

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НАТИВНЫХ И ФИКСИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

© М. Ю. Скоркина,<sup>1</sup> М. З. Федорова, С. Д. Чернявских,  
Н. А. Забиняков, Е. А. Сладкова

Белгородский государственный университет;  
<sup>1</sup> электронный адрес: skorkina@bsu.edu.ru

Методом силовой спектроскопии проведен количественный анализ упругих свойств нативных клеток. Установлено, что наиболее высокие показатели упругости ядерных (у земноводных) и безъядерных (у млекопитающих) нативных эритроцитов зарегистрированы в их эпи- и перинуклеарном пространстве. При фиксации метанолом и высушивании клеток наибольшие величины модуля упругости смещаются на периферию клеток. Выявленную инверсию эластических свойств эритроцитов необходимо учитывать при оценке морфофункциональных характеристик фиксированных клеток.

**Ключевые слова:** клетка, эритроциты, морфофункциональные параметры, ACM-измерения, упругоэластические свойства, модуль Юнга.

Принятое сокращение: ACM — атомно-силовая микроскопия.

Форма эритроцита является ключевой характеристикой в цепи автогрегуляторных процессов, направленных на поддержание структуры движущейся крови (Катюхин, 1995). Структурной особенностью мембранны эритроцитов является наличие эластичной белковой сети цитоскелета, локализованного на внутренней поверхности липидного матрикса и связанного с интегральными белками (Hansen et al., 1996). Белковый цитоскелет обуславливает поведение мембранны эритроцита как упругого твердого тела (Khodadad et al., 1996).

Для нативных клеток крови интегрально-регуляторным показателем выступают объемные характеристики, которые служат сигналом для трансформации физиологического состояния. Качественной особенностью в объемной регуляции нативных клеток при флуктуации тоничности окружающей среды является возрастание скорости чувствительных к изменению объема ионных потоков (Орлов, Новиков, 1996; Камкин и др., 2006). Экспериментальные результаты, накопленные в области изучения объемных характеристик фиксированных клеток крови, невозможно непосредственно экстраполировать на нативные формы. Это связано с влиянием фиксаторов на структурно-функциональные свойства биомембран.

Для объемной регуляции клетки потенциально важны белки цитоскелета: они придают мемbrane свойства напряженности и метастабильности, кроме того, актин и актиноподобные белки, обладая сократимостью, могут маскировать и модифицировать осмотическое поведение клетки (Milis, 1987). Следовательно, нормализация объема зависит не только от концентрации ионов, создаваемой работой соответствующей транспортной системы, но также от упругоэластических характеристик мембранны и подмембранных белков. Макромолекулы цитоскелета обеспечивают высокую чувствительность клетки к изме-

нению объема и препятствуют свободному току воды в клетку (Chen et al., 1994). Цель настоящего исследования заключалась в сравнительной оценке морфофункциональных свойств нативных и фиксированных эритроцитов методом силовой спектроскопии.

### Материал и методика

В работе использовали ядерные эритроциты лягушек *Rana ridibunda* Pall и безъядерные эритроциты человека. Мазки крови готовили на обезжиренных стеклянных подложках общепринятыми способами. Исследования поверхности клеток выполняли на сканирующем зондовом микроскопе Интегра Вита NT-MDT в режиме полуконтактного сканирования. В работе использовали кремниевые зонды серии NSG03 (NT-MDT) жесткостью 1.1 Н/м с радиусом закругления 10 нм и частотой развертки сканирования порядка 0.6—0.8 Гц.

Для выбора оптимальной методики ACM-измерений использовали несколько режимов исследования и пробоподготовки: 1) сканирование нативных клеток во влажной камере с целью сохранения их жизнеспособности; 2) сканирование на воздухе клеток, фиксированных метанолом; 3) сканирование клеток, фиксированных метанолом, в жидкостной ячейке; 4) сканирование высушенных нефиксированных клеток на воздухе. ACM-измерения выполнены на 30 клетках в каждой из серий.

