

УДК 576.3

**СКОРКИНА М.Ю.
SKORKINA M.YU.****МОРФОЛОГИЯ И УПРУГО-ЭЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЛЯГУШЕК****MORPHOLOGY AND ELASTIC PROPERTIES OF ERYTHROCYTES
SURFACE IN FROGS****Аннотация**

Методом атомно-силовой микроскопии изучены особенности морфологии поверхности и упруго-эластические свойства нативных эритроцитов лягушек. На модели с адреналиновой нагрузкой показано увеличение жесткости клеток на 64% ($p < 0,05$) которое сопровождалось уменьшением числа глобулярных структур на участке мембраны эритроцитов на 50% ($p < 0,05$), а увеличением их высоты на 254% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем. В параллельных опытах с антагонистом адреналина – обзиданом, существенных различий в жесткости клеток и морфологии поверхности не выявлено. Установленная взаимосвязь между упруго-эластическими свойствами и морфологией поверхности может быть использована в качестве диагностического критерия при оценке функционального состояния клетки.

Ключевые слова: эритроциты лягушек; упруго-эластические свойства; рельеф поверхности; атомно-силовая микроскопия.

Abstract

The author has studied the features of morphology and elastic properties of native erythrocytes in frogs with the use of the atomic force microscopy method. On the model of adrenal load, the study demonstrated the increase in the stiffness of cells by 64% ($p < 0.05$) accompanied by the decrease in the number of globular structures on the membrane of erythrocytes by 50% ($p < 0.05$), and their height was increased by 254% ($p < 0.05$) as compared to a control set. In the parallel experiments with antagonist adrenaline – propranolol, the study has not revealed any significant differences in the morphology and elastic properties of the surface. The discovered relationship between elastic properties and morphology of the surface can be used as a diagnostic criterion in the evaluation of the functional state of the cell.

Key words: erythrocytes of frogs; elastic properties; surface relief pattern; atomic force microscopy.

Упругость клеток, их морфология, а также регуляция фундаментальных физиологических процессов зависит от упаковки структур цитоскелета [1]. К настоящему моменту известно, что образование агрегированных доменов и выпячиваний на поверхности мембраны сопровождается концентрацией в этих местах фосфорилированных белков цитоскелета – α -актинина [2]. Однако, элементы цитоскелета определяют не только «рисунок» рельефа поверхности, но и упруго-эластические свойства мембран. Согласно данным параллельных исследований, выполненных на атомно-силовом и конфокальном лазерном сканирующем микроскопе, установлена тесная связь между снижением модуля Юнга в клетках крови больных лейкозом и организацией актиновых филаментов [3]. В связи с чем, представляет особый интерес вопрос о взаимосвязи между морфологией поверхности и ее упруго-эластическими свойствами, что в дальнейшем может послужить важным критерием в оценке функционального состояния клетки неинвазивными методами.

Целью исследования было выявить взаимосвязь между особенностями морфологии и упруго-эластическими свойствами поверхности на модели полноценных ядерных эритроцитов лягушек.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на эритроцитах лягушек *Rana ridibunda Pall.*, находящихся в состоянии физиологического анабиоза. Кровь брали путем пункции сердца, стабилизировали гепарином (5 Ед/мл).

С целью выявления взаимосвязи между упруго-эластическими свойствами и «морфологическим рисунком» поверхности клеток в проведенном исследовании использован метод функциональных нагрузок, включающий инкубацию

клеточных суспензий с адреналином и обзиданом. Выбор адреналина и обзидана, в качестве неселективного блокатора β -адренорецепторов, обусловлен участием β -адренорецепторов в модуляции упруго-эластических свойств клеточной мембраны, посредством фосфорилирования белков цитоскелета [4]. Кроме того, α -адренорецепторы в клетках крови не вовлекаются в регуляцию цАМФ, концентрация которого прямо пропорциональна деформируемости эритроцитов. Адреналиновую нагрузку осуществляли путем инкубации 30 мкл клеточной суспензии в 150 мкл среды Хенкса, содержащей 10^{-9} ммоль/л адреналина в течение 15 мин. Пробу с обзиданом проводили путем инкубации 30 мкл суспензии в 150 мкл среды Хенкса, содержащей 10^{-9} ммоль/л обзидана в течение 15 мин. Инкубацию проб осуществляли при комнатной температуре, по окончании времени воздействия, пробы центрифугировали, 5 мин при 1500 об/мин, надосадочную жидкость убирали и готовили препараты нативных клеток для сканирования.

