

Медико-биологические науки

УДК 618.2

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДАВЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПО ДАННЫМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ. ЧАСТЬ 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ¹

Ю.С. Нагорнов, Тольяттинский государственный университет (Тольятти, Россия),
e-mail: Nagornov.Yuri@gmail.com

Аннотация. На основе данных атомно-силовой микроскопии скана эритроцитов проведена экспериментальная проверка способа расчета внутриклеточного давления. Проведен расчет внутриклеточного давления эритроцитов экспериментальных животных при механической желтухе разной степени. Показано, что с ростом концентрации билирубина в крови происходит разрушение мембраны эритроцитов, в среднем увеличение их объема и существенное увеличение внутриклеточного давления.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, биология, медицина, кровь, эритроциты, внутриклеточное давление.

ВВЕДЕНИЕ

Теоретический анализ морфологии эритроцитов [1-4] и численный расчет ее зависимости от внутриклеточного давления ΔP [5,6] позволили разработать метод определения ΔP на основе данных атомно-силовой микроскопии (АСМ). Состояние мембраны эритроцитов, а также эффективность работы ионных каналов мембраны определяет ее упругие свойства [6-9]. Как показали расчеты, величина внутриклеточного давления эритроцита на воздухе определяется реактивным давлением, создаваемым упругими силами мембраны [5,9]. Поэтому для анализа экспериментальных данных АСМ сканов эритроцитов, полученных на воздухе, необходимо использовать следующие соотношения:

$$\Delta P [kPa] = 9.1 \cdot \left(\frac{V}{V_0} - 1\right) + 1.054 \cdot \left(\frac{V}{V_0} - 1\right)^2 \quad (1)$$

$$\frac{V}{V_0} = \frac{V/S}{V_0/S_0}, \text{ при условии } S = S_0 \quad (2)$$

где ΔP – внутриклеточное давление, V – объем эритроцита при измерении, V_0 – объем эритроцита из выборки эритроцитов в норме, S – площадь эритроцита при АСМ измерении, S_0 – площадь эритроцита в норме.

Трехмерная поверхность эритроцитов, получаемая при АСМ измерениях, позволяет определить объем клетки [10-12], по которому можно провести расчет ΔP . Как показали численные расчеты, площадь при изменении объема под действием реактивного давления

¹ Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение № 14.574.21.0025, уникальный идентификатор соглашения – RFMEFI57414X0025). Автор благодарит Пахову Р.А. за предоставленные экспериментальные данные.

The work was supported by the Federal Program «Research and development on priority directions of scientific-technological complex of Russia in 2014 - 2020 years» (agreement № 14.574.21.0025, its unique identifier is RFMEFI57414X0025). The author is grateful to Pakhomova R.A. for providing experimental data.

мембраны эритроцита практически не изменяется. В случае нарушений в работе ионных каналов мембраны величина реактивного давления ΔP_r изменится, что в свою очередь повлияет на биомеханику эритроцита в целом, в результате внутриклеточное давление ΔP , установившееся в эритроците на воздухе также изменится. Таким образом, величина ΔP будет отражать состояние мембраны и эффективность работы ее ионных насосов.

Видно, что для применения формул (1) и (2) к данным АСМ эритроцитов необходимо сначала определить начальное значение V_0 для каждого эритроцита в выборке на скане. В результате должна получиться начальная выборка эритроцитов и распределение объемов в норме. Причем данная начальная выборка будет отличаться для различных биологических видов и возраста. При выводе формул (1) и (2) не было отдельно сказано о биологическом виде, к которым принадлежат эритроциты и другим параметрам, таким как возраст. Соответственно нормировку или начальную выборку, принимаемую за норму, необходимо выполнить для эритроцитов при прочих одинаковых условиях. Поскольку в биологических и медицинских исследованиях проводят статистические сравнения с контрольной группой, то невозможно определить начальный объем эритроцита до изменения его морфологии в эксперименте. При этом в соответствии с численными расчетами внутриклеточное давление определяется степенью изгиба в центре мембраны, что дает основания рассчитывать ΔP по относительному изменению величины объема, нормированного на его же площадь в соответствии с формулой (2).

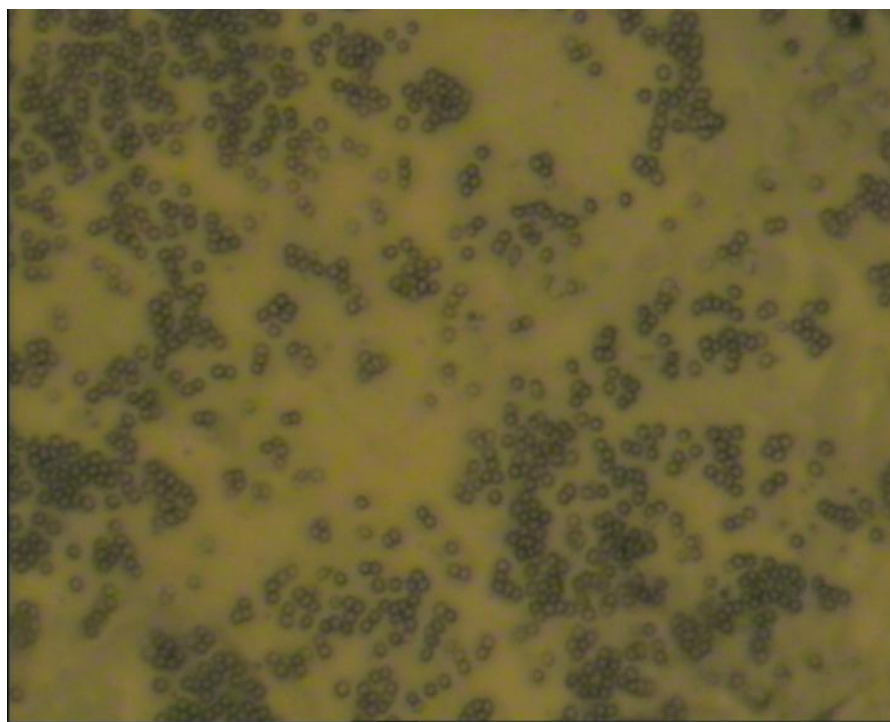
Целью настоящей работы является экспериментальная проверка метода определения внутриклеточного давления на эритроцитах, полученных при исследовании разной степени заболевания механической желтухой.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ДАВЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ

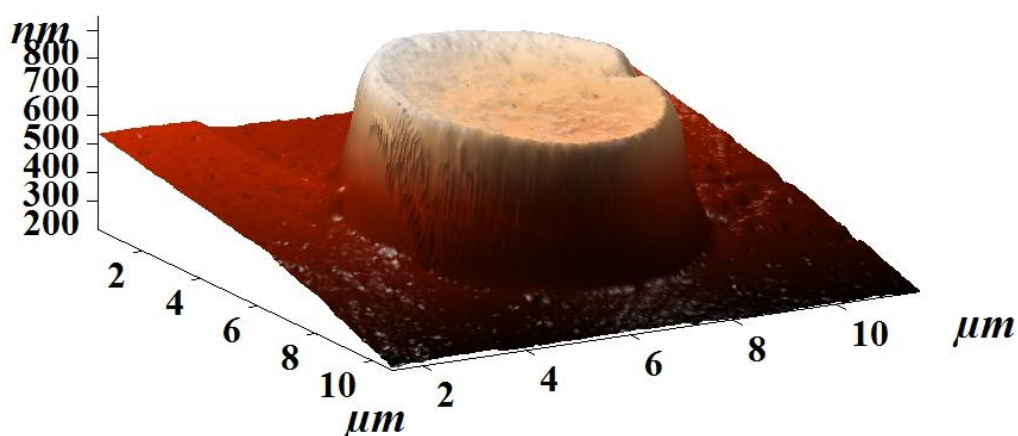
Для расчета внутриклеточного давления в работе проведены экспериментальные исследования методами АСМ в полуконтактном режиме на микроскопе Solver-P4 компании NT-MDT. В качестве образцов использовались мазки крови, взятые у экспериментальных животных (минипигов – карликовых домашних свинок) одинакового возраста, но зараженных различной степенью заболевания механической желтухой (класс А, В и С) и у здоровых особей (в норме). Для анализа сканов использовали метод мазка крови, на котором выбирались только отдельные эритроциты (рис.1а), чтобы исключить механическое воздействие соседних клеток и искажение их морфологии. Число клеток для анализа варьировалось в пределах 50-60 эритроцитов для каждого образца, при этом каждый исследуемый эритроцит был просканирован как минимум дважды: первый раз клетка целиком (рис.1b), второй раз – мембрана клетки для анализа ее состояния.

На рис.2 показаны вертикальные срезы трехмерного изображения морфологии эритроцита, полученные при помощи АСМ микроскопии. Видно, что экспериментальные исследования, по крайней мере, качественно соответствуют численным расчетам: во-первых, морфология изменяется так, что прогиб мембраны в центре уменьшается и происходит увеличение объема эритроцита; во-вторых, площадь под эритроцитом практически не изменяется (табл.1). На рис.2 линейные размеры эритроцитов подобраны близкими, чтобы показать изменение прогиба мембраны. При этом срез мембраны эритроцита при механической желтухе класса В находится между срезами эритроцитов класса А и С, но не показан на рисунке, поскольку создает множество пересечений с

соседними графиками. Видно (рис.2), что при увеличении степени заболевания механической желтухой происходит существенное изменение прогиба мембраны эритроцита, что в соответствии с работами [4,11] может быть связано с изменением упругих свойств мембраны. При этом меняется не только величина прогиба мембраны, но и форма мембраны – уменьшается острове́ршинность края эритроцита, пропадает линейный участок между центром эритроцита и его краем, координаты максимума на срезе мембраны становятся размытыми и при механической желтухе класса С прогиб исчезает полностью, а поверхность мембраны становится выпуклой.



a)



b)

Рис.1. Изображения эритроцитов, полученные при помощи АСМ:
а – фотография АСМ микроскопа при предварительном поиске отдельных эритроцитов;
б – трехмерное изображение эритроцита, полученное при помощи АСМ микроскопии.

Исследование шероховатости поверхности сканов с эритроцитами с использованием встроенного программного обеспечения Nova микроскопа Solver-P4 показало, что с ростом степени заболевания средняя шероховатость уменьшается с 40-44 до 26-30 нм, а дисперсия монотонно уменьшается со 112 до 84 нм². В качестве области анализа бралась только область мембраны эритроцита так, чтобы края эритроцита не попадали в область анализа. Данные по шероховатости косвенно подтверждают уменьшение в среднем островершинности мембран эритроцитов, хотя и зависят также и от других факторов, таких как скорость сканирования, радиус острия кантилевера, наличие шумов при сканировании и т.д. В процессе проведения измерений на АСМ микроскопе все указанные факторы были выбраны одинаковыми, что не исключает их влияния на результаты измерений.

