

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МЕМБРАНЫ У ПОЖИЛЫХ ЛИЦ*

Е.А. Сладкова¹, Н.И. Жернакова², М.Ю. Скоркина¹, А.А. Грищенко²

*ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Медицинский институт, ¹кафедра биохимии; ²кафедра семейной медицины*

Эритроцитарные мембраны являются уникальным объектом, позволяющим проследить изменения ультраструктуры и биофизических свойств мембран при старении организма. Целью работы явилось изучить особенности ультраструктурной организации и биофизические свойства эритроцитарной мембраны у лиц пожилого возраста. В работе использован метод атомно-силовой микроскопии для оценки цитоархитектоники, упруго-эластических, электрических и адгезивных свойств клеточной поверхности. В результате выполненного исследования установлено наличие немногочисленных морфологических образований, представленных в виде глобулярных структур и углублений на поверхности эритроцитов пожилых людей. Для эритроцитов характерен отрицательный заряд мембраны ($-49,4 \pm 3,8$) мВ, модуль Юнга составил ($3,94 \pm 0,2$) мПа. Измерены силы адгезии в системе «эритроцит – эритроцит» ($27,9 \pm 0,6$) нН, в системе «эритроцит – лейкоцит» ($59,4 \pm 0,5$) нН. Полученные экспериментальные данные открывают возможности для разработки принципиально новых подходов в изучении функциональных свойств плазмалеммы клеток крови на различных этапах онтогенеза.

Ключевые слова: эритроцитарная мембрана, атомно-силовая микроскопия, ультраструктура поверхности, адгезия, упруго-эластические свойства, поверхностный потенциал.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-3(71)-66-69

ULTRASRTRUCTURAL FEATURES AND PROPERTIES OF ERYTHROCYTE'S MEMBRANE IN THE ELDERLY PEOPLE

E.A. Sladkova¹, N.I. Zhernakova², M.Yu. Skorkina¹, A.A. Grishenko²

*FSAEI HE «Belgorod State National Research University», Medical Institute,
¹Department of Biochemistry; ²Department of Family Medicine*

Erythrocytes' membranes are unique subjects allowing tracing the changes of the ultrastructure and biophysical properties of membrane ageing. The goal of this study is the investigation of the features of the ultrastructural organization and biophysical properties of the membrane's erythrocyte in the elderly people. In the work was used the method of atomic force microscopy for the estimation of the relief and elastic properties, electrical and adhesive properties of a cell's surface. In the results of the study has been established the availability of a few morphological formations in the form of globular structures and deepening on the surface's erythrocyte of the elderly people. For the erythrocytes were the negative charge of membrane ($-49,4 \pm 3,8$) mV, Young's module was ($3,94 \pm 0,2$) mPa. It was measured the adhesive forces in the system «erythrocyte – erythrocyte» ($27,9 \pm 0,6$) nN and in the system «erythrocyte – leukocyte» ($59,4 \pm 0,5$) nN. The obtained data open up new opportunities for the development of the fundamentally new approaches in the study of functional properties of cells' plasmalemma on the various stage of ontogenesis.

Key words: membrane's erythrocyte, atomic force microscopy, ultrastructure of a surface, adhesion, elastic properties, surface potential.

Возрастные патофизиологические механизмы старения на клеточном уровне тесно связаны с особенностями организации и функционирования биологических мембран. Процесс старения сопровождается нарушением механизмов межклеточного взаимодействия в мелких капиллярах микросудистого русла, что, в итоге, приводит к развитию возраст-ассоциированных патологий в виде атеросклеротических бляшек, тромбов и т. п. [10]. Это обстоятельство предполагает поиск и разработку новых способов ранней диагностики функциональных нарушений на клеточном уровне. Использование технологий атомно-силовой микроскопии (АСМ) в медико-биологических исследованиях открывает возможности для разработки принципиально новых подходов в изучении функциональных свойств плазмалеммы клеток крови на различных этапах

онтогенеза. Результаты АСМ-сканирования интегрируют данные о морфологии нативной клеточной поверхности с ее биофизическими свойствами, такими как жесткость, сила клеточно-поверхностного или клеточно-клеточного взаимодействия [3], а также потенциал поверхности [9].