Морфологию поверхности эритроцитов изучали с использованием атомно-силового микроскопа (АСМ) ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71). Суспензию эритроцитов наносили на чистые обезжиренные стеклянные подложки, которые помещали во влажную камеру [5] для сохранения их жизнеспособности. Проводили сканирование 25 клеток из каждой опытной и контрольной пробы в полуконтактном режиме с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG03, с жесткостью 1,1Н/м и радиусом закругления 10 нм. На полученных сканах с помощью программного обеспечения «Nova» (Зеленоград, 2009) строили

профили поверхности эритроцитов в виде кривых, на которых измеряли габаритные размеры и высоту клеток.

Упруго-эластические свойства эритроцитов в опытных и контрольных образцах крови изучали методом эластографии с использованием модифицированных кантилеверов. Количественно упругость клеток (модуль Юнга) оценивали по экспериментальным силовым кривым, снятым с поверхности клеток при проведении процедуры силовой спектроскопии. Получаемые в эксперименте, силовые кривые преобразовывали из системы координат D-z в систему F-Δh, где D - ток рассогласования фотодиода, z – расстояние, на которое перемещается кантилевер пьезосканером АСМ при подводе к поверхности [6], затем переводили сигнал рассогласования фотодиода в силу взаимодействия зонда и образца по формуле [7]. Модуль Юнга системы образец-игла рассчитывали по формуле [8].

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Экспериментальные данные представлены в виде среднеарифметических значений с их средними

стандартными ошибками. Статистический анализ результатов экспериментов проведен с применением критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости.

Результаты исследования и их обсуждение. Эритроциты лягушек имеют эллипсоидную форму с центрально расположенным ядром, в центре которого наблюдается углубление, связанное с особенностями расположения хроматина - в виде центральных скоплений, реже – по периферии ядра.

Рельеф поверхности нативных эритроцитов лягушек, отсканированных в аутологичной плазме, характеризуется наличием небольшого количества глобулярных образований и углублений в мембране. Углубления представляют собой кластеры, диаметр которых составлял $171,62 \pm 12,25$ нм, глубина – $16,85 \pm 1,25$ нм. Высота глобулярных образований (рис. 1) порядка $48,12 \pm 8,62$ нм, их количество на участке поверхности не превышало $8 \pm 0,02$. Модуль Юнга эритроцитов лягушек составил $2,37 \pm 0,15$ мПа, глубина погружения кантилевера – $694,92 \pm 7,54$ нм.

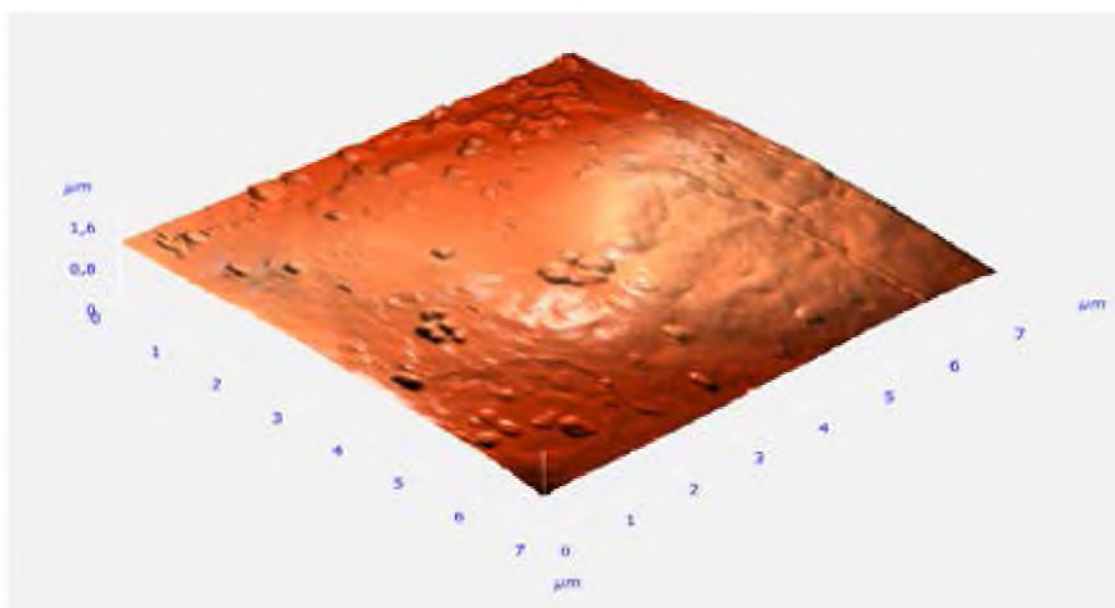


Рис.1. 3-D-скан участка поверхности нативного эритроцита лягушки в плазме: 1- углубления в виде кластеров, 2 – глобулярные выступы

Под влиянием адреналиновой нагрузки эритроциты утратили эллипсоидную форму (рис. 2а), а в пробах с обзиданом клетка вытянулась по длинной оси (рис. 2б) по сравнению с контролем (рис. 2в).

