

ИЗМЕРЕНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ ЖЕСТКОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

В. А. Сергунова, О. Е. Гудкова, А. П. Козлов*, А. М. Черныш

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

* Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

Measurement of the Local Tension of Red Blood Cell Membranes by Atomic Force Spectroscopy

V. A. Sergunova, O. E. Gudkova, A. P. Kozlov*, A. M. Chernysh

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

* I. M. Sechenov First Moscow State Medical University

Цель работы — исследовать среднюю локальную жесткость мембраны при воздействии мембранных модификаторов. **Материалы и методы.** Забор крови производили у трех здоровых доноров при профилактических осмотрах в микроветты (Sarstedt AG and Co., Germany), содержащие ЭДТА. В данной серии опытов действовали на эритроциты модификатором наноповреждения мембран — гемин (солянокислый гематин). Гемин нарушает конформацию спектрина, белка band 4,1 и ослабляет связь между ними [19]. Добавляли гемин в кровь *in vitro*. Концентрация гемина в крови составляла 1,8 мМ. Изображения клеток и их мембран получали с помощью АСМ [16] NTEGRA Prima, (NT-MDT, Russia). Жесткость мембран оценивали с помощью метода атомно-силовой спектроскопии. **Результаты.** После воздействия гемина в 68% случаях средняя жесткость увеличилась по сравнению с контрольным средним значением в 2,1 раза ($p < 0,05$), что могло снизить ID на $\approx 30\%$. Последующее воздействие перфторана возвращало жесткость мембраны в 85% случаев к исходным значениям. Жесткость мембраны остальных 15% областей на клетках оставалась высокой — в 2,3 раза больше контроля ($p < 0,05$), даже несмотря на воздействие перфторана. **Выводы.** Таким образом, с помощью атомно-силовой спектроскопии измерена средняя локальная жесткость мембраны, которая зависела от воздействия на нее мембранных модификаторов, в частности гемина. **Ключевые слова:** эритроцит, жесткость мембраны, атомно-силовая спектроскопия, гемин.

Objective: to study the average local tension of a membrane upon exposure to its modifiers. **Materials and methods.** Blood from 3 healthy donors was sampled into ethylene diamine tetraacetate-containing microvettes (Sarstedt AG and Co., Germany) during prophylactic examinations. In this series of experiments, the red blood cells were exposed to the membrane nanosurface modifier hemin (muriatic hematin). Hemin disrupts the conformation of spectrin, a band 4.1 protein, and weakens their bond [19]. Hemin was added to blood *in vitro*. Its blood concentration was 1.8 mM. The images of cells and their membranes were obtained on a NTEGRA Prima atomic force microscope (NT-MDT, Russia) [16]. The membrane tension was estimated by atomic force spectroscopy. **Results.** After exposure to hemin, 68% of cases showed a 2.1-fold increase in the average tension as compared to the mean control value ($p < 0.05$), which could reduce ID by $\approx 30\%$. Subsequent exposure to perftoran returned the membrane tension to the baseline values in 85% of cases. The membrane tension of other 15% of the areas on the cells remained high — 2.3 times higher than the control values ($p < 0.05$) even despite the action of perftoran. **Conclusion.** Thus, atomic force spectroscopy was used to measure the average local tension of the membrane, which depended on exposure to its modifiers, such as hemin. **Key words:** red blood cell, membrane tension, atomic force spectroscopy, hemin.

Одной из важных задач исследования микрореологии крови является определение механических свойств красных клеток крови. Одним из перспективных методов измерения механических характеристик эритроцитов является атомная силовая спектроскопия. Этот метод реализуется с помощью атомных силовых микроскопов (АСМ) [1, 2]. С помощью АСМ получают силовые кривые — графики зависимости силы упругос-

ти, действующей на кантилевер со стороны клеточной мембраны [3, 4]. Изучение биологических объектов на АСМ представляет собой технически и методически сложное направление [5, 6], поскольку живые клетки — мягкие объекты, которые деформируются под действием силы со стороны кантилевера, а также должны быть прочно связаны с подложкой [7].