Особая роль в оценке патологических сдвигов принадлежит эритроцитам, метаболический статус которых отражает редокс-потенциал организма в целом. Эритроцитарные мембраны являются уникальным объектом, позволяющим проследить изменения ультраструктуры и биофизических свойств клеточной поверхности при старении организма. Использование биофизического подхода в исследовании возрастных изменений организма приобретает особую актуальность в связи с развитием диагностикомов нового поколения, основанных на достижениях молекулярной медицины.

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ по мероприятию «Проведение инициативных исследований молодыми учеными», 2018–2020 гг., соглашение № 18-75-00041

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить особенности ультраструктурной организации и биофизические свойства эритроцитарной мембраны у лиц пожилого возраста.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе кафедр биохимии и семейной медицины Медицинского института НИУ БелГУ. Изучены особенности ультраструктурной организации и свойств 80 эритроцитарных мембран пожилых пациентов в возрасте от 65–75 лет, находящихся на лечении в терапевтическом отделении Белгородской центральной районной больницы с. Стрелецкое (г. Белгород). В исследование включали пациентов без выраженных тяжелых патологий (метаболический синдром, сахарный диабет, онкологические заболевания), не принимающих фармакологические препараты, оказывающие влияние на гемопозитическую функцию системы крови.

Забор крови проводили с участием специализированного медперсонала в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА К₃ в концентрации 2,0 мг (0,006843 моль/литр) на 1 мл крови. Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинкской декларации. Получено информированное согласие всех субъектов эксперимента в соответствии с рекомендациями (Декларация по этическим принципам медицинских исследований, в которых участвуют люди, принятая 52-й Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь, 2000 г.).

Ультраструктурные особенности эритроцитарных мембран изучали на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА ВИТА (конфигурация на базе инвертированного микроскопа Olympus IX-71) в режиме полуконтактного сканирования во влажной камере с целью сохранения нативных свойств клеточной поверхности [4]. Сканирование осуществляли с частотой развертки 0,6–0,8 Hz, используя кантилеверы серии NSG03 жесткостью 1,1 Н/м и радиусом закругления 10 нм. Строили кривые профиля участков поверхности размером 3,5×3,5 мкм, на которых измеряли высоту и подсчитывали количество глобулярных выступов, а также измеряли габаритные размеры углублений в мембране.

Упруго-эластические свойства эритроцитов оценивали на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Для работы с клетками использовали модифицированные АСМ-зонды в виде полусфер с радиусом закругления 5 мкм [5]. Модуль Юнга, характеризующий упругость клеток, рассчитывали согласно подходу, изложенному в работе [6].

Электрические свойства эритроцитарной мембраны оценивали, выполняя измерения поверхностного потенциала (ПП) в режиме зонда Кельвина на АСМ. Подготовку клеточной суспензии для измерения и процедуру измерения ПП осуществляли согласно способу, изложенному в работе [8]. В исследовании использовали кантилеверы с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, USA), обработку полученных сканов проводили в программе Nova (NT-MDT, Россия).

Изучение механизмов межклеточной адгезии выполнено на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Для измерения сил межклеточной адгезии между эритроцитом и гранулоцитом конструировали биосенсорный чип, изготовленный на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (USA) согласно способу, изложенному в работе [7]. Выбор эритроцита в качестве биосенсора основан на идее о том, что в микроциркуляторном русле популяция эритроцитов играет ключевую роль в процессе маргинации гранулоцитов к сосудистой стенке и их дальнейшей экстравазии через сосудистую стенку [13]. Силу межклеточной адгезии измеряли в системе «эритроцит – гранулоцит», «эритроцит – гранулоцит», регистрируя силовые кривые с поверхности 80 клеток. Силы адгезии рассчитывали с помощью программного обеспечения Nova (NT-MDT, Зеленоград, 2009).

