

УДК 53.086:616.155.2

МЕТОД АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ТРОМБОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Л.В. КУХАРЕНКО, С.А. ЧИЖИК, Е.С. ДРОЗД,
М.В. ГОЛЬЦЕВ, Н.Н. МОРОЗ-ВОДОЛАЖСКАЯ

Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 2 ноября 2018

Аннотация. Методом атомно-силовой микроскопии производилась оценка внутрисосудистой активации тромбоцитов и определялись локальный модуль упругости, адгезия, жесткость мембраны тромбоцитов у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности с использованием имплантируемого двухжелудочкового вспомогательного сердца на этапах до операции и интраоперационно: до введения гепарина, после введения гепарина, после нейтрализации гепарина протамином.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, тромбоциты, терминальная стадия хронической сердечной недостаточности.

Abstract. Atomic force microscopy was used to estimate the intravascular platelet activation and determine local elastic modulus, adhesion and stiffness of the platelets membrane in patients with end-stage of chronic heart failure with heart ventricle implantation before surgery and intrasurgical: before the heparin injection, after the heparin injection and after neutralization of heparin with protamine.

Keywords: atomic force microscopy, platelets, end-stage of chronic heart failure.

Doklady BGUIR. 2018, Vol. 117, No. 7, pp. 12-17

Atomic force microscopy method in the study of platelets of patients with end-stage of chronic heart failure

L.V. Kukharenko, S.A. Chizhik, E.S. Drozd, M.V. Goltsev, N.N. Maroz-Vadalazhskaya

Введение

В настоящее время атомно-силовая микроскопия (АСМ) широко используется в исследованиях медико-биологических объектов [1]. Методы АСМ и спектроскопии позволяют не только визуализировать и модифицировать поверхностную морфологию медико-биологических объектов на атомном и молекулярном уровнях в различных окружающих средах (в вакууме, на воздухе, в газах и жидкостях), но и оценить количественно некоторые физические параметры мембраны клетки, такие как локальный модуль Юнга [2, 3]. Механические свойства клеток могут быть оценены следующими методами АСМ: силовой спектроскопией, картированием латеральных сил, методом модуляции силы, а также регистрацией фазового изображения в динамическом режиме.

Известно, что тромбоциты играют одну из ключевых ролей в патогенезе хронической сердечной недостаточности. Поэтому характеристика упруго-вязких свойств клеточной мембраны тромбоцитов особенно важна, так как именно они являются интегральными показателями морфофункционального состояния кровяных пластинок. Использование различных методов АСМ в исследовании кровяных пластинок позволяет охарактеризовать гемостазиологический статус пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

В данной работе методом АСМ определялись локальные вязко-упругие характеристики мембраны тромбоцитов (локальный модуль Юнга, адгезия, жесткость) пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности с использованием имплантируемого вспомогательной желудочковой системы (ВЖС) для сердца на этапах до операции и интраоперационно: до введения гепарина, после введения гепарина, после нейтрализации гепарина протаминамом, а также производилась оценка внутрисосудистого состояния тромбоцитов для оценки их адгезивной и агрегационной активности.

Методика эксперимента

Исследование упругих свойств кровяных пластинок осуществлялось при помощи специализированного экспериментального комплекса, совмещающего функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии. Данный комплекс состоит из атомно-силового микроскопа NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) с возможностями микропозиционирования зонда над образцом в пределах площадки 10×10 мм и оптической системы (НПРУП «ЛЭМТ» БелОМО, Беларусь). АСМ сканирование проводили стандартными кремниевыми зондами в контактном режиме. Статическая силовая спектроскопия так же выполнялась кремниевыми зондами CSC38 («MikroMasch» Co., Эстония) с жесткостью консоли 0,03 Н/м. Радиус закругления острия игл, используемых для оценки упругих свойств, составлял 60 нм. Суть статической силовой спектроскопии состоит в реализации контактного деформирования исследуемого объекта острием зонда и измерении зависимости силы взаимодействия зонда с поверхностью образца от расстояния между ними. Расчет модуля упругости выполнялся по регистрируемым кривым с использованием модели Герца. Данные, полученные в результате исследования упругих свойств клеток методом АСМ, были обработаны статистически с вычислением среднего значения и его ошибки с использованием программы «Microcal (TM) Origin Version: 6.0».

Исследование топографии поверхности тромбоцитов осуществлялось с помощью АСМ Nanoscope (R) Ша (Veeco) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием стандартных кремниевых кантилеверов ($k = 29\text{--}57$ Н/м, Nanosensors GmbH). Наряду с топографией поверхности, поточно определялись локальная жесткость и адгезия тромбоцитов методом Pulse Force Modulation (PFM), который расширяет возможности АСМ. Отличительной особенностью PFM является то, что в данном методе отсутствуют боковые силы, т. к. латеральное движение зонда происходит вне контакта с исследуемой поверхностью, что является важным для изучения мягких биообъектов. Слюдя использовалась в качестве подложки для АСМ-исследований тромбоцитов.