Измерение жесткости мембран эритроцитов позволяет оценивать деформируемость эритроцитов [8, 9]. Индекс деформируемости зависит от ряда параметров клетки, в частности от жесткости мембраны, вязкости цитоплазмы, от формы (от площади поверхности) клетки [10]. Изменение формы клеток от дискоцитов к

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Сергунова Виктория Александровна (Sergunova V. A.)
E-mail: orbf@mail.ru

эхиноцитам и дальнейшее развитие дегенеративных форм приводит к увеличению вязкости крови и снижению индекса деформируемости эритроцитов [11]. ID связан с жесткостью мембраны логарифмической зависимостью [12]. Чем больше жесткость, тем меньше величина индекса деформируемости. Возникновение ряда заболеваний сопровождается изменением ID на 15–20% [13, 14]. При травмах и кровопотерях ID меняется на 10–15% [15], а при сахарном диабете на 20–25% [16]. В свою очередь, деформируемость мембран в большой степени определяет микрореологические свойства крови [17] и является основным влияющим фактором на вязкости крови в капиллярах [13, 14].

Цель работы — исследовать среднюю локальную жесткость мембраны при воздействии мембранных модификаторов.

Материал и методы

Забор крови производили у трех здоровых доноров при профилактических осмотрах в микроветты (Sarstedt AG and Co., Germany), содержащие ЭДТА. В соответствии с требованиями этического комитета НИИ общей реаниматологии РАМН было получено согласие всех доноров на проведение исследований.

Использовали сухой гемин (Sigma, USA) для приготовления рабочего раствора. 50 мг сухого гемина растворяли в 1 мл раствора (NaOH) и добавляли 5 мл дистиллированной воды. Конечная концентрация гемина в крови составляла в наших опытах 1,8 мМ. Монослой клеток получали с помощью устройства V-Sampler (Austria).

Изображения клеток и их мембран получали с помощью ACM [18] NTEGRA Prima, (NT-MDT, Russia) в полуконтактном режиме. Использовали кантилеверы NSG01 (force constant 5 N/m) [19].

Жесткость мембран оценивали с помощью метода атомно-силовой спектроскопии [20]. Метод позволяет измерять величину деформации поверхности мембраны и кантилевера в зависимости от вертикального смещения пьезостола, на котором помещена мембрана. Для измерения деформации мембраны коэффициент жесткости кантилевера K должен быть сравним с таковым мембраны. В нашей работе использовали кантилеверы типа SD-R-150-NCL-10 (Nanosensors) $K=36$ Н/м и радиусом сканирующего зонда 150 нм. Силовые кривые регистрировали в 5 точках на торе эритроцита. Измерения производили на 6

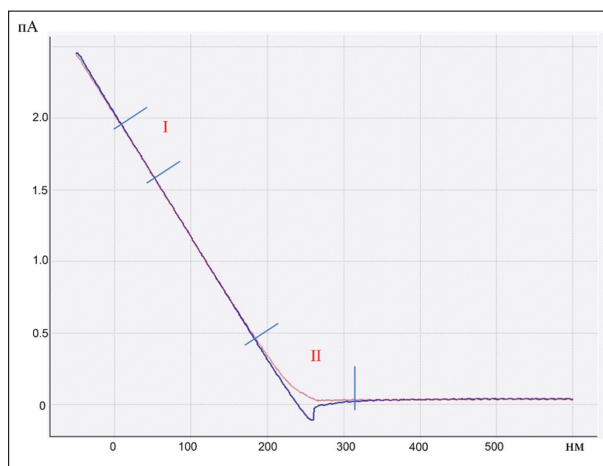


Рис. 1. Кривые измерения жесткости мембраны.

По оси абсцисс — расстояние между зондом кантилевера и поверхностью мембраны; по ординате — пА величина пропорциональная силе взаимодействия; красная кривая — прямой ход, синяя кривая — обратный.

клетках одного образца. Различные клетки и разные участки мембраны эритроцита имели разброс по величине коэффициента жесткости мембраны (K_m). Поэтому в работе оценивали среднюю жесткость мембраны клетки. Затем оценивали величины средней жесткости для n клеток и получали распределение жесткостей и строили соответствующие гистограммы.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведен пример получения силовой кривой для измерения жесткости мембраны. Измеряли угол наклона хорды дуги II [$nA/нм$], оценивали жесткость участка мембраны эритроцита.

В данной серии опытов действовали на эритроциты модификатором наноповрежденности мембран — гемин (солянокислый гематин). Гемин нарушает конформацию спектрина, белка band 4,1 и ослабляет связь между ними [21]. Добавляли гемин в кровь *in vitro*. Концентрация гемина в крови составляла 1,8 мМ.

