

Атомно-силовая микроскопия набухания и упрочнения закрепленных на подложке интактных эритроцитов

© М.М. Халисов,^{1,2} К.И. Тимошук,² А.В. Анкудинов,^{2,3,¶} Т.Е. Тимошенко¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
19034 Санкт-Петербург, Россия

² Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

³ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru

(Поступило в Редакцию 5 апреля 2016 г.)

С помощью атомно-силовой микроскопии в режиме поточечных измерений силового взаимодействия проведено количественное картирование наномеханических свойств интактных эритроцитов крыс в условиях, приближенных к физиологическим. Установлено, что эритроциты, закрепившиеся на подложке, обработанной полилизинном (poly-L-lysine), имеют преимущественно плоскую форму. Однако со временем клетки могут скачкообразно трансформироваться в полусферические объекты, увеличиваясь в объеме и одновременно упрочняясь. Обсуждается возможный механизм эффекта.

DOI: 10.21883/JTF.2017.02.44139.1840

Деформируемость эритроцитов ключевым образом влияет на реологические свойства крови. Нарушение кровоснабжения тканей часто вызвано ухудшением способности этих клеток к деформации. Важный количественный параметр — это величина модуля Юнга эритроцитов, от которой существенно зависит текучесть крови, особенно по капиллярному руслу. Источником ценной информации об эритроцитах может стать атомно-силовая микроскопия (АСМ) [1]. В частности, существует режим поточечного картирования наномеханических свойств по особенностям силового взаимодействия (PeakForce QNM, Bruker), который одновременно с рельефом поверхности позволяет изучать вариации упругого модуля Юнга и такие неупругие свойства, как сила адгезии и диссипация энергии, характеризующие локальное взаимодействие АСМ зонда с клеткой.

Большая часть АСМ исследований проводится на высушенных или химически обработанных эритроцитах [2–4]. Такой подход позволяет сделать объекты тверже, жестко закрепить их на подложке и существенно облегчает АСМ измерения, но закрывает доступ к свойствам, присущим только живым клеткам. Лишь небольшая часть работ посвящена АСМ изучению интактных эритроцитов в физиологически адекватных условиях [5–8].

Для АСМ измерений принципиально необходимо осадить клетки из физиологического раствора (ФР) на твердую подложку. Прикреплению эритроцитов способствует тонкий слой полилизина на подложке [5–8]. В работах [6–8] сравнивался модуль Юнга интактных эритроцитов от людей, здоровых и имеющих различные патологии. Докладывалось, что сахарный диабет и серповидно-клеточная анемия сопровождаются увеличением среднего модуля Юнга клеток. Прикрепленное

состояние для эритроцитов, однако, не является естественным. Из-за экстремальной способности клеток к деформации можно ожидать изменений в их форме и механических свойствах по сравнению со свободными эритроцитами в кровеносной системе живого организма. В АСМ исследовании [9] сообщалось, что интактные эритроциты демонстрировали на подложке необычную, распластанную плоскую форму, что связывалось с возросшим натяжением мембраны клетки, реагирующей на контакт с полилизинном. Отмечалось [10], что на подложках, обработанных концентрированным раствором полилизина, провоцируется разрыв мембраны и лизис эритроцитов. Если же брать разбавленный раствор с концентрацией менее 1 mg/ml, то покрытие подложки полилизинном становится не сплошным, и падает надежность иммобилизации эритроцитов. В итоге оптимизация обработки по времени экспозиции, концентрации, молекулярной массе полилизина и другим параметрам оказывается довольно тонкой процедурой. Критериями оптимизации представляются стабильность и повторяемость результатов АСМ исследования живых клеток. В такой связи в настоящей работе изучалось влияние продолжительности контакта обработанной полилизинном подложки с интактными эритроцитами на характерную морфологию и среднее значение модуля Юнга клеток.