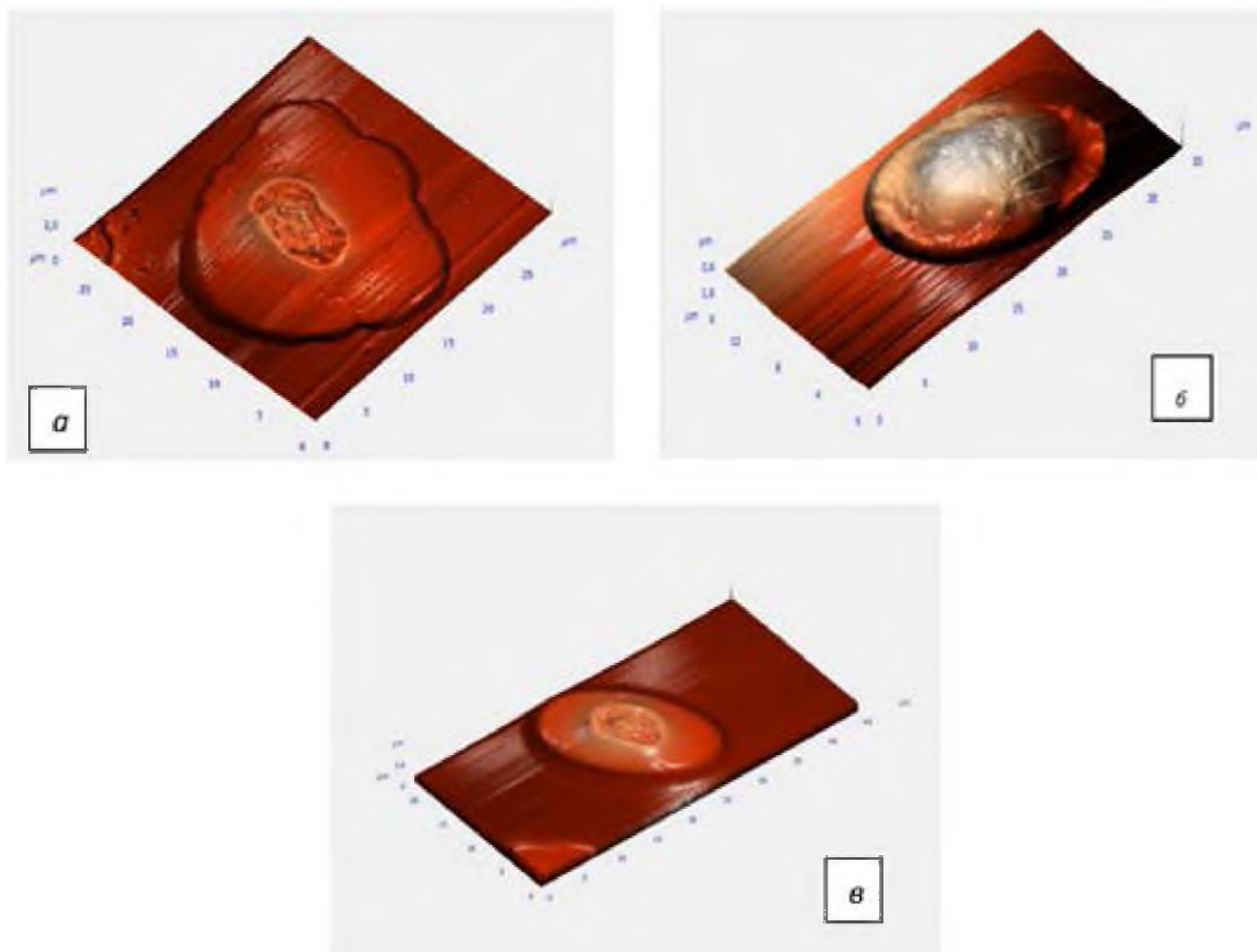


Рис.2. АСМ- изображения нативных эритроцитов лягушки:
а – под влиянием адреналина; б – под влиянием обзидана;
в – контроль (клетки в плазме).