Упругие свойства эритроцитов изучали методом силовой спектроскопии, регистрируя топографию и карту вертикальных отклонений острия ACM-зонда при наложении нагрузки на клеточную поверхность в 36 локальных участках. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием критерия Стьюдента.

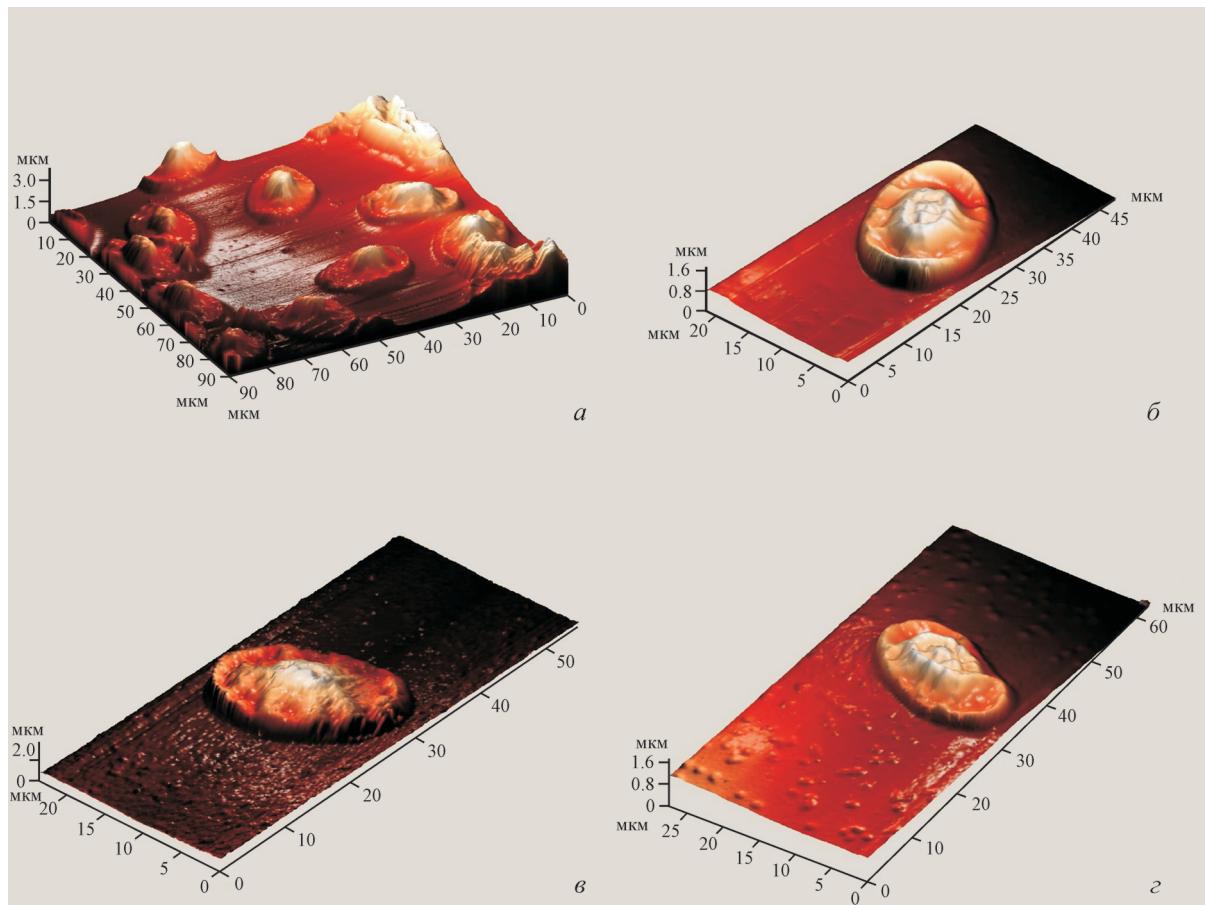


Рис. 1. ACM-изображение эритроцитов лягушки.