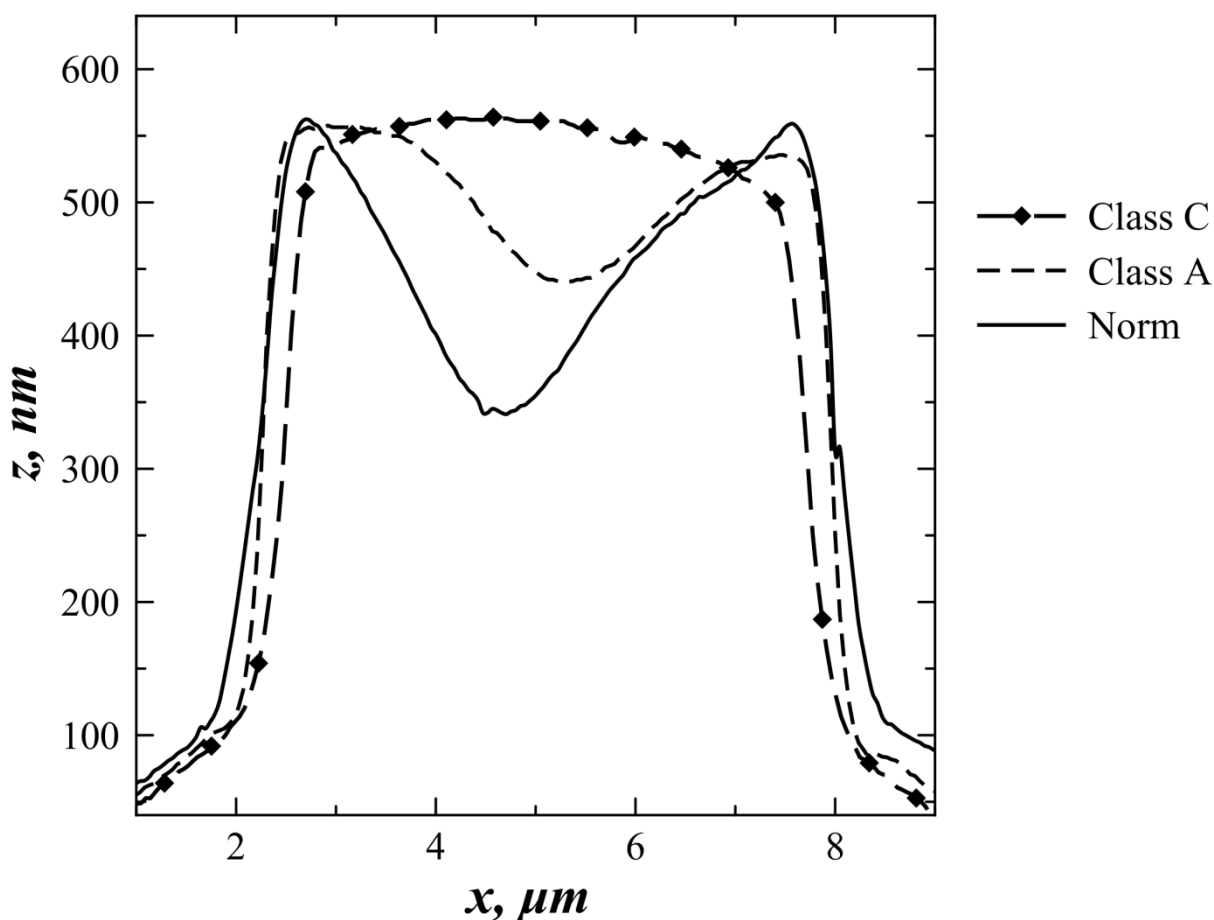


Рис.2. Полученный при помощи АСМ поперечный срез трехмерного изображения морфологии эритроцита при разной степени механической желтухи и в норме.

Понятно, что разброс по размерам эритроцитов будет существовать в выборках образцов, как в норме, так и при патологии, что важно при использовании формул (1) и (2). В табл.1 приведены средние величины площади и объема эритроцита по измерениям на АСМ микроскопе. Видно, что средняя площадь эритроцита практически не изменяется, в то время как объем эритроцитов существенно растет. Рост объема эритроцитов в выборке на скане в соответствии с предыдущими данными связан с изменением прогиба в мембране и, соответственно, ростом внутриклеточного давления [5,6,9]. На рис.3 представлены

гистограммы распределения эритроцитов по объему, который вычислялся как разница объема под фигурой эритроцита и объема под плоскостью, на которой лежит эритроцит. Для упрощения анализа данных гистограммы на рис.3 представлены как функции сплайна по трем соседним точкам. Видно, что значения объемов в норме лежат в диапазоне 5-10 μm^3 , что на порядок меньше показателя объема эритроцита в физиологическом растворе. Как известно [13,14], измерение методами АСМ наиболее часто проходят в воздушной среде, в которой эритроцит теряет до 70 % массы и объема из-за потери воды. В результате форма эритроцита не меняется, а его объем на 95-99% заполнен гемоглобином [13,15].