Для того чтобы исследуемые вязко-упругие характеристики и морфологические признаки тромбоцитов соответствовали их функциональному состоянию в кровотоке, что особенно важно как для диагностических целей, так и для определения морфологических изменений, происходящих с тромбоцитами на этапах до операции и интраоперационно, забор крови из локтевой вены проводился максимально быстро. Далее 2 мл крови фиксировали в 4 мл 0,125 % глутаральдегида. Фиксированную кровь сразу же центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). По одному кусочку свежесколотой слюды помещали на дно микропробирок, в которые добавляли 400 мкл клеточной суспензии. Микропробирки центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 с для осаждения тромбоцитов на слюду. Через 20 мин образцы промывали фосфатным буфером, а затем дегидратировали, последовательно помещая подложки с тромбоцитами в растворы этанола разной концентрации, и высушивали на воздухе.

Результаты и их обсуждение

Анализ полученных АСМ-изображений интактных тромбоцитов здоровых доноров показал, что тромбоциты, циркулирующие в кровотоке при отсутствии патологических активирующих факторов, интактны и имеют дисковидную или овальную формы. Диаметр интактных тромбоцитов в среднем составлял 2,5–3 мкм, высота – 300 нм.

Комплексный подход к исследованию кровяных пластинок осуществлялся путем измерения контраста упругих и адгезионных сил одновременно с топографией поверхности клеток. На рис. 1 представлены АСМ изображения (*a* – топография, *б* – контраст адгезионных сил, *в* – контраст упругих сил) тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочковой ВЖС) на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина. Более темные по цвету области на АСМ-изображениях по адгезионным силам и жесткости мембраны тромбоцитов соответствуют более низким значениям сил адгезии и жесткости.

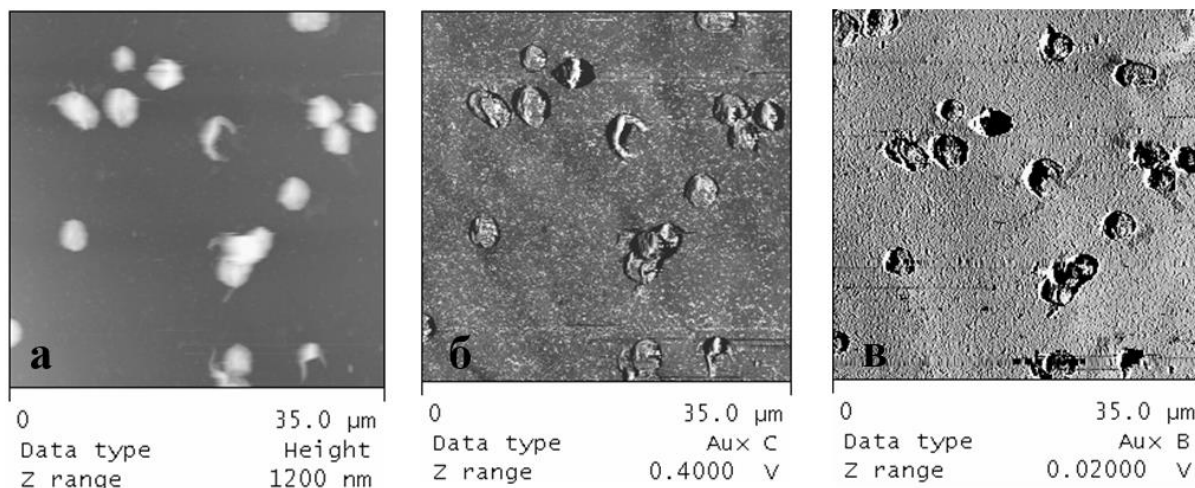


Рис. 1. АСМ-изображение тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочковой ВЖС) на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина:
a – топография; *б* – контраст адгезионных сил; *в* – контраст упругих сил

На рис. 2 показаны АСМ изображения тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочковой ВЖС) на этапе интраоперационного исследования после введения гепарина.