Таблица 1

Выборка для измерения локальной жесткости мембраны (метод силовой спектроскопии)

Параметр	Число доноров	Количество мазков для каждого донора	Количество сканов 100×100 мкм	Количество исследуемых клеток в каждом мазке	Количество локальных измерений на клетке	Всего объектов	
						клеток	точек
Контроль	2	2	2	48	3	384	1152
Гемин	2	2	2	56	3	448	1344
Гемин+ПФ	2	2	2	58	3	464	1392

Таблица 2

Средняя локальная жесткость мембраны после воздействия гемина ($M \pm m$)

Параметр	Контроль	Гемин (68% измерений)	Гемин (32% измерений)	Гемин + ПФ (85% измерений)	Гемин+ПФ (15% измерений)

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Общее количество измерений локальной жесткости мембраны (модификатор гемин) представлено в табл. 1.

Значения средней локальной жесткости в относительных единицах приведены в табл. 2. Относительные значения жесткости (К) вычислялись как отношение $(tg_{II}/tg_I) \times M$, где tg_{II}, tg_I — тангенсы углов наклона кривой на участках II и I (рис. 1) соответственно, коэффициент пропорциональности $M=10$.

На рис. 2 приведены гистограммы распределения жесткости мембраны в контроле, после воздействия гемина и после коррекции перфтораном. Данные получены для времени воздействия раствора гемина 20 мин.

После воздействия гемина в 68% случаев средняя жесткость увеличилась по сравнению с контрольным средним значением в 2,1 раза ($p < 0,05$), что могло снизить ID на $\approx 30\%$. У 32% клеток средняя жесткость мембраны не отличалась от среднего контрольного значения. Последующее воздействие перфторана возвращало жесткость мембраны в 85% случаев к исходным значениям. Жесткость мембраны остальных 15% областей на клетках оставалась высокой — в 2,3 раза больше контроля ($p < 0,05$), даже несмотря на воздействие перфторана.

Таким образом, с помощью атомно-силовой спектроскопии измерена средняя локальная жесткость мембраны, которая зависела от воздействия на нее мембранных модификаторов в частности гемина. Этот модификатор увеличивал жесткость в 2,1 раза для боль-

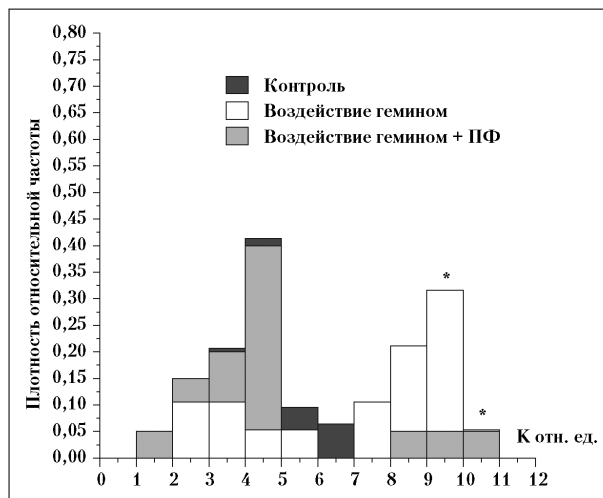


Рис. 2. Гистограммы распределения жесткости мембраны в контроле, клеток после воздействия гемина и клеток после воздействия гемина и добавления перфторана.

К — коэффициент жесткости.

шинства клеток. При этом снижался индекс деформируемости на $\approx 30\%$.

Перфторан частично восстанавливал исходную жесткость в 85% случаев. Данный метод можно эффективно использовать для измерения жесткости мембран при действии модификаторов иной природы, а также при исследовании мембран эритроцитов в клинических условиях.