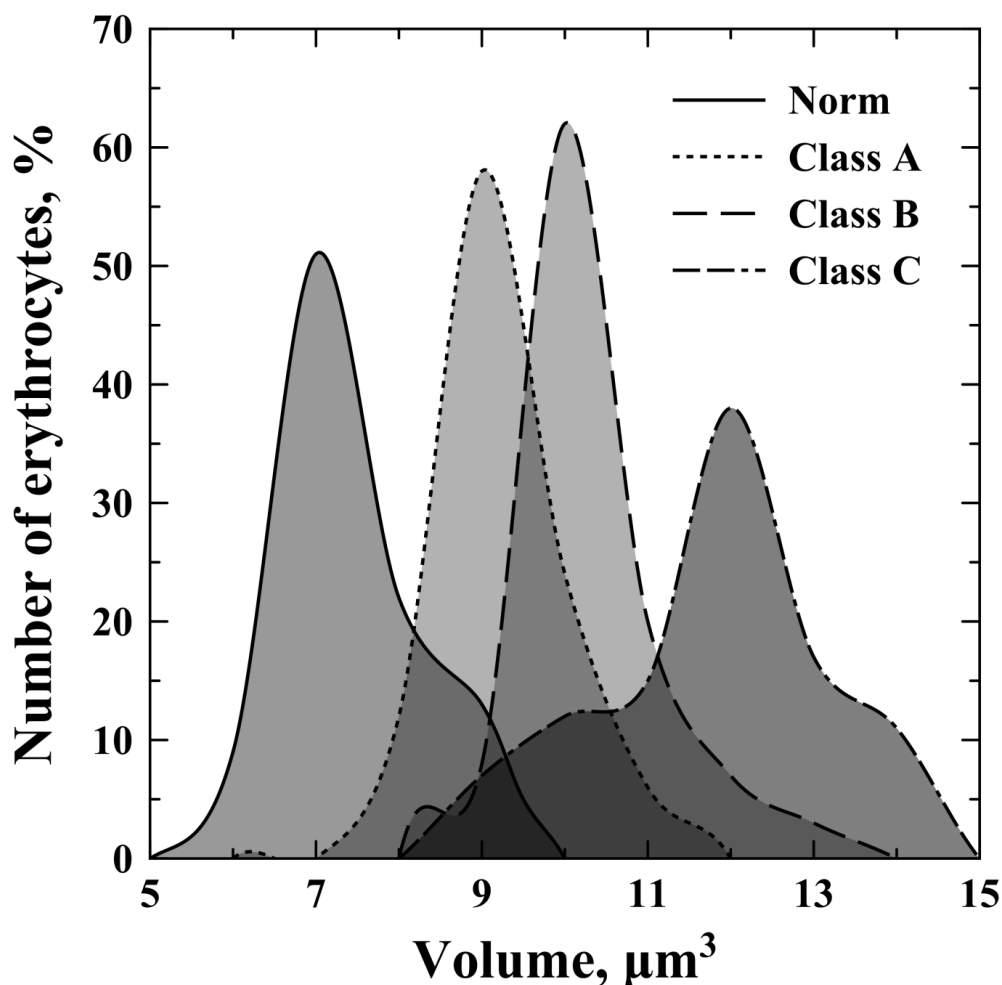


Рис.3. Гистограммы распределения эритроцитов по величине их объема, вычисленного по данным АСМ мазков крови животных в норме, а также при заболевании механической желтухой класса А, В и С. Точки на рисунке соединены сплайн-линией.

При сравнении гистограмм распределения объемов эритроцитов для механической желтухи с различной степенью заболевания видно, что происходит увеличение среднего объема с ростом степени заболевания (рис.3). При этом для класса С происходит также существенное увеличение полуширины распределения, что, вероятно, обусловлено разрушением мембраны эритроцитов (табл.1). Для вычисления внутриклеточного давления брались только усредненные значения объемов, как наиболее показательные для данного класса заболевания. Интересно, что распределения объемов эритроцитов по

размерам для разных степеней заболевания пересекаются в относительно небольшом участке $7-10 \mu\text{m}^3$ (рис.3), в то время как распределения площадей оснований эритроцитов лежат строго в одном диапазоне $19.5-33 \mu\text{m}^2$, причем минимальный и средний размер площади увеличивается не существенно (табл.1). В результате экспериментальные данные возможно использовать для вычислений внутриклеточного давления по формулам (1) и (2). Как показали вычисления (табл.1) для среднего эритроцита происходит монотонное увеличение внутриклеточного давления с 0 для нормы до 6.3 кПа для класса С.

Таблица. 1. Экспериментальные данные атомно-силовой микроскопии эритроцитов при разной степени механической желтухи и в норме, а также результаты расчетов внутриклеточного давления.

Степень механической желтухи	Площадь эритроцитов, μm^2	Объем эритроцитов, μm^3	Отношение объема к объему в норме, %	Внутриклеточное давление, кПа
Норма	25.0 ± 2.2	7.5 ± 2.0	100.0 ± 26.7	0
Класс А	24.7 ± 2.4	8.8 ± 1.3	117.3 ± 17.4	1.6
Класс В	25.4 ± 2.7	10.2 ± 1.9	136.0 ± 25.2	3.4
Класс С	26.7 ± 2.9	12.3 ± 2.6	164.0 ± 29.3	6.3

Представляет интерес вычисления внутриклеточного давления для каждого эритроцита на АСМ скане, что возможно при автоматизированном расчете с применением специально разработанного программного обеспечения. Для этого требуется задать базу данных выборки АСМ сканов для эритроцитов в норме, в которую должны входить как можно больший разброс эритроцитов по площади основания для корректного применения формул (1) и (2). В этом случае ошибка вычислений будет зависеть только от разницы S и S_0 в формуле (2), что минимизируется большим числом измерений эритроцитов в норме. Именно поэтому на данном этапе были проведены вычисления внутриклеточного давления только для средних размеров эритроцитов (табл.1), поскольку вопрос погрешности измерений ΔP лежит в области разработки программного обеспечения и корректного автоматизированного ввода начальных данных. Однако на данном этапе можно сказать, что погрешность измерения зависит от погрешности измерения площадей оснований эритроцитов и правильности выбранного соотношения $S_0/S=1$ в формуле (2), погрешность которого будет линейно влиять на величину расчетного значения ΔP .

