

## Нелинейные локальные деформации мембран эритроцитов: действие токсинов и препаратов (Часть 2)

А. М. Черныш<sup>1,2</sup>, Е. К. Козлова<sup>1,2</sup>, В. В. Мороз<sup>1</sup>,  
В. А. Сергунова<sup>1</sup>, О. Е. Гудкова<sup>1</sup>, А. П. Козлов<sup>2</sup>, Е. А. Манченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## Nonlinear Local Deformations of Red Blood Cell Membranes: Effects of Toxins and Pharmaceuticals (Part 2)

Alexander M. Chernysh<sup>1,2</sup>, Elena K. Kozlova<sup>1,2</sup>, Viktor V. Moroz<sup>1</sup>,  
Viktoria A. Sergunova<sup>1</sup>, Olga E. Gudkova<sup>1</sup>,  
Alexander P. Kozlov<sup>2</sup>, Ekaterina A. Manchenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,  
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
8 Trubetskaya Str., Build. 2, 119991 Moscow, Russia

Модификаторы мембран порождают локальные дефекты на поверхности клеток. Измерение жесткости в зонах локальных дефектов может дать дополнительную информацию о структуре дефектов и механических свойствах мембран в целом.

**Цель работы:** пошаговое исследование процесса нелинейной деформации мембран эритроцитов при действии на них модификаторов различной физико-химической природы.

**Материалы и методы.** Методом атомно-силовой спектроскопии провели исследование деформации мембран внутри клетки вязко-упругой композитной конструкции эритроцита. Исследовали нелинейные деформации при действии гемина, ионов  $Zn^{2+}$ , препарата верапамила.

**Результаты.** Показали процесс упруго-эластичной деформации мембраны по мере индентации зонда в областях локальных дефектов, вызванных модификаторами. На один и тот же шаг смещения  $\Delta z$  пьезосканера зонд погружался на разные дискретные величины  $\Delta h$ , которые являются функциями структуры мембраны. В областях доменов при действии гемина возникали зоны натяжения и зоны пластичности. Привели математическая модель индентации зонда в области дефектов мембран.

**Заключение.** Обсудили молекулярные механизмы различных видов нелинейных деформаций, возникающих при действии токсинов. Результаты работы могут представлять интерес как для фундаментальных исследований свойств клеток крови, так и для практической реаниматологии и реабилитологии.

**Ключевые слова:** мембраны эритроцитов; нелинейные деформации; атомно-силовая спектроскопия

Modifiers of membranes cause local defects on the cell surface. Measurement of the rigidity at the sites of local defects can provide further information about the structure of defects and mechanical properties of altered membranes.

**The purpose of the study:** a step-by-step study of the process of a nonlinear deformation of red blood cells membranes under the effect of modifiers of different physico-chemical nature.

**Materials and methods.** The membrane deformation of a viscoelastic composite erythrocyte construction inside a cell was studied by the atomic force spectroscopy. Nonlinear deformations formed under the effect of hemin,  $Zn^{2+}$  ions, and verapamil were studied.

**Results.** The process of elastic deformation of the membrane with the indentation of a probe at the sites of local defects caused by modifiers was demonstrated. The probe was inserted during the same step of the piezo scanner  $\Delta z$  displacement; the probe indentation occurred at the different discrete values of  $\Delta h$ , which are the functions of the membrane structure. At the sites of domains, under the effect of the hemin, tension areas and plasticity areas appeared. A mathematical model of probe indentation at the site of membrane defects is presented.

Адресс для корреспонденции:

Александр Черныш  
E-mail: amchernysh@mail.ru

Correspondence to:

Alexander Chernysh  
E-mail: amchernysh@mail.ru

**Conclusion.** The molecular mechanisms of various types of nonlinear deformations occurring under the effect of toxins are discussed. The results of the study may be of interest both for fundamental researchers of the blood cell properties and for practical reanimatology and rehabilitology.

**Keywords:** red blood cells membranes; nonlinear deformations; atomic force spectroscopy

DOI:10.15360/1813-9779-2018-1-29-39

## Введение

Способность эритроцитов деформироваться определяет возможность их прохождения через капиллярную сеть и реологию крови в целом [1]. Особенно остро стоит эта проблема в практической реаниматологии и реабилитологии. Это определяется тем, что при критических состояниях, при кровопотере, сочетанной травме собственные параметры мембран эритроцитов меняются в широких пределах [2–5].

Атомная силовая спектроскопия (АСС) позволяет получать изображения наноповерхности мембран и исследовать их способность деформироваться под действием индентора [6, 7]. По деформации биологической структуры делается заключение о жесткости материала и его механических свойствах [8, 9]. Деформируемость и жесткость мембран эритроцитов меняется при заболеваниях – при сахарном диабете, ишемии миокарда, гипертонии [10, 11], при возникновении опухолей [12, 13].

По силовым кривым, измеренным в поверхностном слое, рассчитывается модуль Юнга, который приписывается всему объему материала [14–16]. В таком контексте измерение жесткости мембраны клетки можно проводить на мембранах, закрепленных на твердой подложке [17]. Но, в этом случае нет возможности получить данные о деформируемости отдельных компонент мембран. Можно лишь оценить модуль Юнга поверхностного слоя. Задача изучения механических свойств мембран эритроцитов с помощью АСС должна быть поставлена иначе. А именно, исследование способности деформироваться внутрь клетки вязко-упругой композитной мембраны на целостной конструкции эритроцита [18, 19].

Модификаторы мембран могут порождать локальные дефекты на поверхности клеток. Измерение жесткости в зонах локальных дефектов может дать дополнительную информацию о структуре дефектов и механических свойствах мембран в целом. Поэтому, для описания биомеханики мембран, необходимо исследовать не просто модуль Юнга поверхностного слоя, но и изменения жесткости мембран в их различных зонах и на разной глубине прогиба. Для этого исследовали действие на клетки модификаторов различной природы: токсический агент гемин, ионы тяжелых металлов –  $Zn^{2+}$ , лекарственный препарат – верапамил.

Цель работы – пошаговое исследование процесса нелинейной деформации мембран эритроци-

## Introduction

The ability of red blood cells (RBC) to deform determines the possibility of their passage through capillary network and rheology of a blood [1]. This problem is especially urgent in practical reanimatology and rehabilitology since in critical states due to a blood loss and multitrauma the intrinsic parameters of erythrocyte membranes vary in a wide range [2–5].