С помощью режима PeakForce QNM на атомно-силовом микроскопе Bruker Bioscope Catalyst изучались интактные эритроциты крыс линии Wistar. АСМ эксперименты проводились в жидкости при постоянной температуре 37°C. Для приготовления образцов у наркотизированных самцов крыс брали кровь из брюшной аорты. Сразу после забора крови эритроциты выдерживали в пробирке для осаждения в гравитационном поле,

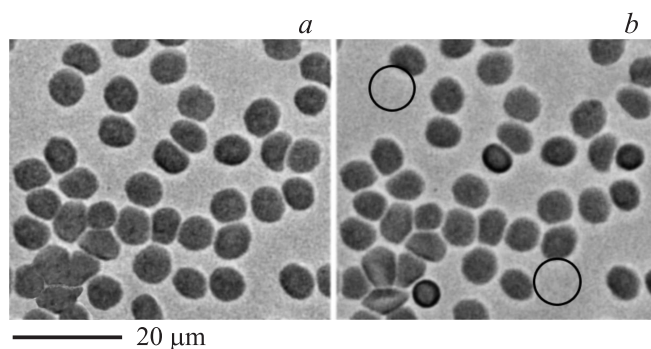


Рис. 1. Оптические изображения эритроцитов на полилизинной подложке в изотоническом физиологическом растворе: *a* — сразу после установки образца, *b* — через 1.5 h. Кружками на *b* отмечены оптически прозрачные трансформировавшиеся эритроциты.

удаляли плазму, промывали клетки ФР с рН 7.4. Каплю суспензии эритроцитов в ФР (в соотношении 1:50) наносили на дно чашки Петри, предварительно обработанное в водном растворе полилизина ($10 \mu\text{g/ml}$, использовался poly-L-lysine, молекулярная масса 150–300 kDa, Sigma P8920). В чашку с эритроцитами добавляли 1 ml ФР, ждали 20 min, чтобы клетки смогли осесть на ее дне, затем удаляли слабо закрепленные объекты, несколько раз обновляя ФР. Выбор области исследования осуществлялся через инвертированный оптический микроскоп Carl Zeiss Axio Observer, совмещенный с АСМ. В процессе АСМ сканирования одновременно определялись топография подложки с эритроцитами и карта значений модуля Юнга. Модуль Юнга вычислялся по модели Снеддона [11.12] путем автоматической математической обработки силовых кривых, регистрируемых при каждом касании образца зондом.

Измерения осуществлялись стандартными острыми зондовыми датчиками Bruker SNL-10 (D) с паспортной жесткостью 0.06 N/m . Реальное значение жесткости каждого зонда определялось методом тепловых шумов, реализованным в программном обеспечении АСМ. Эксперименты с эритроцитами проводились с максимальной силой надавливания на уровне 500 pN , минимально возможной частотой сканирования 0.1 Hz , амплитудой вертикального движения зонда в каждой точке измерения $1 \mu\text{m}$, частотой движения по вертикали 250 Hz . Как правило, линейный размер кадра АСМ данных составлял $15\text{--}20 \mu\text{m}$.

Средние значения модуля Юнга эритроцитов определялись на АСМ изображениях, сглаженных фильтром, ослабляющим высокочастотные составляющие сигнала. Анализировался сигнал в центре клетки, внутри квадратной области размером приблизительно $2 \times 2 \mu\text{m}$. Обработка АСМ данных осуществлялась в программных пакетах Nanoscope Analysis 1.50 и Gwyddion 2.41.

В инвертированном оптическом микроскопе эритроциты выглядят, как темные объекты круглой формы на

фоне прозрачной подложки (рис. 1, *a*). Наблюдая эритроциты в течение нескольких часов, мы обнаружили, что некоторые из них после осаждения на подложку обесцвечиваются и становятся почти невидимыми (рис. 1, *b*).

Согласно АСМ измерениям, в обоих случаях эритроциты не демонстрировали дисковидной двояковогнутой формы, присущей свободным, не прикрепленным к подложке клеткам. Темные клетки в исходном состоянии были плоскими, невысокими, $0.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($n = 22$), сильно распластанными по подложке и иногда имели небольшой бугорок вблизи центра (рис. 2, *a, c*). Трансформировавшиеся оптически прозрачные клетки становились значительно выше, $1.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ($n = 7$), и имели выпуклую форму, близкую к полусферической (рис. 2, *b, d*). В среднем при измерении по данным АСМ топографии площадь проекции темных эритроцитов составила $44 \pm 8 \mu\text{m}^2$ ($n = 18$), у трансформировавшихся клеток этот параметр был $29 \pm 7 \mu\text{m}^2$ ($n = 6$). В ряде случаев у обесцвеченных эритроцитов ослаблялась адгезия к подложке, что обнаруживалось по откреплению клеток во время сканирования.