*a* — нативная клетка; *б* — клетка, фиксированная метанолом, отсканированная на воздухе; *в* — клетка, фиксированная метанолом, отсканированная в жидкостной ячейке; *г* — клетка нефиксированная, высушеннная и отсканированная на воздухе.

## Результаты

Результаты сканирования ядерных эритроцитов лягушек. На малых и больших полях сканирования получены изображения отдельно лежащих эритроцитов лягушек. Полученные сканы в условиях различной пробоподготовки представлены на рис. 1, *а*—*г*. Величина модуля Юнга (Па), характеризующего упругость клеточной поверхности нативных и фиксированных эритроцитов, представлена в табл. 1. При высушивании мазков на воздухе и фиксации метанолом модуль упругости ядерных эритроцитов возрастает в подмембранных слоях

по периферии клетки соответственно на 66.2 и 66.7 % ( $P < 0.05$ ) по сравнению с нативными формами. В центральной части ядра и перинуклеарном пространстве модуль упругости в фиксированных клетках ниже, чем у нативных, соответственно на 34.5 и 27.1 % ( $P < 0.05$ ). При высушивании мазка на воздухе без фиксации в области перинуклеарного пространства и ядра упругость клеточной поверхности также ниже на 43.4 и 28.9 % ( $P < 0.05$ ) по сравнению с нативными.

Изменения эластичных свойств клеток, выявленные по картам упругости, коррелируют с геометрическими параметрами эритроцитов. Высота клеток, фиксированных метанолом, выше, чем у нативных, на 61.1 % ( $P < 0.05$ ; табл. 2). При сканировании фиксированных клеток в жидкостной ячейке возникают существенные искажения величины объема за счет низкого разрешения получаемых сканов. При этом высота клеток снижена на 76.3 % ( $P < 0.05$ ) и почти в 2 раза завышены показатели объема эритроцитов. Высушивание клеток на воздухе инициирует их распластывание на подложке и увеличение длинной и короткой осей соответственно на 15.9 и 19.8 % ( $P < 0.05$ ) по сравнению с нативными за счет снижения высоты клеток (табл. 3).

Результаты сканирования безъядерных эритроцитов человека. Для оценки структурных мембранных перестроек под действием фиксаторов составлены карты упругости (рис. 2).

<sup>а</sup> Статистически достоверные различия при  $P < 0.05$  в сравнении с нативными клетками.

Таблица 1

### Модуль Юнга (Па) поверхности эритроцита у лягушки и человека

| Эритроциты                             | Лягушка          | Человек            |
|--|------------------|--------------------|
| Нативные                               | $13.94 \pm 1.79$ | $21.66 \pm 2.05$   |
| Фиксированные                          | $17.78 \pm 2.44$ | $31.03 \pm 3.73^a$ |
| Нефиксированные, высушенные на воздухе | $12.22 \pm 1.28$ | $26.72 \pm 5.36$   |

Таблица 2  
Морфометрические параметры эритроцитов лягушки, полученные методом АСМ

| Параметры клеток        | Нативные клетки | Клетки, фиксированные метанолом и отсканированные на воздухе | Клетки, фиксированные метанолом и отсканированные в жидкостной ячейке | Нефиксированные клетки, высушенные и отсканированные на воздухе |
|-------------------------|-----------------|--|---|---|
| Объем, мкм <sup>3</sup> | 288.87 ± 31.54  | 256.02 ± 11.37   | 465.41 ± 24.86 <sup>a, б</sup>  | 289.33 ± 11.77 <sup>б</sup>                                     |
| Высота, мкм             | 1.69 ± 0.13     | 1.35 ± 0.05 <sup>a</sup>                                     | 2.98 ± 0.09 <sup>a, б</sup>   | 1.48 ± 0.07   |
| Длинная ось, мкм        | 20.55 ± 0.34    | 22.41 ± 0.31 <sup>a</sup>                                    | 21.31 ± 0.54  | 23.82 ± 0.59 <sup>a, б</sup>                                    |
| Короткая ось, мкм       | 13.66 ± 0.21    | 13.86 ± 0.35   | 13.65 ± 0.25  | 16.36 ± 0.83 <sup>a, б</sup>                                    |

<sup>a</sup> Статистически достоверные различия в сравнении с нативными клетками. <sup>б</sup> Статистически достоверные различия в сравнении с клетками, фиксированными метанолом и отсканированными на воздухе ( $P < 0.05$ ).