The atomic force spectroscopy (AFS) makes it possible to obtain images of the nanosurface of membranes and to study their ability to deform under the influence of the indenter [6, 7]. A conclusion about the firmness of the material and its mechanical properties [8, 9] is made by the deformation of the biological structure. The deformability and rigidity of the erythrocyte membranes varies depends on the disease studied and includes diabetes mellitus, myocardial ischemia, hypertension [10, 11], and tumors [12, 13].

According to the force curves measured in the superficial layer, the Young's modulus is calculated, which is attributed to the entire volume of the material [14–16]. In this context, the measurement of the hardness of the cell membrane can be carried out on membranes fixed on the solid substrate [17]. But in this case, it is not possible to obtain data about the deformability of individual membrane components. One can only estimate the Young's modulus of the surface layer. The task of studying the mechanical properties of erythrocyte membranes with the help of AFS should be set differently. Namely, a study of the ability of the viscoelastic composite membrane to deform inside a cell on an integral erythrocyte construction [18, 19].

Modifiers of membranes may produce local defects on the cell surface. The measurement of the hardness at sites of local defects can give additional information about the structure of defects and the mechanical properties of membranes, in general. Therefore, to describe the biomechanics of membranes, it is necessary to investigate not only the Young's modulus of the superficial layer, but also changes in the rigidity of membranes in their various zones and at different depths of deflection. For this purpose, the effect of modifiers of different nature on the cells was studied: a toxic agent hemin, ions of heavy metals ( $Zn^{2+}$ ), and a pharmaceutical verapamil.

The purpose of the study was a step-by-step study of the process of a nonlinear deformation of red blood cells membranes under the effect of modifiers of different physico-chemical nature.

тов при действии на них модификаторов различной физико-химической природы.

## Материал и методы

Способ измерения деформаций, объект, а так же методика построения и анализа силовых кривых в атомно-силовой спектроскопии была подробно описана в части 1 этой статьи.

Кровь забирали у доноров на добровольной основе при профилактических осмотрах, и все дальнейшие исследования проводили *in vitro*. В исследовании использовали кровь 6 доноров мужского пола от 23 до 34 лет. Все исследования проводили с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г, а также с нормами этического комитета ФНКЦ РР.

Проводили исследования локальной жесткости мембран эритроцитов после воздействия на кровь *in vitro* модификаторов: гемина, ионов тяжелых металлов ( $Zn^{2+}$ ), лекарственного препарата верапамила. Эти модификаторы имели различную природу и различные механизмы действия на наноструктуру мембран. Важно, что эти модификаторы порождали на мембранах эритроцитов специфические топологические локальные дефекты, характерные только для данного модификатора. Выбор модификаторов продиктован необходимостью получения широкого спектра эффектов их воздействия на наноструктуру и механические свойства мембран.

Гемин — продукт окисления гемоглобина. Малярия (серповидные клетки), ишемия, кровопотеря, кровотечение из эрозий желудка могут привести к формированию гемина [2, 18, 20]. Ионы  $Zn^{2+}$  вызывают кластеризацию белковых структур и порождают локальные дефекты мембран [21, 22]. Верапамил, используемый при лечении гипертонии, стенокардии, тахикардии и кардиомиопатии, является одним из часто назначаемых блокаторов кальциевых каналов [23].

В работе использовали сухой гемин (Sigma, USA). 50 мг сухого гемина растворяли в 0,1 М раствора NaOH в дистиллированной воде. Конечная концентрация гемина в крови *in vitro* составляла 1,5 мМ. Раствор соли  $ZnSO_4$  (Sigma, USA) добавляли в цельную кровь. Концентрация ионов  $Zn^{2+}$  в крови *in vitro* составляла 2 мМ. Концентрация верапамила гидрохлорида (Nycomed, Austria) в крови *in vitro* составляла 0,6 мМ.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы Origin 9, (Origin Lab Corporation, USA). Строили гистограммы, определяли среднее значение, величину среднеквадратического отклонения и получали интервальную оценку, оценку достоверности полученных результатов, оценку достоверности различий. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way, ANOVA).

## Результаты и обсуждение

Процесс индентации зонда в мембраны эритроцита при действии гемина

Гемин образует домены на поверхности мембран [24]. Пример наноповушки мембраны эритроцита после действия гемина представлен на рис. 1, а. Показаны области больших доменов (350–1000) нм — «Ld», области малых доменов

## Materials and Methods

The method of deformations measuring, the object, as well as the procedure of plotting and analyzing of force curves in the atomic force spectroscopy has been described in details in Part 1 of this article.

Blood was collected from donors on a voluntary basis during preventive examinations, and all further studies were performed *in vitro*. Blood from 6 male donors aged from 23 to 34 years old was used in the study. All studies were carried out in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki by the World Medical Association «Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects», as amended in 2000, as well as with the requirements of the Ethics Committee of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology.

Studies of local hardness of erythrocyte membranes after *in vitro* exposure of blood to modifiers: hemin, heavy metal ions ( $Zn^{2+}$ ), verapamil. These modifiers had different nature and different mechanisms of action on the nanostructure of the membranes. It is important that these modifiers generated specific topological local defects on the erythrocyte membranes, which are characteristic only to this modifier. The choice of modifiers is substantiated by the need to obtain a wide range of effects of their influence on the nanostructure and mechanical properties of membranes.

Hemin is a product of hemoglobin oxidation. Malaria, sickle cells, ischemia, blood loss, bleeding from gastric erosions can lead to the formation of hemin [2, 18, 20].  $Zn^{2+}$  ions cause clustering of protein structures and generate local membrane defects [21, 22]. Verapamil is one of the most commonly prescribed calcium channel blockers, used in the treatment of hypertension, angina pectoris, tachyarrhythmia and cardiomyopathy [23].

Dry hemin was used in the study (Sigma, USA). 50 mg of dry hemin was dissolved in a 0.1 M solution of NaOH in distilled water. The final *in vitro* concentration of hemin in the blood was 1.5 mM. A  $ZnSO_4$  solution (Sigma, USA) was added to the whole blood. The *in vitro* concentration of  $Zn^{2+}$  ions in the blood was 2 mM. The *in vitro* concentration of verapamil hydrochloride (Nycomed, Austria) in blood was 0.6 mM.

The statistical processing of data was carried out using the standard Origin 9 software, (Origin Lab Corporation, USA). The histograms were constructed, the mean value, the standard deviation value were determined and an interval estimate, an estimate of the reliability of the obtained results, and an estimate of the reliability of the differences were obtained. The reliability of the differences was assessed using single-factor analysis of variance (One-way, ANOVA).