Неожиданным оказалось, что трансформация сопровождалась упрочнением эритроцитов. Средний модуль Юнга обесцвеченных эритроцитов был почти в 4 раза больше, чем у темных $48 \pm 10 \text{ kPa}$ ($n = 6$) и $13 \pm 9 \text{ kPa}$ ($n = 17$) соответственно. Пример АСМ карт модуля Юнга эритроцитов в двух разных состояниях, а также гистограммы значений этого параметра представлены на рис. 2, *e–h*.

Считается, что модуль Юнга измеряется точно, если объект индентируется, т. е. деформируется АСМ зондом, менее чем на десятую долю своей толщины [13]. Если это условие нарушается, измерения завышают модуль Юнга, проявляя близость твердой подложки. Темные эритроциты обладали малой высотой $0.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($n = 22$), сопоставимой с деформацией $0.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$. Так как условие малой относительной деформации, очевидно, нарушено, результат $13 \pm 9 \text{ kPa}$ выше истинного значения модуля Юнга таких клеток. АСМ измерения велись с минимизированной пиковой силой, а значит и деформацией. В принципе, можно заметно уменьшить деформацию, заменив стандартный нанометрово-острый пирамидальный зонд на зонд со сглаженной сферической геометрией, с микронной или субмикронной коллоидной гранулой на кончике [14]. Исследования эритроцитов такими зондами планируются нами в будущем. Трансформировавшиеся эритроциты имели большую высоту $1.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ($n = 7$), что почти на порядок больше деформации. Следовательно, результат $48 \pm 10 \text{ kPa}$ достоверно характеризует модуль Юнга трансформировавшихся эритроцитов. Таким образом, значения модуля Юнга у темных эритроцитов завышены, а у обесцвеченных клеток измерены верно. В итоге наблюдается эффект как минимум четырехкратного упрочнения эритроцитов.

Анализируя литературные данные, можно отметить, что они сильно разнятся. Так, в АСМ исследовании