Как было показано в работах [5,9] внутриклеточное давление ΔP определяется реактивным давлением, создаваемым мембраной эритроцита. В связи с этим представляет интерес сравнить состояние мембраны эритроцита с изменениями величины внутриклеточного давления.

ИЗМЕНЕНИЯ В МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ РОСТЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ДАВЛЕНИЯ

Механическая желтуха характеризуется тем, что при повышении класса заболевания в крови животных растет концентрация билирубина, который разрушает мембрану

эритроцитов, проникает внутрь эритроцитов, распространяется по организму и приводит к накоплению в печени и других органах [16]. Концентрация билирубина в норме 3-5 $\mu\text{mol/l}$, при механической желтухе класса А – 9-11 $\mu\text{mol/l}$, при механической желтухе класса В – 33-37 $\mu\text{mol/l}$, класса С – 95-100 $\mu\text{mol/l}$. При этом происходит разрушение клеток печени и изменения в иммунном ответе организма [16], что проявляется в повышении фермента гамма-глутамилтранспептидазы, который при норме до 32 единиц на литр вырастает до 41; 103 и 350 единиц на литр соответственно с повышением класса заболевания, что свидетельствует о цитолизе гепатоцитов и постепенном разрушении печени в целом. Таким образом, при повышении класса заболевания механической желтухой одновременно происходит увеличение внутриклеточного давления в эритроцитах, а также разрушение клеток печени под действием фермента.

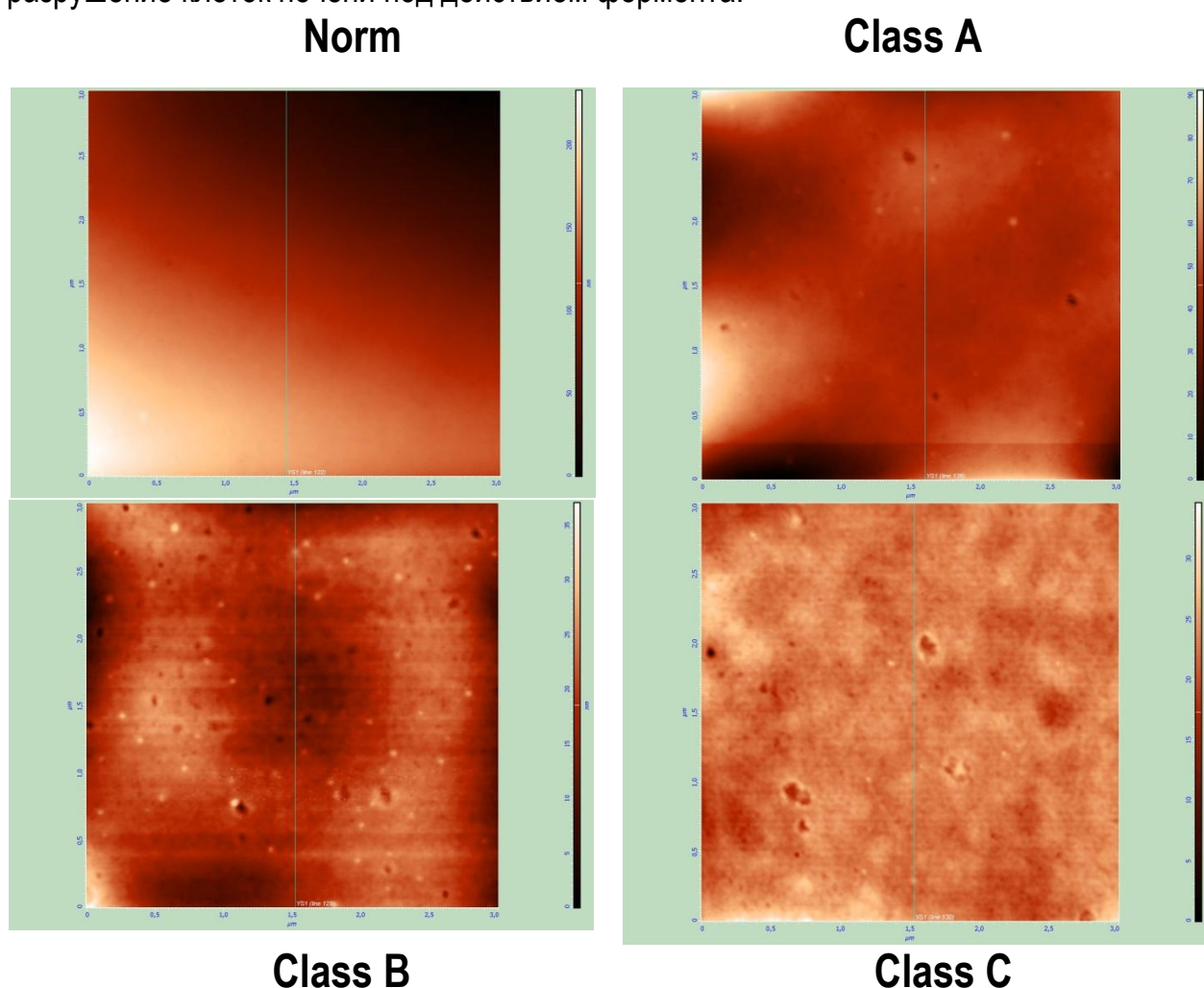


Рис.4. Сканы поверхности мембраны эритроцита, полученные при помощи атомно-силовой микроскопии с размером изображения $3 \times 3 \mu\text{m}$, для эритроцитов с различным уровнем механической желтухи и для нормы.