Под влиянием адреналиновой нагрузки на поверхности мембраны глобулярные образования укрупнялись (рис. 3а), по сравнению с контролем (рис. 3в). Под воздействием обзидана визуальных изменений в рельефе участков поверхности не выявлено (рис. 3б).

Под влиянием адреналиновой нагрузки жесткость эритроцитов увеличилась на 64% ($p < 0,05$). при этом количество глобулярных выступов на участке мембраны уменьшилось на 50% ($p < 0,05$), а их высота

возросла на 254% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем (табл. 1).

Количество углублений в мембране клеток возросло на 100% ($p < 0,05$), при этом их диаметр и глубина увеличились соответственно на 358% и 60% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Под влиянием обзидана жесткость клеток достоверно не изменилась по сравнению с контролем, при этом число углублений увеличилось на 12,5% ($p < 0,05$), а их диаметр и высота возросли соответственно на 62% и 76% ($p < 0,05$).

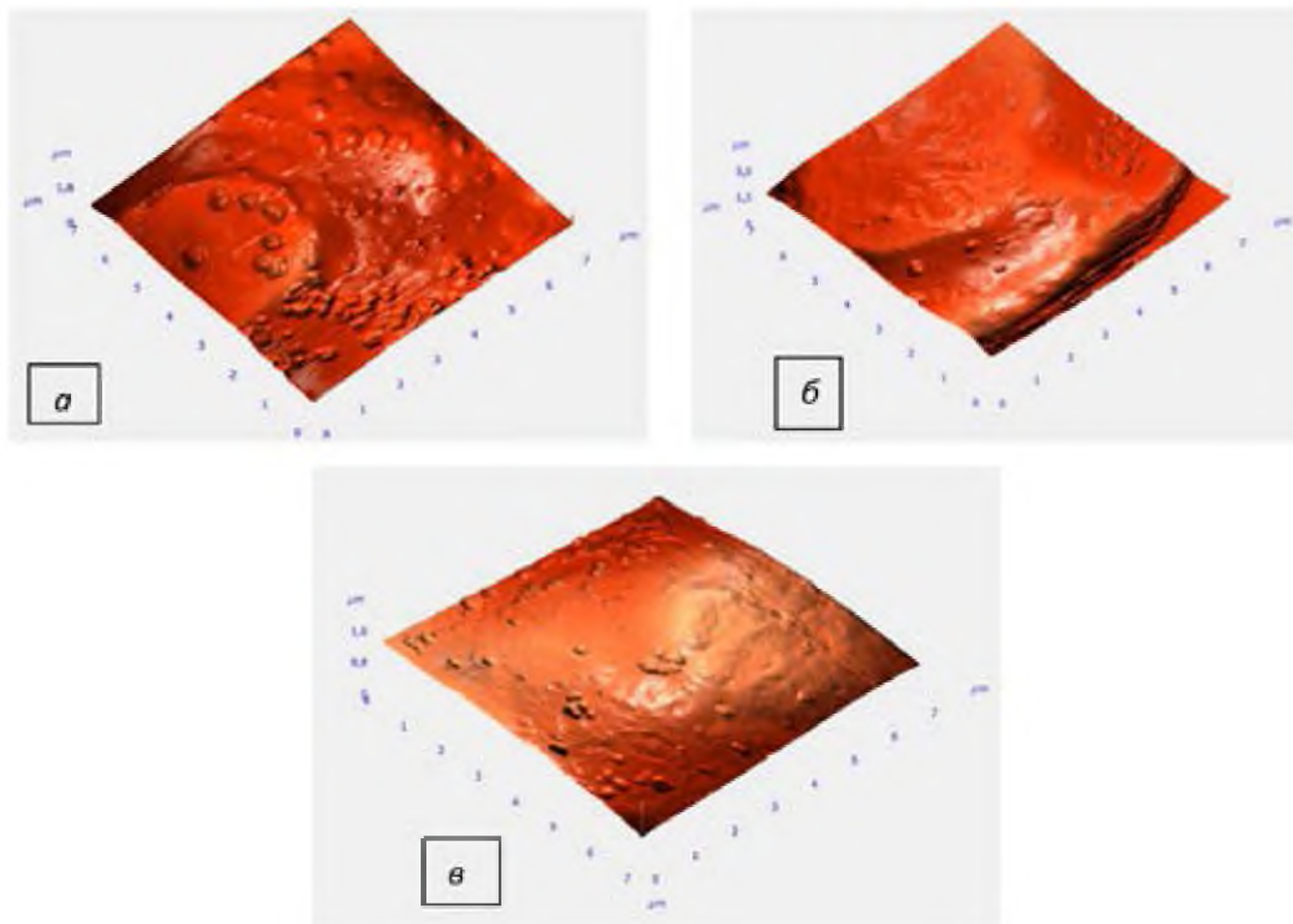


Рис.3. Сканограммы участков мембраны эритроцитов лягушек:
а – под влиянием адреналина; б - под влиянием обзидана; в – контроль.