Таблица 3  
Морфометрические параметры эритроцитов человека, полученные методом АСМ

| Параметры клеток        | Нативные клетки | Клетки, фиксированные метанолом и отсканированные на воздухе | Клетки, фиксированные метанолом и отсканированные в жидкостной ячейке | Нефиксированные клетки, высушенные и отсканированные на воздухе |
|-------------------------|-----------------|--|---|---|
| Объем, мкм <sup>3</sup> | 32.29 ± 1.18    | 41.12 ± 1.29 <sup>a</sup>                                    | 62.75 ± 2.00 <sup>a, б</sup>  | 36.68 ± 3.64  |
| Высота, мкм             | 0.49 ± 0.01     | 0.57 ± 0.02 <sup>a</sup>                                     | 0.89 ± 0.02 <sup>a, б</sup>   | 0.48 ± 0.03 <sup>б</sup>  |
| Диаметр, мкм            | 7.38 ± 0.15     | 7.30 ± 0.10  | 7.14 ± 0.07   | 8.15 ± 0.09 <sup>a, б</sup>                                     |

<sup>a</sup> Статистически достоверные различия в сравнении с нативными клетками; <sup>б</sup> статистически достоверные различия в сравнении с клетками, фиксированными метанолом и отсканированными на воздухе ( $P < 0.05$ ).