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. В работе приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки средней (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эритроциты периферической крови людей пожилого возраста в норме правильной округлой формы, имеют четко выраженные границы в области пэлора (рис. а), за счет чего существенно увеличивается площадь поверхности клетки, позволяющая ей эффективно осуществлять адсорбционно-транспортную функцию [2].

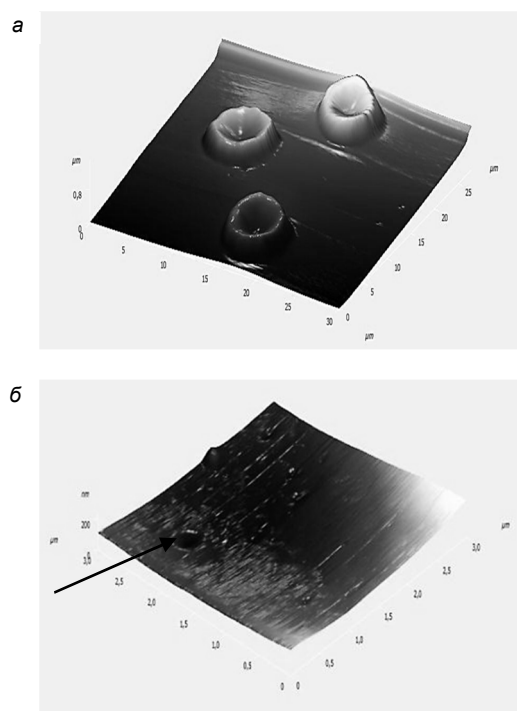


Рис. Сканограммы эритроцитов периферической крови человека (возраст 68 лет):

а – 3D-скан клеток, б – ультраструктурные особенности рельефа поверхности (стрелкой показано углубление плазмалеммы)

При сканировании отдельных участков плазмалеммы выявлены морфологические образования в виде углублений и единичные глобулярные структуры, в целом рельеф клеточной поверхности сглажен (рис. б).

В результате анализа морфометрических данных установлено, что морфометрические параметры эритроцитов у обследованных лиц соответствовали значениям физиологической нормы. Так, средний диаметр эритроцита человека в пожилом возрасте равен $(6,7 \pm 0,08)$ мкм, высота клетки $(3,5 \pm 0,1)$ мкм, площадь поверхности $(79,3 \pm 1,3)$ мкм², объем – $(29,2 \pm 1,15)$ мкм³.

Результаты анализа ультраструктурных особенностей мембраны у лиц пожилого возраста представлены в таблице. Данные таблицы свидетельствуют о немногочисленном присутствии на поверхности мембраны структурных образований, что согласуется со сглаженным рельефом поверхности, наблюдаемым на сканограммах.

Ультраструктурные особенности рельефа эритроцитарной мембраны у лиц пожилого возраста ($n \pm m$)

Структура		Значения ($n = 60$)
Углубления в мембране	Глубина, нм	$160,9 \pm 13,5$
	Диаметр, нм	$192,4 \pm 19,1$
	Число	$4,4 \pm 0,6$
Глобулярные образования	Высота, нм	$131,6 \pm 13,0$
	Диаметр основания, нм	$161,9 \pm 16,3$
	Число	$3,07 \pm 0,6$

Однако размеры углублений на поверхности мембраны существенны и, вероятно, свидетельствуют о структурных перестройках в фосфолипидном слое в результате дефицита энергопродукции и интенсификации процессов свободнорадикального окисления, которые сопровождают процесс старения организма [1].