Таблица 3

**Параметры морфологических образований поверхности
и упруго-эластические свойства эритроцитов лягушек**

Типы структур поверхности		Контроль	Адреналин	Обзидан
Глобулярные выступы	Высота, нм	48,12±8,62	170,24±15,60*	34,69±3,70^
	Количество	24±2,56*	15±1,08*	21±2,04
Углубления в мембране	Диаметр, нм	171,62±12,25	786,12±10,29*	277,67±13,34*
	Глубина, нм	16,85±1,25	26,98±2,23*	29,66±1,38*
	Количество	8±0,2	16±0,4*	9±0,15*
Жесткость	Модуль Юнга, μPa	2,37±0,15	3,89±0,01*	2,16±0,05
	Глубина погружения кантилевера, нм	694,92±7,54	209,23±1,50*	693,11±4,14

* – Достоверность различий между значениями в пробах с адреналином/обзиданом и контролем по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

membranes containing TA-B-cyclodextrin / Ferreira Q., Coelho I.M., Ramalhte N., Marques H.M.C. // Separation Science and Technology. 2006. V. 41 (16). P. 3553-3568.

12. Anderson R., Ramafi G., Theron A.J. Membrane stabilizing anti-oxidative interactions of propranolol and dexpropranolol with neutrophils // Biochemical Pharmacology. 1996. V. 52 (2). P. 341-349.

References:

1. Desai A., Mitchison T. J. - Annu. Rev. Cell Develop. Biol. V.13. (1997): pp. 83-117.

2. Babkov V.N., Bobkov D.E., Petukhova O.A., Turoverova L.V., Kropacheva I.V., Podolskay E.P., Pinaev G.P. *Alfa-aktinin i sub'edinitsa p65/RelA transkriptsionnogo faktora NF-k β v kletkah AU31 lokalizuyutsya sovместno i migriruyut v yadro pri deistvii epidermalnogo faktora rosta // Tsitologiya [Alpha-actinin and p65/RelA Subunit of the Transcription NF-k β Factor in U31 Cells Localize and Migrate into the Nucleus under the Influence of Epidermal Growth Factor // Cytology]. V.46. no. 12 (2004): pp.1065-1073.*

3. Cai X., Xing X., Cai J., Chen Q., Wu S., Haung F. Connection Between Biomechanics and Cytoskeleton Structure of Lymphocyte and Jurkat Cells: An AFM study // PMID. V. 41. no 3 (2010): pp. 257-262.

4. Tuvia S., Moses A., Gulayev N., Levin S., Korenstein R. β -Adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes // J. of Physiol. V. 516 no. 3 (1999): pp. 781-792.

5. Skorkina M.Yu., Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. Evaluation of morphometric parameters of native blood cells by atomic force microscopy // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. V. 150. no. 2 (2010): pp. 238-240.

6. Lebedev D.V., Chulkanov A.P., Buharaev A.A., Druginina O.C. *Izmerenie modulya Junga biologicheskikh ob'ektov v zhidkoi srede s pomoschyu spetsialnogo zonda atomno-silovogo mikroskopa // Pisma v ZhTF [The Assessment of Jung's Modulus of Biological Objects in the Liquid Medium with the Help of a Special Atomic Force Microscope Probe Unit // Letters in Journal of Theoretical Physics]. V. 35. no. 8 (2009): pp. 54-61.*

7. Butt H.J., Capella B., Kappl M. Force

measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and application // Surf. Sci. Rep. V.59 (2005): pp. 1-152.

8. Capella B., Dietlr G. Force-distance curves by atomic force microscopy // Surf. Sci. Rep. // Surf. Sci. Rep. V.34 (1999): pp. 1-104.

9. Hilario S., Saldanha C., Martins S.J. An in vitro study of adrenaline effect on human erythrocyte properties in both gender // Clinical hemoreology and microcirculation. V.28. no. 2 (2003): pp. 89-98.