## Results and Discussion

Process of probe indentation into RBC membrane under the effect of hemin

Hemin forms domains on the membrane surface [24]. An example of the nanosurface of the red blood cell membrane after the action of hemin is shown in fig. 1, a. Zones of large domains (350–1000 nm), «Ld», zones of small domains (200–300) nm, «Sd», and zones of flat membranes surface, «Fl», are shown. The characteristic size of granular structures in domains is 100–120 nm, which is close to the characteristic cell size of the spectrin matrix. The sizes of domains are determined by the number of grains in it [25].

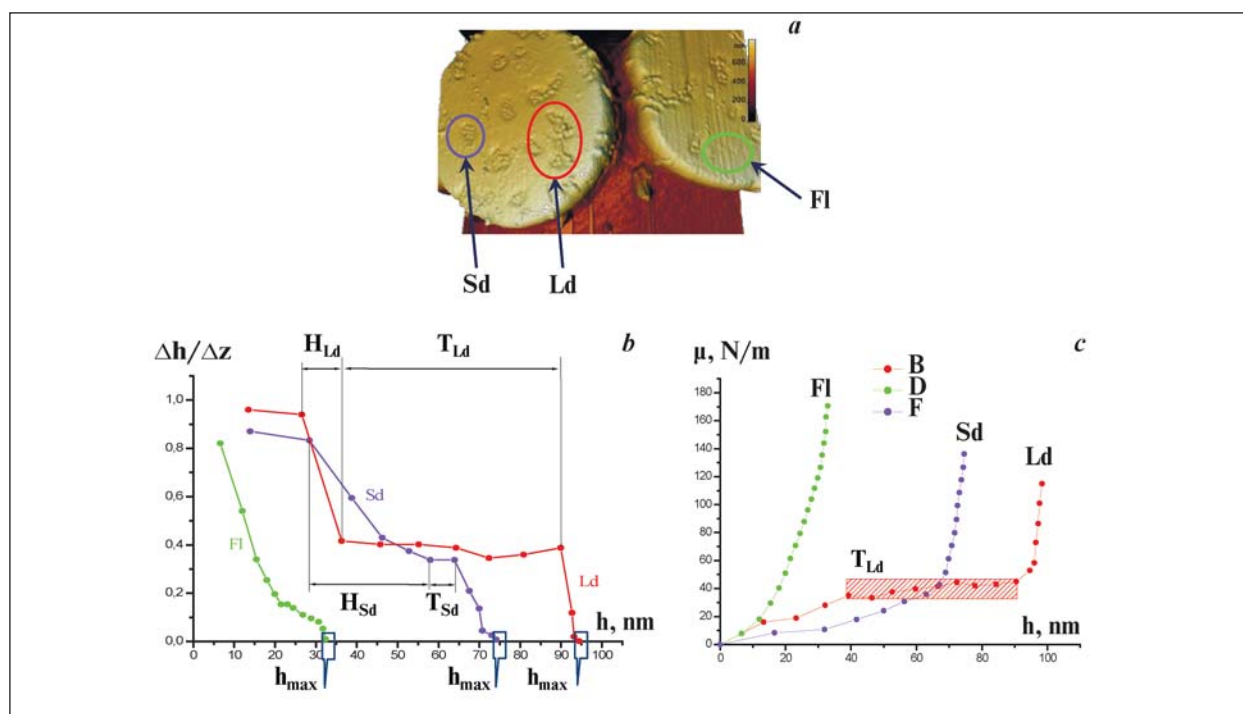


Рис. 1. Наноповерхность мембран эритроцитов при действии гемина.

Fig. 1. Nanosurface of red blood cell membranes under the effect of hemin.

Note. *a* – functions  $\Delta h/\Delta z(h)$  for the flat surface *Fl*, zone of the large domain *Ld*, zone of the small domain *Sd*; *b* – function  $\mu(h)$  for the same zones; *c* –  $H_{Sd}$  and  $H_{Ld}$  are the zones of tension in the areas *Ld* and *Sd*,  $T_{Sd}$  and  $T_{Ld}$  are the zones of plasticity in the same areas.  $h_{max}$  is the depth of the indenter stop.

Примечание. *a* – функции  $\Delta h/\Delta z(h)$  для плоской поверхности *Fl*, области большого домена *Ld*, области малого домена *Sd*; *b* – функции  $\mu(h)$  для тех же областей; *c* –  $H_{Sd}$  и  $H_{Ld}$  – зоны натяжения в областях *Ld* и *Sd*,  $T_{Sd}$  и  $T_{Ld}$  – зоны пластичности в тех же областях.  $h_{max}$  – глубина останова индентора.

(200–300) нм – «Sd» и области плоской поверхности мембран – «Fl». Характерный размер зернистых структур в доменах составляет 100–120 нм, что близко к характерным размерам ячейки спектринового матрикса. Размеры доменов определяются количеством зерен в нем [25].

Привели зависимости  $\Delta h/\Delta z(h)$  (рис. 1, *b*) и  $\mu(h)$  (рис. 1, *c*) для трех выделенных областей клетки, показанных на рис. 1, *a*. Процесс погружения зонда в области плоской поверхности (рис. 1, *Fl*) был похож на такой же процесс на планоците (часть 1, рис. 4, *Pl*). Функция  $\Delta h/\Delta z(h)$  падала от 0,8 ( $h=6$  нм) до 0 на глубине 32 нм. Процесс погружения зондов в области доменов *Sd* и *Ld* отличается от такового для плоской поверхности этой же клетки (рис. 1, *b*). В областях доменов регистрировали характерные зоны натяжения  $H_{Sd}$  и  $H_{Ld}$  и зоны пластичности композитного материала мембран  $T_{Sd}$  и  $T_{Ld}$  для малого и большого доменов соответственно. В зонах *H* коэффициент локальной жесткости  $\mu$  мембран возрастал по мере роста  $h$ , а зонах *T* коэффициент  $\mu$  почти не менялся. Наиболее выраженными были эти зоны для большого домена. В зоне  $H_{Ld}$  (26–36 нм)  $\Delta h/\Delta z$  падала от 0,94 до 0,41. Затем возникала зона пластичности –  $T_{Ld}$  (36–90 нм). В этой зоне  $\Delta h/\Delta z$  практически не уменьшалась (0,41–0,38). На глубине  $h=94$  нм зонд прекратил погружение в мембрану. В области малого домена процесс погру-