На АСМ сканах эритроцитов видно, что с ростом степени заболевания происходит рост как количества так и размеров нарушений в мембране (рис.4). На рис.5 и 6 показаны нормированные распределения числа разрушений в мембране эритроцитов по их размерам. Процентное соотношение числа нарушений в диапазонах 0-50, 50-100, 100-150, 150-200 нм показывает (рис.5), что нарушения с размерами до 50 нм в основном

встречаются в эритроцитах в норме. Нарушения с размерами 50–100 нм преимущественно возникают в эритроцитах при механической желтухе класса А и В, а с размерами 100-200 нм – класса В и С. Распределения нарушений в мембране по размерам (рис.6) показывают, что максимум для степени заболевания класса А (75-100 нм) находится правее, чем максимум для класса В (50-75 нм). С другой стороны количество нарушений в мембране эритроцита при желтухе класса А в 3.5 раза меньше, чем при желтухе класса В (в среднем 9 разрывов мембраны на эритроцит против 2.4 при классе А). Кроме этого распределение длин разрывов при классе А ограничено величиной 110 нм, а при классе В – 175 нм. На рис.4 также хорошо видно, что нарушений при классе В существенно больше, чем при классе А.

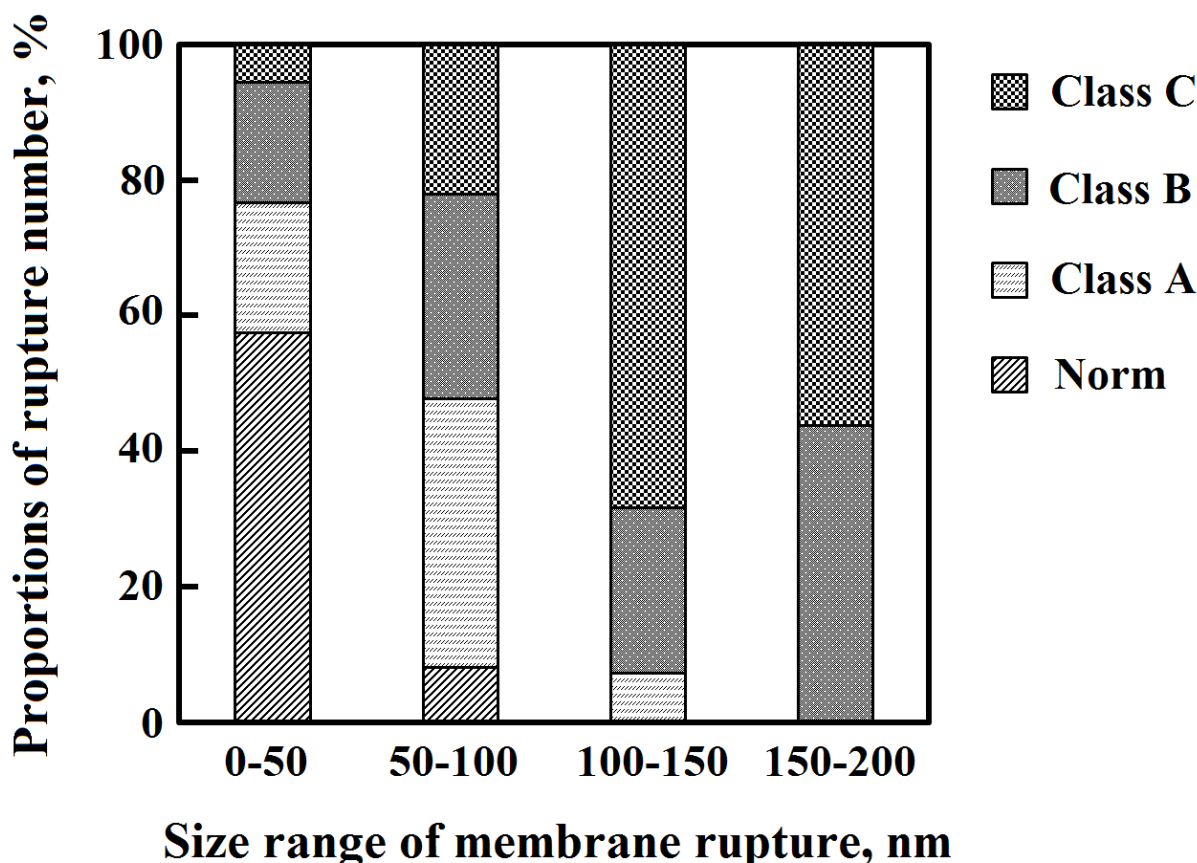


Рис.5. Процентное соотношение числа разрушений в мембране в диапазонах 0-50, 50-100, 100-150 и 150-200 нм для мембран эритроцитов с различным уровнем механической желтухи и в норме.