Литература

- Butt H. J., Cappella B., Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Sci. Rep.* 2005; 59 (1–6): 1–152.
- Girasoletto M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boumis G., Amiconi G. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. *J. Microsc.* 2001; 204 (Pt 1): 46–52.
- Лебедев Д. В., Чулкинов А. П., Бухараев А. А., Дружинина О. С. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа. *Письма в ЖТФ.* 2009; 35 (8): 54–61.
- Costa K. D. Imaging and probing cell mechanical properties with the atomic force microscope. *Methods Mol. Biol.* 2006; 319: 331–361.
- Мороз В. В., Черныш А. М., Козлова Е. К., Сергунова В. А., Гудкова О. Е., Федорова М. С., Кирсанова А. К., Новодержкина И. С. Нарушение наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология.* 2011; 7 (2): 5–9.
- Мороз В. В., Голубев А. М., Афанасьев А. В., Кузовлев А. Н., Сергунова В. А., Гудкова О. Е., Черныш А. М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (1): 52–60.
- Ефремов Ю. М., Базров Д. В., Дубровин Е. В., Шайтан К. В., Яминский И. В. Атомно-силовая микроскопия животных клеток: обзор достижений и перспективы развития. *Биофизика.* 2011; 56 (2): 288–303.
- Fisseha D., Katiyar V. K. Analysis of mechanical behavior of red cell membrane in sickle cell disease. *Appl. Mathematics.* 2012; 2 (2): 40–46.
- Луценко М. Т., Рабинович Б. А. Деформируемость эритроцитов в периферической крови беременных при обострении в третьем триместре гестационно-вирусной инфекции. *Информатика и системы управления.* 2011; 3: 44–51.
- Chasis J. A., Mohandas N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J. Cell Biol.* 1986; 103 (2): 343–350.
- Turchetti V., Leoncini F., De Matteis C., Trabalzini L., Guerrini M., Forconi S. Evaluation of erythrocyte morphology as deformability index in patients suffering from vascular diseases, with or without diabetes mellitus: correlation with blood viscosity and intra-erythrocytic calcium. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1998; 18 (2–3): 141–149.

- Chasis J. A., Schrier S. L. Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte. *Blood.* 1989; 74 (7): 2562–2568.
- Коркушко О. В., Дужак Г. В. Возрастные изменения реологических свойств крови и состояния эндотелиальной функции микроциркуляторного сосудистого русла. *Проблемы старения и долголетия.* 2011; 20 (1): 35–52.
- Кулапина О. И., Киричук В. Ф., Зайцева И. А. Изменения реологических свойств крови у больных ангиной. *Саратовский науч.-мед. журн.* 2008; 4 (3): 37–41.
- Исакова А. А. Микрореологические нарушения и способы их коррекции у больных с травмой и кровопотерей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009: 25.
- Shin S., Ku Y., Babu N., Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J. Exp. Biol.* 2007; 45 (1): 121–128.
- Киричук В. Ф., Широков В. Ю. Особенности реологии крови у больных хроническим генерализованным пародонтитом в сочетании с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. *Бюл. сибирской медицины.* 2003; 2 (4): 72–79.
- Мороз В. В., Голубев А. М., Черныш А. М., Козлова Е. К., Васильев В. Ю., Гудкова О. Е., Сергунова В. А., Федорова М. С. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (1): 5–12.
- Мороз В. В., Козлова Е. К., Черныш А. М., Гудкова О. Е., Бушуева А. В. Изменения структуры мембран эритроцитов при действии гемина. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (6): 5–10.
- Starodubtseva M., Chizhik S., Yegorenkov N., Nikitina I., Drozd E. Study of the mechanical properties of single cells as biocomposites by atomic force microscopy. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education.* 2010: 470–477.
- Li S. D., Su Y. D., Li M., Zou C. G. Hemin-mediated hemolysis in erythrocytes: effects of ascorbic acid and glutathione. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2006; 38 (1): 63–69.

References

- Butt H. J., Cappella B., Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Sci. Rep.* 2005; 59 (1–6): 1–152.
- Girasoletto M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boumis G., Amiconi G. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. *J. Microsc.* 2001; 204 (Pt 1): 46–52.