Dependences  $\Delta h/\Delta z(h)$  (fig. 1, *b*) and  $\mu(h)$  (Fig. 1c) are presented for the three selected cell zones, shown in Figure 1a. The process of probe introduction into the zones of flat surface (fig. 1, *Fl*) was similar to the same process on the planocyte (part 1, fig. 4, *Pl*). The function  $\Delta h/\Delta z(h)$  fell from 0.8 ( $h=6$  нм) to 0 at the depth 32 нм. The process of probes indentation into the *Sd* and *Ld* domain zones differ from that for a flat surface of the same cell (fig. 1, *b*). In the domain zones, characteristic  $H_{Sd}$  and  $H_{Ld}$  tension zones and the zones of plasticity of the membrane composite material  $T_{Sd}$  and  $T_{Ld}$  for small and large domains, respectively, were registered. In zones *H*, the local membranes hardness coefficient  $\mu$  increased with increase of  $h$ ; and in zones *T* the coefficient  $\mu$  almost did not change. These zones were more expressed for the large domain. In the zone  $H_{Ld}$  (26–36 нм),  $\Delta h/\Delta z$  fell from 0.94 to 0.41. Then a zone of plasticity  $T_{Ld}$  (36–90 нм) appeared. In this zone,  $\Delta h/\Delta z$  practically did not decrease (0.41–0.38). At a depth of  $h=94$  нм, the probe stopped its indentation into the membrane. In the zone of a small domain, the indentation process was similar. The tension zone  $H_{Sd}$  was wider (28–58 нм), and the drop of  $\Delta h/\Delta z$  was from 0.83 to 0.3. The plasticity zone  $T_{Sd}$  was from 58 to 64 нм, and the maximum value of the probe indentation was  $h=74$  нм. The function  $\mu(h)$  (fig. 1, *c*) for a flat zone of the membrane *Fl* was an increasing one, similar to this function for the planocyte

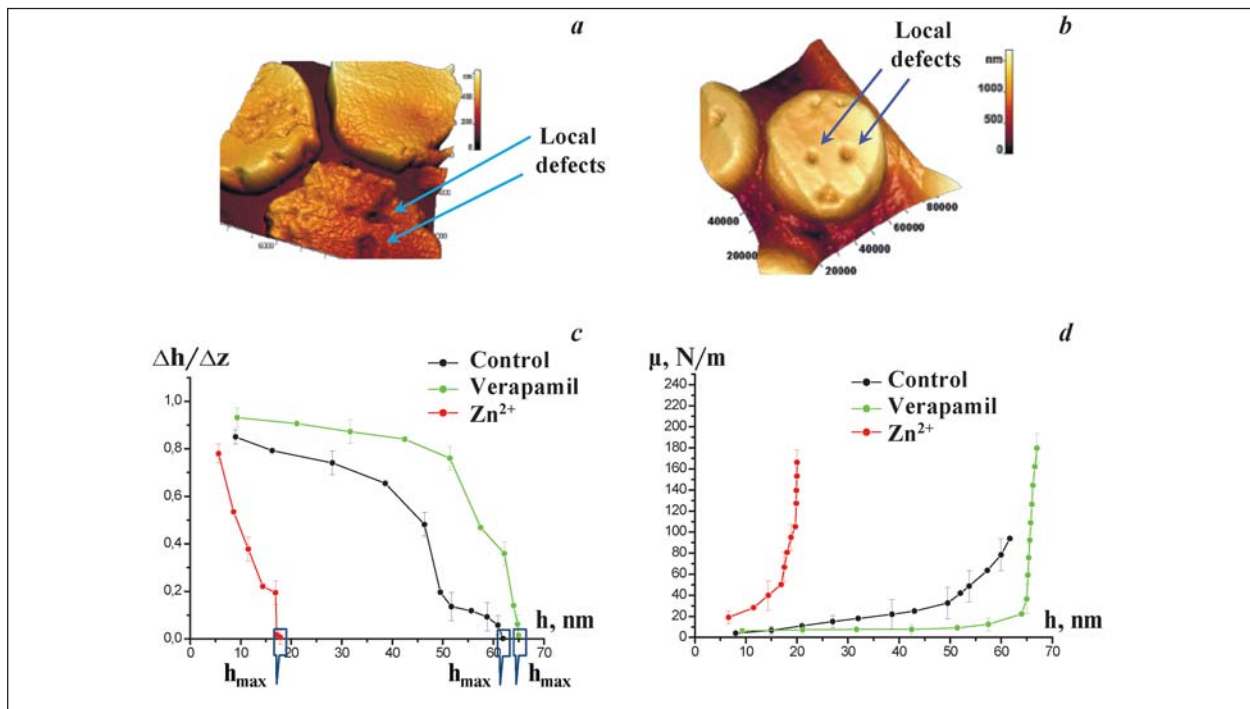


Рис. 2. Локальные дефекты мембран эритроцитов при действии ионов  $Zn^{2+}$  (a) и верапамила (b).

Fig. 2 Local defects of erythrocyte membranes under the effect of  $Zn^{2+}$  ions (a) and verapamil (b).

Note. c – functions  $\Delta h/\Delta z(h)$  for normal discocyte (control), under the effect of  $Zn^{2+}$  ions and verapamil; d – the function  $\mu(h)$  for the same cells.  $h_{max}$  is a depth of the indenter stop.

Примечание. c – функции  $\Delta h/\Delta z(h)$  для нормального дискоцита (контроль), при действии ионов  $Zn^{2+}$  и верапамила; d – функции  $\mu(h)$  для тех же клеток.  $h_{max}$  – глубина остановки индентора.

жения был подобным. Зона натяжения  $H_{sd}$  была шире: (28–58 нм), а падение  $\Delta h/\Delta z$  составило от 0,83 до 0,3. Зона пластичности  $T_{sd}$  была уже: от 58 до 64 нм, а максимальное значение погружения зонда  $h=74$  нм. Функция  $\mu(h)$  (рис. 1, c) для плоского участка мембраны  $Fl$  была нарастающей, подобной этой функции для planoцита (часть 1, рис. 4, c). Для большого домена  $Ld$  функция  $\mu(h)$  имела характерный плоский участок  $T_{Ld}$  внутри которого, величина коэффициента локальной жесткости  $\mu$  мембраны практически не изменялась. Этот участок выделен на рис. 1, c цветным прямоугольником. При локальной деформации мембраны на глубину  $h=90$  нм коэффициент  $\mu$  резко возрастал и это приводило к остановке погружения зонда.

Процесс индентации зонда в мембраны при действии ионов  $Zn^{2+}$  и верапамила.