Можно предположить, что рост внутриклеточного давления эритроцитов обусловлен постепенным разрушением мембраны эритроцитов, проникновением билирубина внутрь эритроцитов, а также изменением упругих свойств липидного бислоя из-за разрывов в мембране. Внутриклеточное давление эритроцитов может являться показателем состояния мембраны клеток крови и клеток печени при механической желтухе, а также при других заболеваниях, связанных с работой ионных каналов мембран клеток. В частности, при заболеваниях астмы и хронических обструктивных болезнях легких, а также при активном табакокурении происходят изменения не только в органах дыхательных путей, но и в форме эритроцитов [17]. Так по данным работ [17,18] происходят изменения в морфофункциональных характеристиках циркулирующего пула эритроцитов у курящих

больных бронхиальной астмой, заключающиеся в том, что часть эритроцитов не имели впадины. Проведённые исследования выявили [17], что у циркулирующего пула эритроцитов курение в ответ на дополнительное снижение оксигенации крови приводит к компенсаторному усилению гемоглобинообразования, способствует анизоцитозу, увеличению объёма эритроцитов с более высоким содержанием в них гемоглобина. Отдача кислорода при этом в ткани замедляется, что свидетельствует о нарушениях в работе ионных каналов эритроцитов и повышенном внутриклеточном давлении.

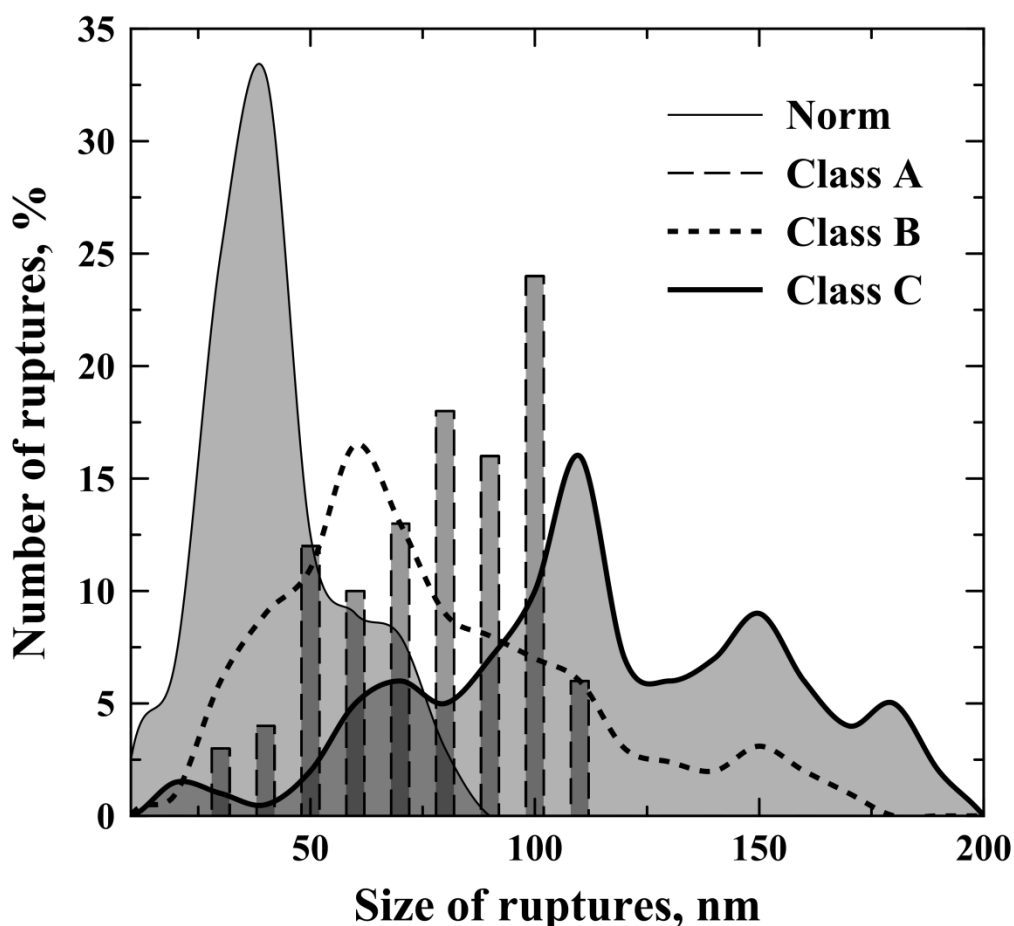


Рис.6. Распределение числа разрушений в мембране по линейным размерам для мембран эритроцитов с различным уровнем механической желтухи и в норме.

Приложение метода определения внутриклеточного давления в медицине и биологии представляется перспективным. Помимо упомянутых желтухи, астмы, хронических заболеваний легких, представляет интерес исследование влияния различных факторов на мембрану клеток при онкологии. Ионный перенос через клеточную мембрану играет решающую роль в функциях опухолевых клеток, таких как регулирование объема клетки, миграция, клеточный цикл, пролиферация клеток, а также гибель клеток [19]. Все функции являются критически важными для выживания опухолевых клеток и формирования метастаз. Ионные каналы раковых клеток активируются с помощью факторов роста и гормонов [19], что является необходимым для выживания опухолевых клеток. В результате

наиболее перспективным направлением поиска противоопухолевых препаратов является поиск действующих веществ, направленных на ионные каналы соответствующей опухоли [20]. При этом происходит поиск ионных каналов, которые могут быть использованы в качестве мишени в клинике для подавления роста опухоли, и которые не нарушают функции для других клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование мембраны эритроцитов экспериментальных животных, которое показало разрушение мембраны при механической желтухе с ростом концентрации билирубина. На основе данных атомно-силовой микроскопии проведены измерения линейных размеров эритроцитов в норме и при механической желтухе класса А, В и С. Показано, что с ростом воздействия билирубина на мембрану происходит изменение морфологии эритроцита, уменьшение центрального изгиба мембраны и, соответственно, увеличение объема эритроцита. Интересно, что при этом изменение площади оснований эритроцитов практически не происходит, что соответствует численному расчету механической модели эритроцита. На основании экспериментальных АСМ данных был проведен расчет внутриклеточного давления в эритроцитах при разной степени механической желтухи. Полученные результаты показали, что внутриклеточное давление является чувствительным параметром к состоянию мембраны эритроцита и отражает процесс ее разрушения.