3. Lebedev D. V., Chuklanov A. P., Bukharaev A. A., Druzhinina O. S. Izmerenie modulya Yunga biologicheskikh obyektov v zhidkoi srede s pomoshchyu spetsialnogo zonda atomno-silovogo mikroskopa. *Pisma v ZhTF*. [Measuring Young's modulus of biological objects in a liquid medium using an atomic force microscope with a special probe]. *Letters to the ZhTF*. 2009; 35 (8): 54–61. [In Russ.]
4. Costa K. D. Imaging and probing cell mechanical properties with the atomic force microscope. *Methods Mol. Biol.* 2006; 319: 331–361.
5. Moroz V. V., Chernysh A. M., Kozlova E. K., Sergunova V. A., Gudkova O. E., Fedorova M. S., Kirsanova A. K., Novoderzhkina I. S. Narushenie nanostруктуры membran eritrotsitov pri ostroi krovopotere i ikh korrektsiya perfortruglerodnoi emulsiei. [Impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and their correction with perfluorocarbon emulsion]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2011; 7 (2): 5–9. [In Russ.]
6. Moroz V. V., Golubev A. M., Afanasyev A. V., Kuzovlev A. N., Sergunova V. A., Gudkova O. E., Chernysh A. M. Stroenie i funktsiya eritrotsita v norme i pri kriticheskikh sostoyaniyakh. [The structure and function of a red blood cell in health and critical conditions]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 52–60. [In Russ.]
7. Efremov Yu. M., Bagrov D. V., Dubrovin E. V., Shaitan K. V., Yaminsky I. V. Atomno-silovaya mikroskopiya zhyvotnykh kletok: obzor dostizhenii i perspektivy razvitiya. [Atomic force microscopy of live cells: A review of advances and development prospects]. *Biofizika*. 2011; 56 (2): 288–303. [In Russ.]
8. Fisseha D., Katiyar V. K. Analysis of mechanical behavior of red cell membrane in sickle cell disease. *Appl. Mathematics*. 2012; 2 (2): 40–46.
9. Lutsenko M. T., Rabinovich B. A. Deformiruemost eritrotsitov v perifericheskoi krovi beremennykh pri obostrenii v tretyem trimestre gestatsii gerpes-virusnoi infektsii. [Peripheral red blood cell deformability in pregnant women on exacerbation of virus infection in the third trimester of pregnancy]. *Informatika i Sistemy Upravleniya*. 2011; 3: 44–51. [In Russ.]
10. Chasis J. A., Mohands N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J. Cell Biol.* 1986; 103 (2): 343–350.
11. Turchetti V., Leoncini F., De Matteis C., Trabalzini L., Guerrini M., Forconi S. Evaluation of erythrocyte morphology as deformability index in patients suffering from vascular diseases, with or without diabetes mellitus: correlation with blood viscosity and intra-erythrocytic calcium. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1998; 18 (2–3): 141–149.
12. Chasis J. A., Schrier S. L. Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte. *Blood*. 1989; 74 (7): 2562–2568.
13. Korkushko O. V., Duzhak G. V. Vozrastnye izmeneniya reologicheskikh svoystv krovi i sostoyaniya endotelialnoi funktsii mikrotsirkulyatornogo sosudistogo rusla. [Age-related changes in blood rheological properties and microcirculatory vascular bed endothelial function]. *Problemy Stareniya i Dolgoletiya*. 2011; 20 (1): 35–52. [In Russ.]
14. Kulapina O. I., Kirichuk V. F., Zaitseva I. A. Izmeneniya reologicheskikh svoystv krovi u bolnykh s anginoi. [Changes in blood rheological properties in patients with angina]. *Saratovskiy Nauchno-Meditsinskiy Zhurnal*. 2008; 4 (3): 37–41. [In Russ.]
15. Isakova A. A. Mikroreologicheskie narusheniya i sposoby ikh korrektsii u bolnykh s travmoi i krovopoterei: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. [Microrheological disorders and modes of their correction in patients with injury and blood loss: Abstract of Cand. Med. Sci. Dissertation]. Moscow, 2009: 25. [In Russ.]
16. Shin S., Ku Y., Babu N., Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J. Exp. Biol.* 2007; 45 (1): 121–128.
17. Kirichuk V. F., Shirokov V. Yu. Osobennosti reologii krovi u bolnykh khronicheskim generalizovannym parodontitom v sochetanii s zabolevaniyami cheludochno-kishechnogo trakta. [The specific features of blood rheology in patients with chronic generalized periodontitis concurrent with gastrointestinal tract diseases]. *Byulleten Sibirskoi Meditsiny*. 2003; 2 (4): 72–79. [In Russ.]
18. Moroz V. V., Golubev A. M., Chernysh A. M., Kozlova E. K., Vasilyev V. Yu., Gudkova O. E., Sergunova V. A., Fedorova M. S. Izmeneniya struktury poverkhnosti membran eritrotsitov pri dlitelnom khranении donorskoi krovi. [Structural changes in the surface of red blood cell membranes during long-term donor blood storage]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 5–12. [In Russ.]
19. Moroz V. V., Kozlova E. K., Chernysh A. M., Gudkova O. E., Bushueva A. V. Izmeneniya struktury membran eritrotsitov pri deistvii gemina. [Hemin-induced changes in the red blood cell membrane structure]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (6): 5–10. [In Russ.]
20. Starodubtseva M., Chizhik S., Yegorenkov N., Nikitina I., Drozd E. Study of the mechanical properties of single cells as biocomposites by atomic force microscopy. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010: 470–477.
21. Li S. D., Su Y. D., Li M., Zou C. G. Hemin-mediated hemolysis in erythrocytes: effects of ascorbic acid and glutathione. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2006; 38 (1): 63–69.

Поступила 28.12.12