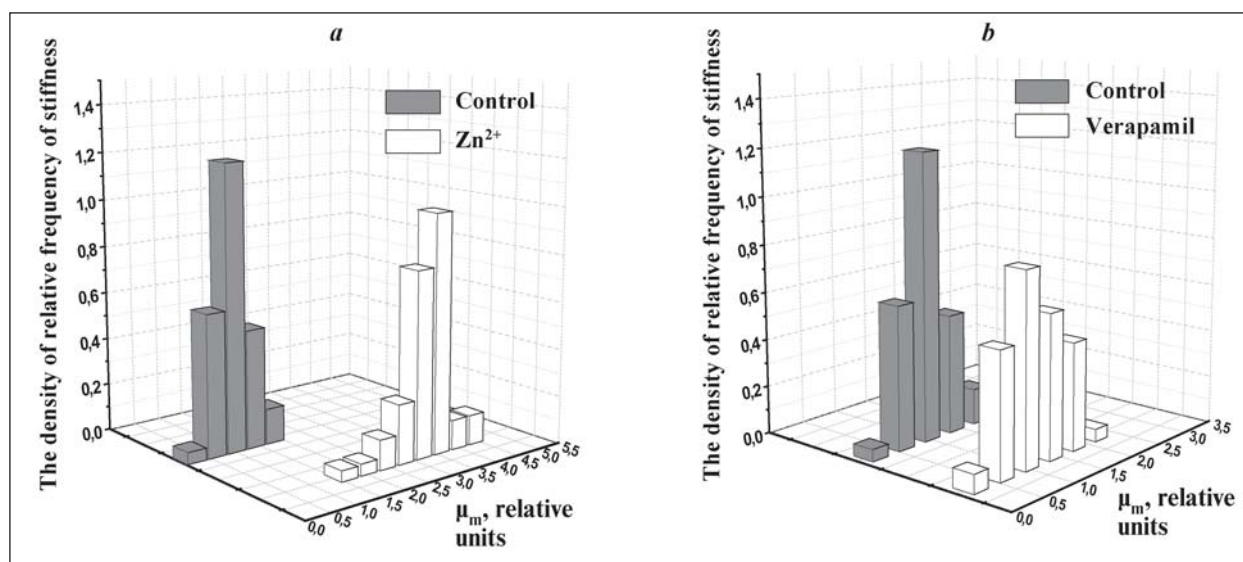
На рис. 2 представили эритроциты с дефектами мембран, вызванными действием ионов цинка и блокатора кальциевых каналов верапамила. Ионы тяжелых металлов и, в частности  $Zn^{2+}$ , при высоких концентрациях (2 мМ и более) всегда вызывают локальные дефекты мембран (рис. 2, a) [26, 27]. Верапамил в клинических концентрациях не вызывает разрушения мембран. В данном исследовании использовали десятикратную дозу препарата *in vitro*, которая вызывала токсический эффект, и, как следствие, специфические локальные дефекты мембран (рис. 2, b).

(part 1, fig. 4, c). For a large domain  $Ld$ , the function  $\mu(h)$  had a characteristic flat zone  $T_{Ld}$  within which the value of the local hardness coefficient  $\mu$  of the membrane remained practically unchanged. This zone is highlighted in fig. 1, c as a colored rectangle. At local deformation of the membrane to the depth  $h=90$  nm, the coefficient  $\mu$  sharply increased resulting in the stop of the probe indentation.

The process of probe indentation into membranes under the effect of  $Zn^{2+}$  ions and verapamil.

Red blood cells with membrane defects, caused by the effect of zinc ions and the calcium channel blocker verapamil are shown in fig. 2. Ions of heavy metals and, in particular,  $Zn^{2+}$ , at high concentrations (2 mM and more) always cause local membrane defects (fig. 2, a) [26, 27]. Verapamil in clinical concentrations does not cause destruction of membranes. This study used a tenfold dose of the drug *in vitro*, which caused a toxic effect, and as a result, specific local membrane defects (fig. 2, b).

The function  $\Delta h/\Delta z(h)$  for membranes damaged by zinc ions had the character of a tension zone, it decreased almost linearly. The probe stopped its indentation at the depth of  $h=18$  nm, thus indicating a 3.6-fold increase in hardness as compared to the normal limits. The same function for verapamil practically repeated the normal curve, and the probe was indented at 65 nm, as under normal conditions (64 nm) (fig. 2, c). The hardness coefficient  $\mu(h)$  for verapamil



**Рис. 3.** Гистограммы плотности относительных частот для мембран эритроцитов при действии ионов  $Zn^{2+}$  (a) и верапамила (b).  
**Fig. 3.** Histograms of the density of relative frequencies for erythrocyte membranes under the effect of  $Zn^{2+}$  ions (a) and verapamil (b).  
**Note.** The coefficient of hardness  $\mu$  is plotted along the abscissa axis, and density of relative frequencies is plotted along the ordinate axis.  
**Примечание.** По оси абсцисс – коэффициент жесткости  $\mu$ , по ординате – относительная плотность частот.

Функция  $\Delta h/\Delta z$  ( $h$ ) для мембран, поврежденных ионами цинка, имела характер зоны натяжения – почти линейно убывала. Зонд прекратил погружение уже на глубине  $h=18$  нм, что указывает на увеличение жесткости в 3,6 раза по сравнению с нормой. Эта же функция для верапамила практически повторяла нормальную кривую, а зонд погрузился на 65 нм, как и в норме (64 нм) (рис. 2, c). Коэффициент жесткости  $\mu$  ( $h$ ) для верапамила практически не менялся на протяжении всего процесса погружения зонда и оставался на уровне нормы (рис. 2, d).

Если ставится задача оценки средней жесткости мембран эритроцитов по ансамблю клеток, то подход к ее решению должен быть иным [28]. За оценку средней жесткости в зоне индентации можно выбрать параметр  $h_{max}$ . В этом случае в разных областях тора дискоцита надо  $m$  раз измерить величину  $h_{max}$  для  $n$  клеток и усреднить ее по некоторому ансамблю. Для иллюстрации на рис. 3 приведены гистограммы распределений средней жесткости мембран эритроцитов при действии на кровь модификаторов мембран: ионов тяжелых металлов ( $Zn^{2+}$ ) и блокатора кальциевых каналов – верапамила.

В данном примере были измерены величины  $h_{max}$  на 6 точках торов 34 эритроцитов для контрольной группы и по столько же для групп действия каждого модификатора. Усреднение и построение гистограмм проводили по ансамблю 204 точек для каждой группы. Ионы цинка (2 мМ *in vitro*) вызвали возникновение локальных дефектов на мембране [26, 27] и увеличивали ее среднюю жесткость в 3,6 раза.