Наиболее перспективным направлением дальнейших исследований и приложения разработанного метода является взаимосвязь объема клетки и внутриклеточного давления эритроцитов с работой различных ионных каналов при онкологических заболеваниях. В этой связи поиск наиболее эффективных лекарственных препаратов для изменения внутриклеточного давления, объема клеток и активности их ионных каналов является перспективным при изучении раковых клеток

Литература:

1. Tu Z.C., Zhong-can Ou-Ya. // J. Comput. Theor. Nanosci. 2008. V.5. P. 422.
2. Naito H., Okuda M., Zhong-can Ou-Ya. // Phys. Rev. E. 1996. V. 54. N 3. P. 2816.
3. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Хейфец Б.Б., Акимов С.А. // Письма в ЖЭТФ. 2012. Т. 96. N 10. С. 756. (Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Kheyfets B.B., Akimov S.A. // JETP Letters. 2012. V. 96. N 10. P. 681).
4. Zhong-can Ou-Ya., Helfrich W. // Physical review A. 1989. V. 39. N 10. P. 5280.
5. Калягина Н.В., Мартынов М.В., Атауллаханов Ф.И. // Биологические мембраны. 2013. Т. 30. N 2. С. 115. (Kalyagina N.V., Martinov M.V., Ataulakhanov F.I. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2013. V. 7. N 2. P. 122.)
6. Martinov M.V., Vitvitsky V.M., Ataulakhanov F.I. // Biophys. Chem. 1999. V. 80. P. 199.
7. Lew V.L., Bookchin R.M. // J. Membr. Biol. 1986. V.92. P. 57.
8. Asghari-Khiavi M., Wood B.R., Mechler A. et al // Analyst. 2010. V. 135. P. 525.
9. Атауллаханов Ф.И., Корунова Н.О., Спиридонов И.С. и др. // Биологические мембраны. 2009. Т. 26. С. 163. (Ataulakhanov F.I., Korunova N.O., Spiridonov I.S. et al // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2009. V. 3. N 2. P. 101).

10. Nagornov Yu.S. // Applied Cell Biology. 2014. V.3. N 1. P. 1.
11. Нагорнов Ю.С. // Российский журнал биомеханики. 2013. Т.17. N 3(61). С.112. (Nagornov Yu.S. // Russian Journal of Biomechanics. 2013. V. 17. N 3 (61). P. 96).
12. Нагорнов Ю.С., Жиляев И.В. // Математическая морфология. Электронный математический и биомедицинский журнал. 2013. Т.12. N 1.
13. Дрозд Е.С., Чижик С.А., Константинова Е.Э. // Российский журнал биомеханики. 2009. Т. 13. N 4 (46). С. 22. (Drozdz E.S., Chizhik S.A., Konstantionva E.E. // Russian Journal of Biomechanics. 2009. V. 13. N 4 (46). P. 21).
14. Nowakowski R., Luckham P. // Surface and Interface Analysis. 2002. V. 33. N 2. P. 118.
15. Dulinska I., Targosz M. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2006. V. 66 (1-3). P. 1.
16. Винник Ю.С., Пахомова Р.А., Серова Е.В. // Сибирский медицинский журнал. 2012. Т. 27. N 3. С. 116.
17. Гноевых В.В., Смирнова А.Ю., Нагорнов Ю.С., Шалашова Е.А., Куприянов А.А., Портнова Ю.А. // Medline.ru. 2011. Т. 12. № 1. С. 261.
18. Гноевых В.В. Дисфункции пульмо-кардиальной системы при табакокурении у лиц молодого возраста и хронические обструктивные заболевания легких // Автореферат дисс. д.мед. наук. Ульяновский государственный университет. Ульяновск, 2007. 41 с.
19. Lang F., Stournaras Ch. // Phil. Trans. R. Soc. B. 2014. V. 369. N 1638. P. 20130108.
20. Bomben V.C., Sontheimer H. // Glia. 2010. V.58. P. 1145.



Nagornov Ju.S. Metod opredelenija vnutrikletchnogo davlenija jeritroцитов po dannym atomno-silovoj mikroskopii. Chast' 2. Jeksperimental'nye issledovanija // Nauka. Mysl'. - 2016. - №6-2.

© Ю.С. Нагорнов, 2016.
© «Наука. Мысль», 2016.

— ● —

Abstract. Based on the data of atomic force microscopy scan of red blood cells, we carried out experimental verification of the method of calculation of the intracellular pressure. We have calculated the intracellular pressure erythrocytes of experimental animals at different degrees of obstructive jaundice. It is shown that with increasing concentrations of bilirubin in the blood erythrocyte membrane disruption occurs, the average increase in volume and a substantial increase in intracellular pressure.

Keywords: atomic force microscopy, biology, medicine, blood, erythrocytes, intracellular pressure.

— ● —

Сведения об авторах

Юрий Сергеевич **Нагорнов**, старший научный сотрудник, кандидат физико-математических наук, доцент. Тольяттинский государственный университет (Тольятти, Россия).

— ● —

Подписано в печать 20.05.2016.
© Наука. Мысль, 2016.