

УДК 546.173+546.215+611-018.51+577.352

ТЕРМОМЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

М.Н. Стародубцева, К.Б.Н., доцент

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Методами атомно-силовой микроскопии исследована температурная зависимость механических свойств поверхности контрольных и обработанных пероксинитритом эритроцитов крыс и выявлены изменения, связанные с реорганизацией их мембранного скелета, ведущие к нарушению дальнего порядка в его структуре.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, эритроциты, пероксинитрит, температура, механические свойства

Temperature dependence of rat erythrocyte surface mechanical properties in peroxynitrite treatment was investigated by atomic force microscopy methods. Peroxynitrite-induced changes in physical and chemical properties of erythrocyte membrane skeleton proteins which lead to disturbance of long-range order in cytoskeleton were revealed.

Key words: atomic force microscopy, erythrocyte, peroxynitrite, temperature, mechanical properties

Введение

Поверхностный слой эритроцитов представляет собой биологический композит, который определяет их основные свойства, включая геометрические и механические свойства. Наиболее изучена трансформация формы клетки «диск-сфера» при температурах 40-50°C, обусловленная денатурацией спектрина, одного из структурных белков, составляющих основу мембранного скелета эритроцитов. Термомеханические свойства актин-спектриновой сети эритроцитов как полимерной матрицы существенно зависят от протекающих в ней окислительных процессов. Пероксинитрит является одной из активных форм кислорода и азота, а точнее, сильнейшим окислителем, модифицирующим структуру как мембранного скелета, так и мембраны эритроцитов. Целью работы является выявление особенностей термомеханических свойств композита «мембрана-мембранный скелет» эритроцитов при действии на эритроциты пероксинитрита. В работе также представлен новый метод исследования термомеханических свойств поверхности клеток с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Материалы и методы

В работе использовали венозную кровь беспородных крыс, стабилизированную ЭДТА-натриевой солью. Пероксинитрит добавляли в цельную кровь в виде капли при постоянном перемешивании. Кровь инкубировали с пероксинитритом 10 минут при комнатной температуре. Пероксинитрит синтезировали методом, описанным Векман с соавторами, с небольшими модификациями [4]. Концентрацию пероксинитрита в 1 М NaOH растворе определяли непосредственно перед опытом по поглощению света на длине волны 302 нм ($\epsilon_{302\text{нм}} = 1670 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Для проведения АСМ-исследований кровь тонким слоем наносили на обезжиренную стеклянную пластинку и высушивали при комнатной температуре. АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашины», Беларусь) в статическом режиме сканирования. Использовали стандартные зонды CSC38 (MikroMash). Записывали топографию, карты вер-

тикальных отклонений АСМ-зонда и карты латеральных сил участков поверхности эритроцитов размером 1,5 мкм x 1,5 мкм. Для изучения температурных зависимостей механических свойств поверхности эритроцитов была использована термоплатформа с автономным контроллером ТТ-01 (ОДО «МикроТестМашины, Беларусь»). Температуру образцов изменяли в диапазоне 30-70°C. Устройство обеспечивает измерение температуры с точностью 0,1°C и точностью ее поддержания 0,1°C. Анализ АСМ-изображений осуществляли с помощью программы «SurfaceXplore 1.3.11» (МикроТестМашины, Беларусь).

Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям, мембранный скелет способствует разделению (compartmentalization) мембраны клетки на отдельные области [3]. При высушивании эритроцитов их мембранный скелет является той структурой, которая определяет геометрические и структурно-механические свойства поверхности сухой клетки. Иначе говоря, исследуя структурно-механические свойства высушенных эритроцитов с помощью методов атомно-силовой микроскопии, мы имеем дело, в основном, со свойствами их мембранного скелета.