Средняя локальная жесткость мембраны после воздействия на кровь ионами цинка и верапамила ( $M \pm m$ ) (таблица).

did not change practically during the entire process of the probe indentation and remained at the normal level (fig. 2, d).

If there is a task to assess the average hardness of erythrocyte membranes over the ensemble of cells, then the approach to its solution should be different [28]. The parameter  $h_{max}$  is taken as the average hardness in the indentation zone. In this case, in different zones of the discocyte torus we should measure the value  $h_{max}$   $m$  times for  $n$  cells and average it over a certain ensemble. For illustration, the histograms of distributions of the average hardness of erythrocyte membranes are shown in fig. 3 under the effect of the modifiers of membranes on blood: ions of heavy metals ( $Zn^{2+}$ ) and a calcium channel blocker verapamil.

In this example, the values  $h_{max}$  were measured at 6 points of the tours of 34 red blood cells for the reference group and the same amount for the groups of action of each modifier. The averaging and plotting of the histograms were carried out using an ensemble of 204 points for each group. Zinc ions (2 mM *in vitro*) caused local defects on the membrane [26, 27] and increased its average hardness by 3.6-fold.

Verapamil in a concentration that is 8–10 times as high as the clinical dose caused damage of the membrane nanostructure [2], but in this case it did not change their average hardness, that remained similar to that in the reference group ( $P < 0.05$ ).

Each component of the composite membrane has its own mechanical properties. Soft, practically transparent for the probe lipid bilayer is located on the external surface. Spectrin matrix is a dynamically changing structure, consisting of stiff fibers of spectrin, forming a continuous net throughout the whole cell with the average cell size of 80–100 nm [28]. Spec-

**Средняя локальная жесткость мембраны после воздействия на кровь ионами цинка и верапамила ( $M \pm m$ ).  
Average local membrane hardness after the effect of zinc ions and verapamil ( $M \pm m$ ) on blood.**

Parameter	Values of parameter in groups	
C, rel. units	Reference 1.0±0.4 Zinc ions 3.6±1.2*	Reference 1.0±0.6 Verapamil 1.1±0.3

**Note.** \* –  $P < 0.05$  compared with the reference group.

**Примечание.** Parameter – параметр; Values of ... in groups – значения в группах; Reference – контроль; Zinc ions – ионы цинка; Verapamil – верапамил; C, rel. units – К, отн. ед. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Верапамил в концентрации, в 8–10 раз превышающей клиническую дозировку, вызывал повреждения наноструктуры мембран [2], но при этом не изменял их среднюю жесткость, которая оставалась на уровне контроля ( $p < 0,05$ ).

Каждая составляющая композитной мембраны имеет собственные механические свойства. Сверху – мягкий, практически прозрачный для зонда, липидный бислой. Спектриновый матрикс – динамично изменяющаяся структура, состоящая из жестких нитей спектрина, образующих непрерывную сетку по всему объему клетки со средним размером ячейки – 80–100 нм [28]. Спектриновая нить – тетрамер, состоящая из спиральных  $\alpha$  и  $\beta$  мономеров, соединенных микрофиламентами актина. Длина нити может варьировать в широком диапазоне: от 50 и менее до 260 нм [29, 30]. Связываясь с внутренней стороной мембраны с помощью белков band 4.1, band 3, анкирина, актина и других, спектрин стабилизирует фосфолипидный слой и ограничивает латеральную диффузию интегральных белков.

В силу многочисленных и достаточно прочных связей между фосфолипидным бислоем и спектриновым матриксом при действии на клетку индентора эти структуры ведут себя как единая неоднородная (в смысле упруго-эластичных свойств) композитная мембрана клетки.

Процесс погружения зонда в мембрану эритроцита после действия гемина (рис. 1) имел иные тенденции по сравнению с кинетикой погружения в нормальный эритроцит, представленной на рис. 4, часть 1.

Гемин (солянокислый гематин) нарушает конформацию спектрина, белка band 4,1 и ослабляет связь между ними [31]. Он модифицирует конформацию соединительного комплекса «спектрин – белки band 4,1, band 3», индуцирует образование локальных дефектов на поверхности мембран [2, 5, 32]. Эффект модификации матрикса проявляется на процессе погружения зонда в мембрану клетки, на которую подействовали гемомин.

В зонах доменов графики  $\Delta h / \Delta z$  ( $h$ ) имели специфические, характерные только для них особенности. На этих графиках присутствуют зоны натяжений  $H_{Sd}$  и  $H_{Ld}$ , когда градиент функции  $\Delta h / \Delta z$  ( $h$ ) максимальный, и зоны пластичности  $T_{Sd}$  и  $T_{Ld}$ , когда этот градиент близок к 0.

Зоны натяжений  $H_i$  – это участки  $h_i$ , в которых коэффициент локальной жесткости  $\mu$  возрас-

trin fiber is a tetramer consisting of spiral  $\alpha$  and  $\beta$  monomers connected by actin microfilaments. The length of the fiber can vary over a wide range: from 50 to less than 260 nm [29, 30]. Binding to the inner side of the membrane by means of band 4.1 and band 3 proteins, ankyrin, actin and others, spectrin stabilizes the phospholipid layer and limits lateral diffusion of integral proteins.

Due to the numerous and quite strong links between the phospholipid bilayer and the spectrin matrix under the action of the indenter on the cell, these structures behave as a single heterogeneous (in the sense of its elastic properties) composite cell membrane.

The process of the probe indentation into the erythrocyte membrane after the action of hemin (fig. 1) had other tendencies compared to kinetics of indentation in the normal red blood cell, presented in fig. 4 part 1.

Hemin (hydrochloric acid hematin) disrupts the conformation of spectrin, band 4.1 protein and weakens the bond between them [31]. It modifies the conformation of the «spectrin-protein band 4.1, band 3» binding complex and induces the formation of local defects on the membrane surface [2, 5, 32]. The effect of modifying the matrix is manifested in the immersion of the probe into the cell membrane, which was affected by the hemin.

In the zones of domains, the graphs  $\Delta h / \Delta z$  ( $h$ ) had specific features, typical for them alone. On these graphs, there are tension zones  $H_{Sd}$  and  $H_{Ld}$ , when the gradient of the function  $\Delta h / \Delta z$  ( $h$ ) is maximal, and the plasticity sites  $T_{Sd}$  and  $T_{Ld}$ , when this gradient is close to 0.