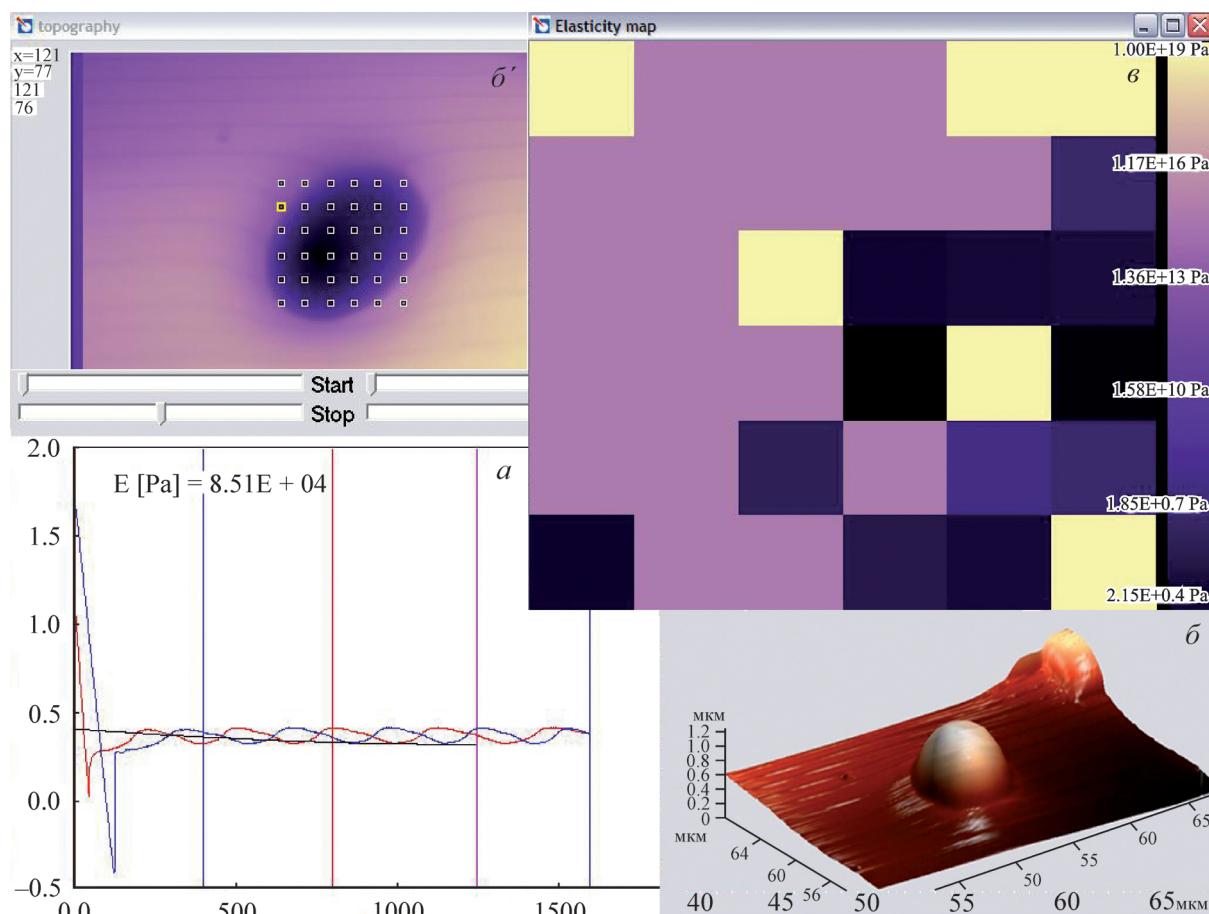


Рис. 2. Результаты статической силовой спектроскопии безъядерных эритроцитов, фиксированных метанолом.

*a* — экспериментальные кривые сближения зонда с поверхностью клетки (синяя — кривая подвода, красная — кривая отвода зонда); *б*, *б'* — изображение эритроцита и соответствующие локальные точки силового воздействия на его поверхность; *б* — результаты силовой спектроскопии (темные квадраты — точки максимальной жесткости).

По результатам силовой спектроскопии в подмембранных слоях по периферии фиксированных эритроцитов наблюдается резкое увеличение модуля упругости на 99.2 % ( $P < 0.05$ ). В области бывшего ядра и перинуклеарного пространства упругость фиксированных клеток снижается соответственно на 50.0 и 99.4 % ( $P < 0.05$ ). В цитоплазме фиксированных форм упругость также снижается на 49.6 % ( $P < 0.05$ ). При высыхании на воздухе без фиксации модуль упругости увеличивается в подмембранных слоях по периферии клетки на 97.8 % ( $P < 0.05$ ). В области бывшего ядра эритроцита упругость при высыхании снижается на 20.8 % ( $P < 0.05$ ).

## Обсуждение

Методом атомно-силовой спектроскопии установлены количественные характеристики упругости при высыхании и фиксации эритроцитов. Воздействие фиксаторов на клеточную поверхность вызывает перераспределение подмембранных структур цитоскелета с преимущественной их локализацией по периферии клетки. Возрастание упругости на периферии снижает способность клеток к реализации потенциальных нагрузок при изменении тоничности среды (Федорова, 2001). Несмотря на общеизвестный факт усиления шероховатости поверхности под воздействием фиксаторов и появления в разных участках клетки глобулярных выступов (Матюхина и др., 2004), впервые удалось установить локальные изменения в упругих свойствах эритроцитов. В частности, фиксация клеток метанолом вызывает перестройку элементов цитоскелета, не затрагивая область бывшего ядра дискоцитов млекопитающих.

В нативных клетках упругость в области ядра эритроцитов лягушки и центрального углубления эритроцитов человека существенно выше ( $876.8 \pm 0.9$  Па), чем в фиксированных формах ( $48.1 \pm 0.2$  Па). Возрастание модуля упругости нативных клеток в области ядра, перинуклеарного пространства и снижение упругости на периферии клетки свидетельствуют о плотности упаковки липидных молекул в мемbrane и асимметричности расположения белков (Сторожок и др., 1997). Выявленная асимметрия в структурно-механических свойствах клеточной поверхности нативных клеток позволяет им в отличие от фиксированных клеток активно участвовать в процессах объемной регуляции. Высыхивание и воздействие фиксаторов на клеточную поверхность ограничивают подвижность мембранных молекул, вызывая изменение низкочастотных колебаний липидной фазы, стимулируя разделение фаз и способствуя асимметричному распределению белковых структур цитоскелета (Фултон, 1987; Yndi et al., 1990).

