tekle E., Astumian R. D., Friauf W. A. et al. Chock asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. *Biophys. J.* 2001; 81 (2): 960–968.
7. Кожура В. Л., Кирсанова А. К., Березина Т. Л. и соавт. Влияние низкоэнергетического лазерного излучения на клетки крови при геморрагическом шоке. *Тр. Института общей реаниматологии РАМН.* т. 2. 2001. 177–182.
8. Фёдорова М. З., Павлов Н. А., Зубарев Е. В. и соавт. Использование атомной силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови. *Биофизика* 2008; 53 (6): 1014–1018.
9. Strasser S., Zink A., Kada G. et al. Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy. *Forensic Sci. Int.* 2007; 170 (1): 8–14.
10. Xiao Yu, Feng Hua, Ping Hui, Jia Zuan. Studies on the effects of epimedium extract on erythrocytes. *Chinese Chem. Letters* 2006; 17 (8): 1105–1108.

Поступила 13.07.09