The tension zones  $H_i$  are the sites  $h_i$  in which the local hardness coefficient  $\mu$  increases, and the indenter immersion slows down sharply. In the zones of plasticity of  $T_i$ , the coefficient of local hardness  $\mu$  remains practically unchanged (Fig. 1c), and, consequently,  $\Delta h$  does not change in this region. The dimensions of the tension zones and the plasticity zones of  $H_i$  and  $T_i$  depend on the size of the domains formed on the surface of the membranes as a result of the action of hemin.

Before the tension zones  $H_{Sd}$  and  $H_{Ld}$ , the probe was introduced in the cell membrane almost freely. The differential  $\Delta h_i$  was only 0.1. The probe was introduced up to the indicated depths and reached the matrix. For these values of  $h_i$ , the matrix was in an unstressed state and deformed (deflected) freely, without tension. This is the plastic deformation membrane zone. In the zones  $H_i$ , the hardness of the medium in-

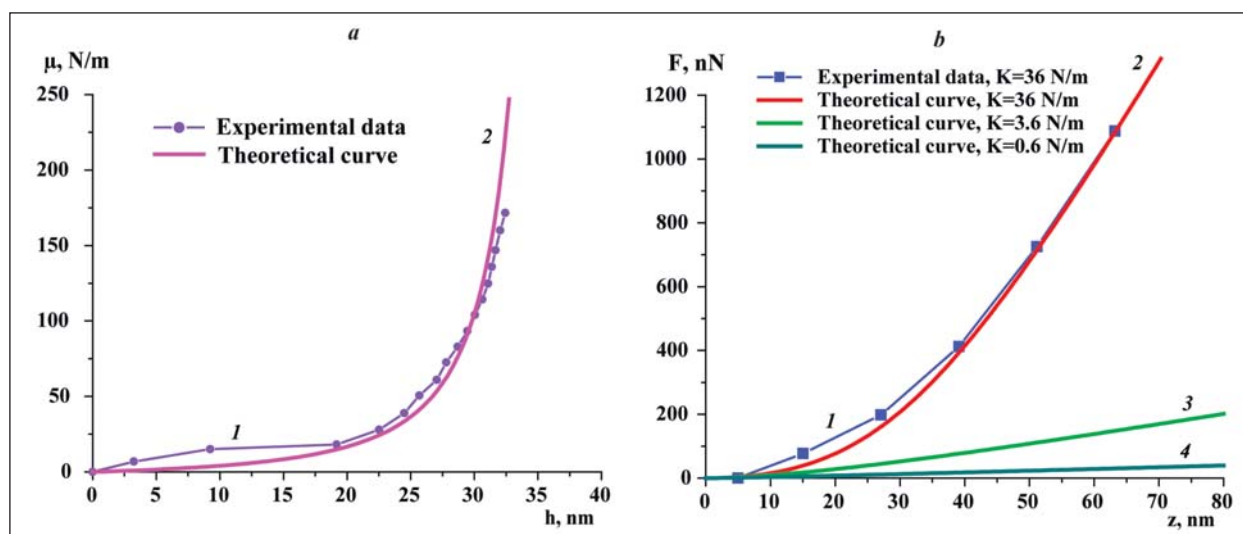


Рис. 4. Зависимости:  $\mu(h)$  модельные и экспериментальные (а),  $F(z)$  для различных значений  $K$  (б).  
Fig.4. Model and experimental dependences  $\mu(h)$  (а),  $F(z)$  for different  $K$  values (б).

тает, и погружение индентора резко замедляется. В зонах пластичности  $T_i$  коэффициент локальной жесткости  $\mu$  остается практически неизменным (рис. 1, с), а, следовательно, и  $\Delta h$  не меняется в этой области. Размеры зон натяжения и зон пластичности  $H_i$  и  $T_i$  зависят от размеров доменов, образовавшихся на поверхности мембран в результате действия гемина.

До зон натяжения  $H_{Sd}$  и  $H_{Ld}$ , зонд погружался в мембрану клетки почти свободно. Перепад  $\Delta h_i$  составил всего 0,1. Зонд погрузился до указанных глубин и достиг матрикса. Для этих значений  $h_i$  матрикс находился в ненапряженном состоянии и деформировался (прогибался) свободно, без натяжения. Эта область пластичной деформации мембраны. В зонах  $H_i$  жесткость среды резко возрастала. Перепад  $\Delta h/\Delta z$  составлял 0,5 для области малого домена  $Sd$  и 0,53 в области большого домена  $Ld$ . Матрикс начинал упруго деформироваться. Его нити растягивались, создавая практически максимальную спиральную упругость среды. Когда зонд погружался в мембрану на величину, близкую к  $h_{max}$ , спектриновая нить, уже потерявшая спиральную упругость (конфигурацию), растягивалась до максимальной возможной длины. После этого нить становилась почти абсолютно жесткой, и зонд прекращал движение –  $\Delta h=0$ .

В контексте рассмотренной задачи перспективно было бы поставить эксперименты по изучению упругих свойств матрикса на выделенной спектриновой сети. Хотя такие опыты проводились [33], интерпретация их результатов на целую клетку крови на сегодня – трудно разрешимая задача.

Кроме рассмотренных структур мембраны эритроцита на величины  $\Delta h$  и  $h_{max}$  может влиять внутреннее содержание клетки. Это гемоглобин и цитоплазма. Учитывая, что молекула гемоглобина

creased sharply. The difference  $\Delta h/\Delta z$  was 0.5 for the small domain  $Sd$  and 0.53 for the large domain  $Ld$ . Matrix began to be deformed elastically. Its fibers were stretched, creating almost the maximum spiral elasticity of the medium. When the probe is introduced into the membrane at a depth close to  $h_{max}$ , the spectral fiber that has already lost its spiral elasticity (configuration) is stretched to the maximum possible length. After that, the thread became almost completely hard, and the probe stopped its movement ( $\Delta h=0$ ).

In the context of the considered problem, it would be perspective to arrange experiments to study the elastic properties of the matrix on the isolated spectrin network. Although such experiments are conducted [33], but the extrapolation of their results the whole blood cell is still a difficult problem.

In addition to the considered structures of the red blood cell membrane, the internal content of the cell may influence on the values  $\Delta h$  and  $h_{max}$ . This is hemoglobin and cytoplasm. Considering that the molecule of hemoglobin has a size of about 5 nm and these molecules are freely immersed in the liquid medium of cytoplasm, this may be modeled by a drop of liquid in a soft coating [18, 34]. The influence of these medium on the measurement of  $\mu$  membrane is insignificant [35].