Эритроцит в мазке крови в норме представляет собой плоский двояко-вогнутый диск. При нагреве от 30 до 70°C наблюдаются явные изменения структурно-механических свойств клеток. Особую чувствительность к изменению температуры проявляют карты латеральных сил участков поверхности эритроцитов (рис. 1, А). Среднее значение латеральных сил на участке поверхности клетки уменьшается скачкообразно в диапазоне температур 40-50°C. Одновременно увеличивается среднеквадратичное отклонение значения латеральных сил. Латеральные силы при АСМ-сканировании являются характеристикой кручения АСМ-острия в латеральной плоскости (в плоскости сканирования). Это кручение можно связать как с неровностями сканируемой поверхности (геометрические свойства), так и с неоднородностью упругих (механических) свойств клеточной поверхности. Геометрические свойства малых участков поверхнос-

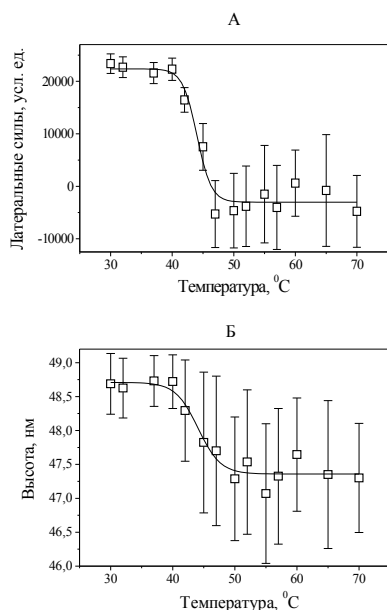


Рисунок 1 – Зависимость латеральных сил (А) и вертикального отклонения АСМ-консоли (Б) от температуры при АСМ-сканировании участка поверхности эритроцитов. Данные представлены как средние значения и средние квадратичные отклонения параметра на участке $1,5\ \mu\text{м} \times 1,5\ \mu\text{м}$ с разрешением 256×256 пикселей

ти эритроцитов, которые можно также оценить и по вертикальным отклонениям АСМ-консоли при сканировании, изменяются, как видно из приведенных данных, незначительно с изменением температуры (рис. 1, Б). Таким образом, карты латеральных сил в основном отражают механические свойства клеточной поверхности. Можно предположить, что величина латеральных сил связана со временем релаксации (t) молекул биологического композита, определяемым размерами области [1], в которой происходит релаксация напряжений. Так как скачок латеральных сил наблюдается в области фазового перехода спектрина (как для эритроцитов крысы, так и для эритроцитов человека [2]), то структурными единицами, определяющими время релаксации поверхностного слоя клетки как биологического композита, являются элементы актин-спектриновой сети (ячейки).

Пероксинитрит, как окислительный агент, модифицирует структуру спектрина и оказывает влияние на термомеханические свойства поверхности эритроцитов (таблица).

При увеличении концентрации реагента наблюдается сдвиг области фазового перехода в сторону

Таблица – Параметры температурного перехода композита «мембрана-цитоскелет» и геометрические размеры эритроцитов крысы в контроле и после обработки пероксинитритом

[ONOO-], μM	T50, $^{\circ}\text{C}$	F60, усл. ед.	ΔH , Дж/(моль·К)	D, $\mu\text{м}$	h, $\mu\text{м}$
0	47,0 \pm 2,4	22281 \pm 1288	608	9,0 \pm 1,4	0,89 \pm 0,09
300	46,5 \pm 1,0	21550 \pm 3401	645 \pm 270	7,7 \pm 0,8	0,88 \pm 0,17
700	42,5	19900 \pm 8824	490 \pm 10	8,0 \pm 1,3	0,81 \pm 0,10
1000	40,3 \pm 2,6	18841 \pm 3323	309 \pm 230	8,2 \pm 0,6	0,78 \pm 0,06