Таким образом, с помощью метода силовой спектроскопии изучены упругие свойства нативных и фиксированных клеток. Для ядерных и безядерных нативных

эритроцитов установлены максимальные значения модуля упругости в эпи- и перинуклеарном пространстве. потеря ядра дискоцитами млекопитающих сопровождается сохранением их упругих свойств подобно ядерным эритроцитам. Фиксация клеток метанолом инициирует резкое увеличение модуля упругости по периферии клеток со снижением его в области ядра. При высыхании клеток на воздухе регистрируются аналогичные упругие свойства, но менее выраженные. Выявленные особенности клеточных реакций на воздействие фиксаторов могут быть использованы при оценке их морфофункциональных характеристик.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 гг.» (проект НК-40Р П396).

## Список литературы

- Камкин А. Г., Киселева И. С., Кирищук С. И., Лозинский И. Т. 2006. Потенциалуправляемые кальциевые каналы (часть I). Успехи физиол. наук. 36 (4) : 3—33.
- Катюхин Л. Н. 1995. Реологические свойства эритроцитов. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 81 (6) : 122—129.
- Матюхина Т. Г., Пантелеев С. О., Кузнецова Т. А. 2004. Атомно-силовая микроскопия эритроцитарных мембран. В кн.: Материалы VI Международного семинара «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии». Минск. 97—102.
- Орлов С. Н., Новиков К. Н. 1996. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 82 (8—9) : 1—15.
- Сторожок С. А., Санников А. Г., Захаров Ю. М. 1997. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень: Изд-во ТГУ. 137 с.
- Федорова М. З. 2001. Реактивность лейкоцитов крови при различных функциональных нарушениях. Ярославль: Изд-во ЯГПУ. 68 с.
- Фултон А. 1987. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. М.: Мир. 117 с.
- Chen J., Doctor R. B., Mandel L. J. 1994. Cytoskeletal dissociation of ezzin during renal anoxia: role in microvillar injury. Amer. J. Physiol. 267 : 784—795.
- Hansen J. C., Skalak R., Chien S., Hoger A. 1996. An elastic network model based on the structure of the red blood cell membrane skeleton. Biophysics. 70 : 461—467.
- Khodadad J. K., Waugh R. E., Podolski J. L., Josephs R., Stack T. L. 1996. Remodeling the shape of the skeleton in the intact red cell. Biophysics. 70 : 1036—1044.
- Milis J. W. 1987. The cell cytoskeleton possible role in volume control. Curr. Top. Membr. Transp. 30 : 75—101.
- Yndi S. R. P., Kumar A., Bhakuni V. 1990. Membrane skeleton — bilaeyer interaction is not the major determinant of membrane phospholipid asymmetry in human erythrocytes. Biochim. biophys. acta: Biomembranes. 1023 : 63—72.

Поступила 15 VI 2010

COMPARATIVE ESTIMATION OF MORPHOFUNCTION CHARACTERISTICS ALIVE  
AND FIXED ERYTHROCYTES

*M. Yu. Skorkina,<sup>1</sup> M. Z. Fedorova, S. D. Chernyavsky, N. A. Zabinyakov, E. A. Sladkova*

Department of Biotechnology, Morphology and Physiology of Alive Organisms of the Belgorod State University;  
<sup>1</sup> e-mail: skorkina@bsu.edu.ru

The method of power spectroscopy carries out the quantitative analysis of elastic properties of alive cells. It has been established that the highest indicators of elasticity nuclear (amphibious) and denuclearized (mammals) alive erythrocytes are registered in epi- and perinuclear space. When fixing with methanol and drying of cells the greatest values of the elastic modulus are displaced to the periphery of the cells. The revealed inversion of elasticity properties of erythrocytes must be considered when assessing the morphofunction characteristics of the fixed cells.

**Key words:** cell, erythrocytes, morphofunction parameters, AFM-measurements, elastic-properties, module Yung.