10. Dumplis M.A., Kudryashova N.I. *Antiaritmicheskie sredstva: klassifikatsiya, struktura, mekhanizm deistviya // Khimiko-farmatsevticheskiy Zhurnal [Antiarrhythmics: Classification, Structure, Mechanism of Action // Chemical and Pharmacol. Journal]. no. 10 (1983): pp. 1159-1169.*

11. Ferreira Q., Coelho I.M., Ramalhte N., Marques H.M.C. Resolution of racemic propranolol in liquid membranes containing TA-B-cyclodextrin // Separation Science and Technology. V.41. no.16 (2006): pp. 3553-3568.

12. Anderson R., Ramafi G., Theron A.J. Membrane stabilizing anti-oxidative interactions of propranolol and dexpropranolol with neutrophils // Biochemical Pharmacology. V. 52 no. 2 (1996): pp. 341-349.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Скоркина Марина Юрьевна

кандидат биологических наук, доцент

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015,
Россия

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

DATA ABOUT THE AUTHOR

Skorkina Marina Yuryevna

PhD in Biology, Associate Professor

Belgorod State National
Research University

85, Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

В целом, в условиях адреналиновой нагрузки существенно возрастает жесткость эритроцитов параллельно с этим в рельефе поверхности установлено снижение числа глобулярных структур, высота которых увеличивается. В параллельных опытах с обзиданом жесткость клеток, а также морфология глобулярных структур достоверно не различались по сравнению с контролем.

Выявленные морфологические изменения поверхности мембраны эритроцитов могут быть связаны с участием в метаболизме катехоламинов – выполнять функцию транспортировки и депо адреналина. В экспериментах на эритроцитах человека установлено, что отдельные участки поверхности могут выступать резервуарами для адреналина и норадреналина, регулируемыми парциальное давление кислорода в процессах оксигенации [9].

В противоположность, наблюдаемые изменения рельефа поверхности в условиях блокады β -адренорецепторов, вероятнее всего, связаны с высоким средством обзидана к липидному бислою мембран, который оказывает мембранно-стабилизирующее действие [10]. На нейтрофилах показано: проникая в липидный бислой, обзидан изменяет его свойства [11], подавляет аденилатциклазу и уменьшает образование цАМФ [12].

Заключение. Изменения морфологии и рельефа поверхности клеток тесно связаны с упруго-эластическими свойствами клеточных мембран. Увеличение жесткости эритроцитов сопровождается снижением числа глобулярных структур на поверхности мембраны, причем высота их существенно возрастает. Выявленная взаимосвязь имеет большое значение в области диагностики функционального состояния клетки неинвазивными методами.

Литература:

1. Desai A., Mitchison T. J. Microtubule polymerization dynamics // *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 1997. V.13. P. 83-117.
2. Альфа-актинин и субъединица p65/RelA транскрипционного фактора NF- κ B в клетках AU31 локализуются совместно и мигрируют в ядро при действии эпидермального фактора роста / Бабаков В.Н., Бобков Д.Е., Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева И.В., Подольская Е.П., Пинаев Г.П. // *Цитология.* 2004. Т. 46 (12). С. 1065-1073.
3. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study / Cai X., Xing X., Cai J., Chen Q., Wu S., Haung F // *PMID.* 2010. V. 41(3). P. 257-262.
4. β -Adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes / Tuvia S., Moses A., Gulayev N., Levin S., Korenstein R. // *J. of Physiol.* 1999. V. 516 (3). P. 781-792.
5. Evaluation of morphometric parameters of native blood cells by atomic force microscopy / Skorkina M.Yu., Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010. V. 150(2). P. 238-240.
6. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа / Лебедев Д.В., Чулканов А.П., Бухараев А.А., Дружинина О.С. // *Письма в ЖТФ.* 2009. Т. 35 (8). С. 54-61.
7. Butt H.J., Capella B., Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and application // *Surf. Sci. Rep.* 2005. V. 59. P. 1-152.
8. Capella B., Dietlr G. Force-distance curves by atomic force microscopy // *Surf. Sci. Rep.* 1999. V. 34. P. 1-104.
9. Hilario S., Saldanha C., Martins S.J. An in vitro study of adrenaline effect on human erythrocyte properties in both gender // *Clinical hemoreology and microcirculation.* 2003. V.28 (2). P. 89-98.
10. Думплис М.А., Кудряшова Н.И. Антиаритмические средства: классификация, структура, механизм действия // *Химико-фармацевтический журнал.* 1983. №10. С.1159-1169.
11. Resolution of racemic propranolol in liquid