T50 – температура, соответствующая середине фазового перехода композита «мембрана-цитоскелет» ($n=1\pm 4$), F60 – средняя величина латеральных сил участка поверхности эритроцита при температуре 60°C ($n=2\pm 4$), ΔH – энтальпия перехода ($n=1\pm 4$), D – диаметр эритроцитов ($n=4\pm 7$), h – высота эритроцитов ($n=4\pm 7$). Данные представлены как средние значения и границы доверительного интервала, оцененные по выборке с размером n . * $p < 0,01$ в сравнении с контролем, ** $p < 0,05$ в сравнении с эритроцитами после обработки $300\ \mu\text{M}$ пероксинитритом. Сравнения выборочных характеристик проводили с использованием критерия Стьюдента для независимых групп.

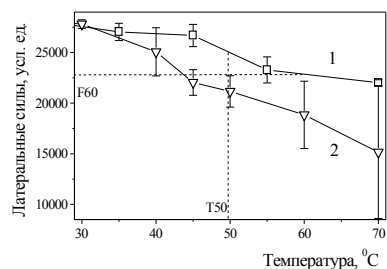


Рисунок 2 – Зависимость латеральных сил от температуры при АСМ-сканировании участка поверхности эритроцитов без (1) и с обработкой $1\ \mu\text{M}$ пероксинитритом (2). Данные представлены как средние значения и границы доверительного интервала, оцененные по выборке из 3 эритроцитов. T50 – температура, соответствующая середине фазового перехода композита «мембрана-цитоскелет», F60 – средняя величина латеральных сил участка поверхности эритроцита при температуре 60°C

меньших температур и выполаживание кривых, описывающих зависимость латеральных сил от температуры (рис. 2). Энтальпия перехода, приходящаяся на один градус температуры, снижается. При этом величины латеральных сил для обработанных пероксинитритом эритроцитов оказываются меньше величин для контрольных клеток каждой из температурных точек.

Уменьшение времени релаксации композита (поверхности клетки) при действии пероксинитрита связано с перестройкой структуры мембранного скелета эритроцитов, а именно, с преобладающим уменьшением размеров ячеек и увеличением ее гетерогенности (нарушением дальнего порядка) актин-спектриновой сети [5]. Если структуру актин-спектриновой сети зафиксировать с помощью химического агента (глутарового альдегида), то существенных изменений латеральных сил участков поверхности эритроцитов не наблюдается [2].

Заключение

Окислительный стресс, имеющий место при различных патологиях, обусловленных перепроизводством активных форм азота, включая пероксинитрит (ишемия, атеросклероз, нервно-дегенеративные болезни, воспаление и другие), изменяет структуру мембранного скелета эритроцитов, что ведет к нарушению дальнего порядка в цитоскелетной системе. В условиях окислительного стресса клетка не способна к быстрому ответу на внешнее механическое воздействие, не имеет возможности участия в создании надклеточных структур, что ведет к нарушению транспортных функций крови.

Литература

1. Бартенев Г.М., Никольский В.Г. Стеклование полимеров // Энциклопедия полимеров, М.: Советская энциклопедия, 1977.- Т. 3. - С. 490-498.
2. Стародубцева М.Н., Кузнецова Т.Г., Егоренков Н.И. Способы подготовки эритроцитов для исследования методами атомно-силовой микроскопии // Вестник Фонда фундаментальных исследований. - 2008. - № 4. - С. 42-51.
3. Deuticke, B., Membrane lipids and proteins as a basis of red blood shape and its alterations // Red cell membrane transport in health and disease. - Berlin: Springer, 2003. - P. 28-60.
4. Robinson K.M. Beckman J.S. Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide // Method Enzymol. - 2005. - Vol. 396. - P. 207-214.
5. Starodubtseva M.N., Tattersall A., Kuznetsova T.G., Yegorenkov N.I., Ellory J.C. Structural and functional changes in membrane and membrane skeleton of red blood cells induced by peroxynitrite // Bioelectrochemistry. - 2008. - Vol. 73. - P. 155-162.

Поступила 08.04.09