Для эритроцитарной мембраны людей пожилого возраста установлен отрицательный заряд $(-49,4 \pm 3,8)$ мВ, модуль Юнга, характеризующий жесткость клетки, составил $(3,94 \pm 0,2)$ мПа. Объективным показателем функциональной активности эритроцитарной мембраны является ее адгезивная способность. Сила адгезии в системе «эритроцит – эритроцит» составила $(27,9 \pm 0,6)$ нН, в системе «эритроцит – лейкоцит» – $(59,4 \pm 0,5)$ нН. Жесткость эритроцитарной поверхности влияет на деформируемость клетки и является определяющей характеристикой при ее прохождении через узкие капилляры. Упруго-эластические свойства мембраны в значительной степени зависят от ее микровязкости, определяемой липидным спектром [2]. Согласно данным литературы, микровязкость эритроцитарных мембран увеличивается с возрастом [11], а следовательно, возрастает жесткость клетки и снижается ее способность деформироваться в микроциркуляторном русле, что негативно влияет на тканевой обмен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с использованием метода атомно-силовой микроскопии изучены особенности цитоархитектоники эритроцитарной мембраны, доказано наличие на ее поверхности морфологических структур в виде глобулярных образований и углублений. Биофизические свойства эритроцитарной мембраны – отрицательный заряд клеточной поверхности, жесткость и адгезивная способность позволяют клеткам эффективно функционировать и участвовать в тканевом обмене. Сохранение отрицательного заряда эритроцитарной мембраной – основополагающий признак функциональной активности клетки, позволяющий избегать склеивания эритроцитов и эффективно взаимодействовать с лейкоцитами в микроциркуляторном русле. Дальнейшее изучение ультраструктурных особенностей и биофизических свойств эритроцитарных мембран позволит расширить фундаментальные представления современной физиологии о механизмах формирования сладжей и конгломератов клеток крови в мелких сосудах, которые можно рассматривать как триггерные факторы при развитии атеросклеротических поражений в пожилом возрасте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисовская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее применение при патологиях различного генеза // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3 (73). – С. 334–354.
2. Гареев Р.А. Фундаментальные и прикладные аспекты адсорбционно-транспортной функции эритроцитов // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2011. – № 2 (45). – С. 22–24.
3. Дедков В.Г., Дедкова В.Г. Контактная атомно-силовая микроскопия биологических тканей // Письма в ЖТФ. – 2010. – Т. 36, вып. 3. – С. 76–81.
4. Патент РФ на полезную модель № 98248. Влажная камера для исследования нативных клеток крови / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, С.Д. Чернявских, заявитель и патентообл. БелГУ, заявка № 2010105541, дата приоритета от 16.02.2010.
5. Патент на изобретение РФ № 2466401. Способ определения упругости клеток крови / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Е.А. Сладкова, Н.А. Забиняков, заявитель и патентообл. БелГУ, заявка № 2011109741, дата приоритета от 15.03.2011.
6. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Муравьев А.В., Сладкова Е.А. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 3. – С. 172–175.
7. Скоркина М.Ю., Шамрай Е.А., Сладкова Е.А. Измерение сил адгезии в системе «клетка-клетка» на основе технологий атомно-силовой микроскопии // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 4. – С. 213–215.

8. Сладкова Е.А., Скоркина М.Ю. Оценка поверхностного потенциала лимфоцитов больных лейкозом методом зонда Кельвина // Биофизика. – 2014. – Т. 59, вып. 2. – С. 310–313.

9. Kamruzzahan A.S.M., Kienbergr F., Stroh C.M., Berg J., Huss R. Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM // Biol. Chem. – 2004. – Vol. 385. – P. 955–960.

10. Paudel K.R., Panth N., Kim D-W. Circulating endothelial microparticles: a key hallmark of atherosclerosis progression // Scientifica. – 2016. – Article ID 8514056. – 9 p.

11. Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., et al. Role of membrane lipids in the regulation of erythrocytic oxygen-transport function in cardiovascular diseases // BioMed Research International. – 2016. – Article ID 3429604. – 11 p.

12. Tsuda K. Chronic kidney disease predicts impaired membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects // Int. Hert. J. – 2013. – Vol. 54. – P. 154–159.

13. Verdier C., Couzon C., Duperray A., Singh P. Modeling cell interactions under flow. // J. of Mathem. Biol. – 2009. – Vol. 58. – P. 235–259.