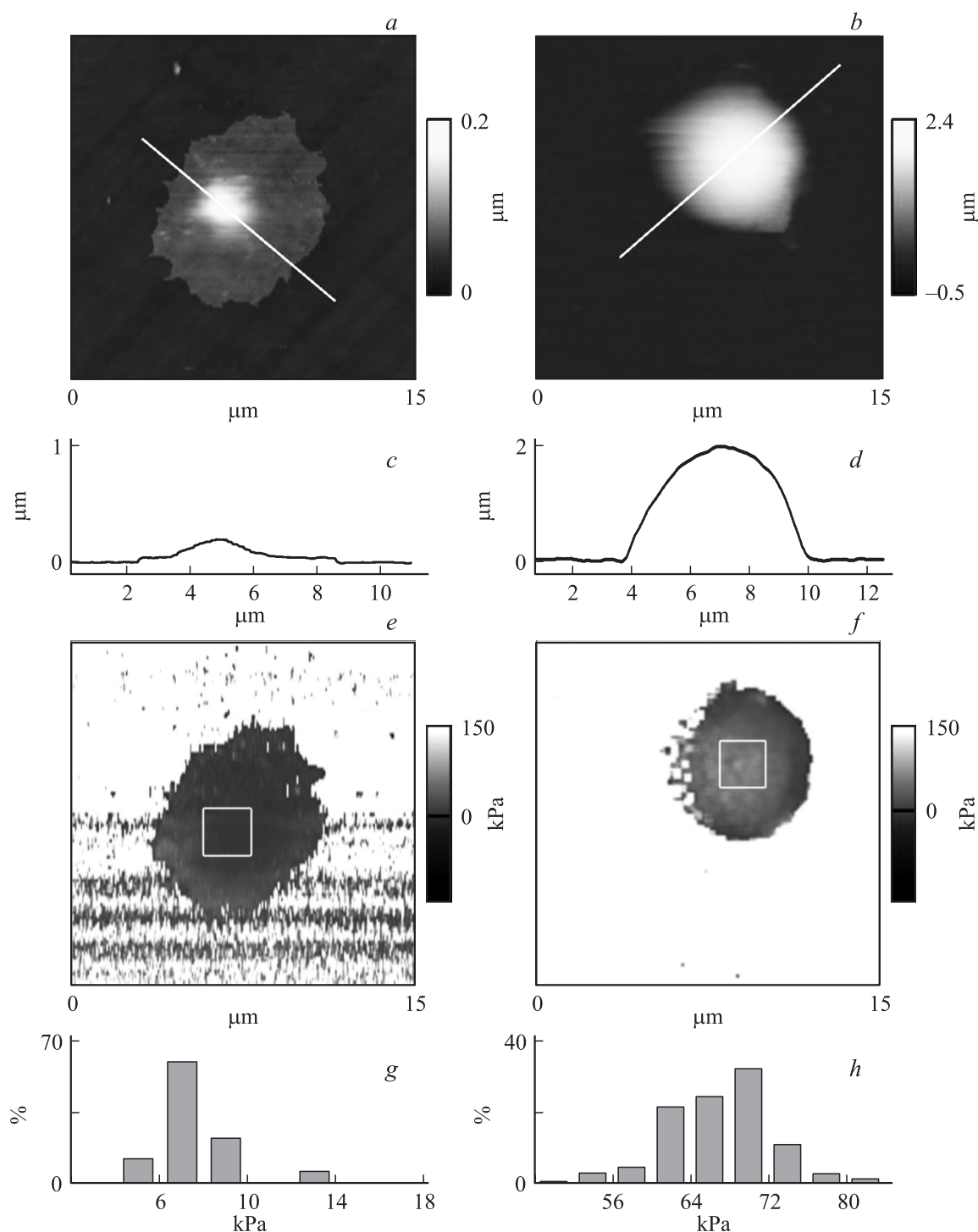


Рис. 2. Типичные данные АСМ исследования эритроцитов до/после трансформации. Тоновые изображения рельефа участков полилизиновой подложки с эритроцитом (а)/(б); профили высоты (с)/(д) вдоль сечений на изображениях (а)/(б). Карты распределения модуля Юнга (е)/(ф), измеренные одновременно с изображениями (а)/(б); гистограммы значений сигнала (г)/(h), определенные внутри квадратных областей, отмеченных на изображениях (е)/(ф).

интактных эритроцитов [5] модуль Юнга был оценен в 16 ± 2 кПа. Авторы [6,7] докладывали о значениях на уровне единиц килопаскалей, а в работе [8] сообщается о приблизительно 150 Па. К несогласию в данных могут вести разные причины. В [5] определялся модуль Юнга

эритроцитов крыс, а в [6–8] объектами исследования служили человеческие клетки. В [6,7] измеренные с помощью АСМ значения модуля Юнга эритроцитов человека по порядку величины совпадают, но оказываются ниже, чем у крысиных клеток. Особенно низкий модуль

Юнга в [8], вероятно, есть результат использования не стандартных острых АСМ зондов, как в [5–7], а кантилевера со сферической частицей диаметром $4\ \mu\text{m}$ на кончике.

Как отмечалось, сила адгезии клеток с подложкой может существенно деформировать эритроциты. В исследованиях [10,15] было замечено, что на подложках, обработанных раствором полилизина в концентрациях $100\ \mu\text{g/ml}$, эритроциты меняли форму, а при концентрации $250\ \mu\text{g/ml}$ происходил лизис клеток. В нашей работе брались на порядок меньшие концентрации полилизина, но отклонения формы эритроцитов от традиционной дисковидной двояковогнутой геометрии не исчезали.

Обесцвечивание эритроцитов ранее наблюдалось в работе [9]. Результат был связан с лизисом клеток после разрыва плазматической мембраны, продолжительное время растянутой на полилизиновой подложке с сильным адгезионным взаимодействием. Согласно расчетам, у распластанных на полилизине клеток величина натяжения мембраны составляет примерно $0.001\ \text{N/m}$ [9]. Это на порядок больше естественного натяжения, что могло вызывать разрыв мембраны и спонтанный лизис клетки. В нашем исследовании было обнаружено, что обесцвеченные эритроциты увеличивались в объеме и упрочнялись, но целостность мембраны сохранялась, и разрушения, т.е. лизиса трансформировавшихся клеток, не происходило. Эффект, скорее, отражает набухание клеток и, по-видимому, связан с истощением физиологического ресурса механочувствительных катионных каналов, ответственных за поддержание постоянства клеточного объема, и может быть вызван деградацией гемоглобина с образованием низко молекулярных димеров [16]. Близкий механизм обсуждался в работах [17,18], где показано, что эритроциты животных, нокаутированных по белкам семейства Piezo, образующим механочувствительные катионные каналы, регулирующие клеточный объем, могут увеличиваться в объеме и понижать осмотическую устойчивость вследствие гипергидратации и *in vitro*, и *in vivo*. Индикатором такого понижения является рост внутриклеточного давления за счет поступления в эритроцит дополнительной жидкости, что отражается на значении модуля Юнга клетки. В конечном счете стрессовая стадия упрочнения и гипергидратации эритроцитов может привести к гемолизу. Мы получили дополнительные свидетельства в пользу упрочнения эритроцитов за счет гипергидратации. Оптические исследования показали, что трансформация закрепившихся на подложке эритроцитов развивалась примерно в 3 раза быстрее в гипотоническом (с пониженной в 1.5 раза тоничностью) растворе, чем в изотоническом.