**Modeling of the process of erythrocyte membrane deformation.** We will consider the «membrane – probe with cantilever» system as consistently connected springs with hardness coefficients  $\mu$  and  $K$ , respectively. The hardness of the probe is an infinitely large value, so the coefficient  $K$  is entirely determined by the hardness of the cantilever.

Under the conditions of the presented experiments, when the piezo scanner is raised on the height of  $z$ , the probe enters the membrane to the depth  $h$  (deformation of the membrane), while the cantilever deformation take place (displacement of the end of the balk) at a level  $L$ . The point  $z=0$  is the point of contact



имеет размер порядка 5 нм и эти молекулы свободно погружены в жидкую среду цитоплазмы, это влияние можно моделировать каплей жидкости в мягкой оболочке [18, 34]. Влияние такой среды на измерение  $\mu$  мембраны пренебрежимо мало [35].

**Моделирование процесса деформации мембран эритроцитов.** Систему «мембрана – зонд с кантилевером» рассматривали как последовательно соединенные пружины с коэффициентами жесткости  $\mu$  и  $K$  соответственно. Жесткость зонда – бесконечно большая величина, поэтому коэффициент  $K$  целиком определяется жесткостью кантилевера.

В условиях представленных опытов при подъеме пьезосканера на величину  $z$  зонд входит в мембрану на глубину  $h$  (деформация мембраны), при этом происходит деформация кантилевера (смещение конца балки) на величину  $L$ . Точка  $z=0$  – точка касания зонда с мембраной, тогда:  $z>0$ ,  $h>0$ ,  $L>0$ . Связь  $h$ ,  $z$  и  $L$  определяли соотношением:

$$h=z-L, (1).$$

В модели сделали следующие допущения:

Коэффициент жесткости кантилевера  $K$  не изменяется в ходе измерения.

Коэффициент жесткости мембраны  $\mu$  нелинейно зависит от  $h$ . Это обусловлено изменением механических свойств мембраны по мере ее деформации, в частности модификацией конфигурации спектринного матрикса [36].

Пусть:

$$\mu(h) = \frac{a}{(h-b)^2} + c, (2)$$

где  $a$ ,  $b$ ,  $c$  – параметры,  $c = -a/b^2$ .

Коэффициент  $a$  определяет, крутизну функции  $\mu(h)$ , то есть, на сколько резко изменяется  $\mu$  по мере погружения зонда в мембрану. Коэффициент  $b$  имеет размерность и физический смысл  $h_{max}$ .

На рис. 4 представили график зависимости  $\mu(h)$ .

Эта зависимость согласуется с данными изменения механических свойств при изменении конфигурации спектриновых нитей [37].

Условие равновесия: сила со стороны кантилевера равна силе со стороны мембраны:

$$F = K \cdot L = \int_0^h \mu(h) dh, (3).$$

С помощью ряда математических преобразований и с учетом (1), (2), (3) получаем графики зависимостей  $F(z)$  и  $\mu(h)$  для впадины дискоцита (рис. 4).

При  $h \rightarrow h_{max}$  коэффициент жесткости мембраны стремится к бесконечности ( $\mu \rightarrow \infty$ ), что и является причиной остановки индентора. При этом коэффициент жесткости всей системы  $K_{суст}$  (последовательно соединенных пружин с коэффициентами  $K$  и  $\mu$ ) будет стремиться к жесткости кантилевера:  $K_{суст} \rightarrow K$ .

На практике уже при  $\mu \approx 5K$  коэффициент жесткости всей системы  $K_{суст}$  становится достаточно большим, что бы вызвать остановку индентора. В модели – это величина  $b=38$  нм, а в эксперименте

of the probe with the membrane, then  $z>0$ ,  $h>0$ ,  $L>0$ . The relationship between  $h$ ,  $z$  and  $L$  is defined by the relation:

$$h=z-L, (1).$$

The following assumptions are made in the model:

1. The cantilever hardness coefficient  $K$  is not changed during the measurement.

2. The membrane hardness coefficient  $\mu$  depends on  $h$  nonlinearly. This is caused by the change in the mechanical properties of the membrane as it deforms, in particular by modification of the configuration of the spectrin matrix [36].

Let us introduce the equation:

$$\mu(h) = \frac{a}{(h-b)^2} + c, (2)$$

where  $a$ ,  $b$ ,  $c$  are the parameters,  $c = -a/b^2$ .

The coefficient  $a$  determines the steepness of the function  $\mu(h)$ , that is, how sharply  $\mu$  varies as the probe enters the membrane. The coefficient  $b$  has dimension and a physical meaning of  $h_{max}$ .

The  $\mu(h)$  dependence curve is presented in fig. 4.

This dependence agrees with the data on the change in the mechanical properties when the configuration of spectral fibers is changed [37].

The condition of equilibrium: the cantilever force is equal to the membrane force:

$$F = K \cdot L = \int_0^h \mu(h) dh, (3).$$

Using a number of mathematical transformations and taking into account (1), (2) and (3), we obtain the graphs of dependencies  $F(z)$  and  $\mu(h)$  for the discocyte cavity (fig. 4).

For  $h \rightarrow h_{max}$ , the membrane hardness coefficient tends to infinity ( $\mu \rightarrow \infty$ ), which is the reason for stop of the indenter. In this case, the hardness coefficient of the entire system  $K_{syst}$  (successively connected springs with coefficients  $K$  and  $\mu$ ) will tend to the hardness of the cantilever:  $K_{syst} \rightarrow K$ .

In practice, even at  $\mu \approx 5K$ , the hardness coefficient of the entire system  $K_{syst}$  grows enough to cause the stop of indenter. In the model, the value  $b=38$  nm, and in the experiment for the discocyte cavity (part 1, fig. 4, b), the probe stopped at a depth of  $h_{max}=35$  nm. Therefore, in the experimental dependences of  $\mu(h)$  near the point  $h_{max}$ , the graphs do not become vertical ( $\mu \rightarrow \infty$ ), but go at the some angle  $\gamma < \pi/4$  (part 1, fig. 4, c). This is facilitated by the frictional forces (not included in the model) between the surfaces of the indenter and the membrane.

As it is seen in the graphs in fig. 4 at a given coefficients  $a$  and  $b$ , the dependences  $F(z)$  and  $\mu(h)$  obtained at the modeling adequately describe these dependences obtained in the experiment.

## Conclusion

The process of elastic deformation of membrane is shown as the probe is introduced at the sites of local defects caused by modifiers of various nature. The