REFERENCES

1. Borisovskaja M.K., Kuznecova Je.Je., Gorohova V.G., Korjakina L.B., Kuril'skaja T.E., Pivovarov Ju.I. Strukturno-funkcional'naja harakteristika membrany jeritrocita i ee primeneniye pri patologijah razlichnogo geneza [Structural and functional characteristic of membrane's erythrocyte and its change at pathologies of various genesis]. *Bjulleten' VSNC SO RAMN* [Bulletein VCSC SD RAMS], 2010, no. 3 (73), pp. 334–354. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Gareyev R.A. Fundamental'nye i prikladnye aspekty adsorbcionno-transportnoj funkcii jeritrocitov [Basic and practical aspects adsorption-transport function of erythrocytes]. *Zdorovie. Medicinskay ekologiya. Nauka* [Health. Medical ecology. The science], 2011, no. 2 (45), pp. 22–24. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Dedkov V.G., Dedkova V.G. Kontaktnaja atomno-silovaja mikroskopija biologicheskikh tkanej [Contact atomic force microscopy of biological tissues]. *Pisma v Z.T.F.* [Letters in ZhTF], 2010, Vol. 36 (3), pp. 76–81. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Patent RF na poleznuyu model' № 98248. Vlazhnaya kamera dlya issledovaniya nativnyh kletok krovi [Wet chamber for the study of native blood cells]. M.Ju. Skorkina,

M.Z. Fedorova, S.D. Chernjavskih, zajavitel' i patentoobl. BelGU, zjavka № 2010105541, data prioriteta ot 16.02.2010.

5. Patent RF na izobreteniye № 2466401. Sposob opredelenia uprugosti kletok krovi [Method for blood cell elasticity test]. M.Ju. Skorkina, M.Z. Fedorova, E.A. Sladkova, N.A. Zabinjakov, zajavitel' i patentoobl. BelGU, zjavka № 2011109741, data prioriteta ot 15.03.2011.

6. Skorkina M.Ju., Fedorova M.Z., Murav'ev A.V., Sladkova E.A. Ispol'zovanie nanomehanicheskogo sensora dlja izuchenija morfofunkcional'nyh svojstv limfocitov zdorovyh donorov i bol'nyh hronicheskim limfoblastnym lejkozom [Use of nanomechanic sensor for studies of lymphocytes from healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia]. *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine* [Cellular Technologies in Biology and Medicine], 2012, no. 3, pp. 172–175. (In Russ.; abstr. in Engl.).

7. Skorkina M.Ju., Shamraj E.A., Sladkova E.A. Izmereniye sil adgezii v sisteme «kletka-kletka» na osnove tehnologii atomno-silovoj mikroskopii [Measuring of adhesion force in the cell-cell system based on atomic force microscopy technology]. *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine* [Cellular Technologies in Biology and Medicine], 2017, no. 4, pp. 213–215. (In Russ.; abstr. in Engl.).

8. Sladkova E.A., Skorkina M.Ju. Ocenka poverhnostnogo potentsiala limfocitov bol'nyh lejkozom metodom zonda Kel'vina [Estimation of surface potential of lymphocytes from patients with leukemia using Kelvin Probe Mode] *Bofizika* [Biophysics], 2014, Vol. 59 (2), pp. 310–313. (In Russ.; abstr. in Engl.).

9. Kamruzzahan A.S.M., Kienbergr F., Stroh C.M., Berg J., Huss R. Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM. *Biol. Chem.*, 2004, Vol. 385, pp. 955–960.

10. Paudel K.R., Panth N., Kim D-W. Circulating endothelial microparticles: a key hallmark of atherosclerosis progression. *Scientifica*, 2016, Article ID 8514056, 9 p.

11. Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., et al. Role of membrane lipids in the regulation of erythrocytic oxygen-transport function in cardiovascular diseases. *BioMed Research International*, 2016, Article ID 3429604, 11 p.

12. Tsuda K. Chronic kidney disease predicts impaired membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects. *Int. Hert. J.*, 2013, Vol. 54, pp. 154–159.

13. Verdier C., Couzon C., Duperray A., Singh P. Modeling cell interactions under flow. *J. of Mathem. Biol.*, 2009, Vol. 58, pp. 235–259.

Контактная информация

Сладкова Евгения Анатольевна – к. м. н., доцент кафедры биохимии, медицинский институт, Белгородский государственный национальный исследовательский университет; e-mail: sladkova@bsu.edu.ru