Таким образом, в ходе проведенных оптических и АСМ экспериментов установлено влияние подложки и времени контакта с ней интактных эритроцитов на форму и модуль Юнга клеток. Обнаружено необратимое изменение состояния эритроцитов, продолжительное время (несколько часов) контактирующих с подложкой,

обработанной раствором полилизина. Оно проявляется в том, что клетки приобретают полусферическую форму, уменьшают площадь контакта с подложкой и становятся тверже по сравнению с исходным распластным и мягким состоянием. Причиной обнаруженной трансформации эритроцитов предполагается деградация гемоглобина вследствие его автоокисления с образованием низко молекулярных димеров [16]. Это может вызывать увеличение транспорта воды в клетку по осмотическому градиенту. Полученный результат представляется важным учитывать в АСМ исследованиях механических свойств не только интактных эритроцитов, но и других живых клеток.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования „Конфокальная микроскопия“ Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00677.

Список литературы

- [1] Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. // Phys. Rev. Lett. 1986. Vol. 56. N 9. P. 930–933.
- [2] Nowakowski R., Luckham P., Winlove P. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1514. N 2. P. 170–176.
- [3] Dulińska I., Targosz M., Strojny W., Lekka M., Czuba P., Balwierz W., Szymoński M. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2006. Vol. 66. N 1–3. P. 1–11.
- [4] Chen X., Feng L., Jin H., Feng S., Yu Y. // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2009. Vol. 43. N 3. P. 243–251.
- [5] Mozhanova A.A., Nurgazizov N.I., Bukharaev A.A. // Proceedings SPM-2003. Nizhni Novgorod. 2003. P. 266–267.
- [6] Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Styczeń J. // Biorheology. 2005. Vol. 42. N 4. P. 307–317.
- [7] Maciaszek J.L., Andemariam B., Lykotrafitis G. // J. Strain Analysis. 2011. Vol. 46. N 5. P. 368–379.
- [8] Rebelo L.M., Sousa J.S., Santiago T.M., Mendes Filho J. // Microscopy: advances in scientific research and education. 2014. Vol. 1. P. 141–152.
- [9] Hategan A., Law R., Kahn S., Discher D.E. // Biophys J. 2003. Vol. 85. N 4. P. 2746–2759.
- [10] Tuvia S., Almagor A., Bitler A., Levin S., Korenstein R., Yedgar S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. N 10. P. 5045–5049.
- [11] Sneddon I.N. // Int. J. Eng. Sci. 1965. Vol. 3. N 1. P. 47–57.
- [12] Khalisov M.M., Ankudinov A.V., Penniyaynen V.A., Dobrota D., Krylov B.V. // Act. Physiol. Hung. 2015. Vol. 102. N 2. P. 125–130.
- [13] Mathur A.B., Collinsworth A.M., Reichert W.M., Kraus W.E., Truskey G.A. // J. Biomech. 2001. Vol. 34. N 12. P. 1545–1553.
- [14] Няшаев И.А., Анкудинов А.В., Стовяга А.В., Трофимова Е.Ю., Ерошкин М.Ю. // ЖТФ. 2012. Т. 82. Вып. 10. С. 109–116.
- [15] Назаров П.Г., Берестовая Л.К. // ДАН. 1995. Т. 343. Вып. 1. С. 123–126.
- [16] Mohanty J., Nagababu E., Rifkind J. // Front. Physiol. 2014. Vol. 5. P. 1–6.
- [17] Faucherre A., Kissa K., Nargeot J., Mangoni M., Jopling Ch. // Haematologica. 2014. Vol. 99. N 1. P. 70–75.
- [18] Cahalan S., Lukacs V., Ranade S., Chien S., Bandell M., Patapoutian A. // eLIFE. 2015. 4:e07370.DOI: 10.7554. P. 1–12.