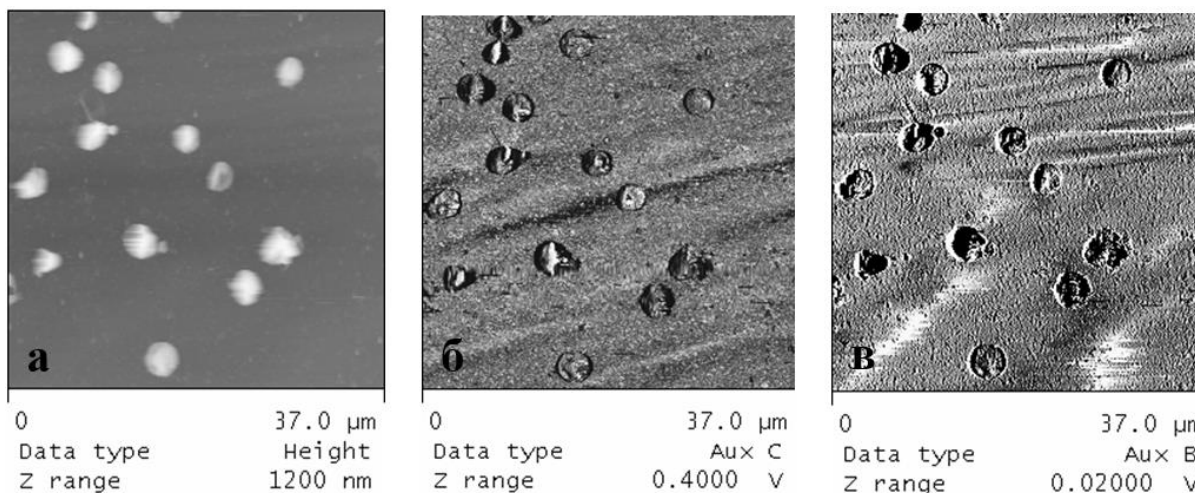


Рис. 2. АСМ-изображение тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочковой ВЖС) на этапе интраоперационного исследования после введения гепарина:
a – топография; *б* – контраст адгезионных сил; *в* – контраст упругих сил

На рис. 3 представлены АСМ изображения тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочковой ВЖС) на этапе интраоперационного исследования после нейтрализации гепарина протаминам. Контраст адгезионных сил (рис. 1, *б*, рис. 2, *б*, рис. 3, *б*) показывает, что силы, обусловленные адгезионным взаимодействием острия зонда с поверхностью тромбоцитов, меньше на этапе интраоперационного исследования после введения гепарина и на этапе интраоперационного исследования после нейтрализации гепарина протаминам. Как видно из АСМ-изображений контраста упругих сил, жесткость

мембраны тромбоцитов также уменьшается после введения гепарина и после нейтрализации гепарина протамином. В результате оценки локального модуля упругости методом атомно-силовой микроскопии было установлено, что модуль упругости тромбоцитов у пациентов основной группы (имплантация двухжелудочкового ВЖС) на этапе дооперационного исследования ($E = 111,8 \pm 6,9$ кПа) достоверно выше, чем в группе здоровых лиц ($E = 62,6 \pm 6,2$ кПа).

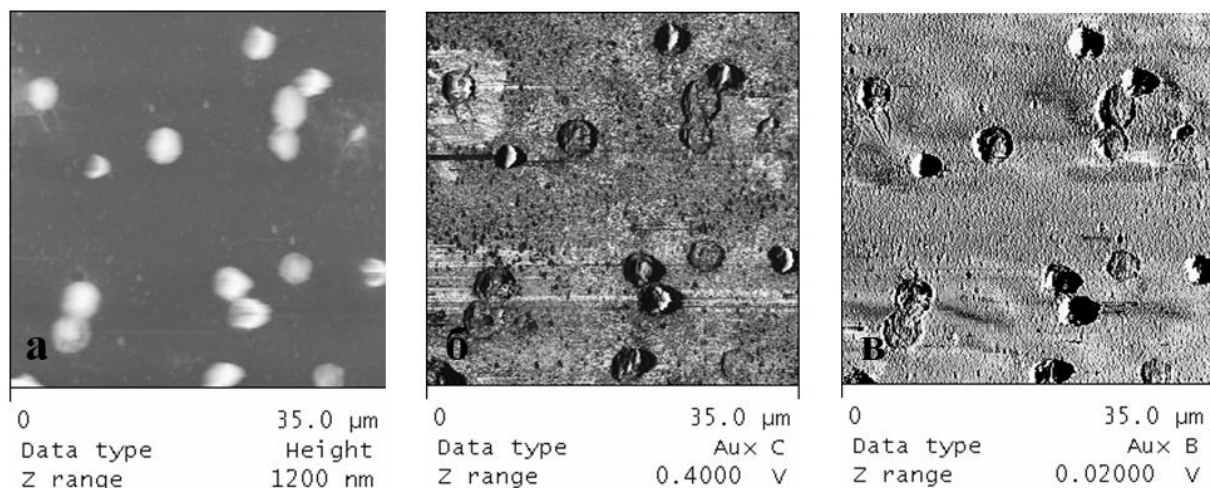


Рис. 3. АСМ-изображение тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочкового ВЖС) на этапе интраоперационного исследования после нейтрализации гепарина протамином:
a – топография, *б* – контраст адгезионных сил, *в* – контраст упругих сил.

При воздействии патологических активирующих факторов происходит изменение формы и размеров тромбоцитов, отражающее процессы их внутренней ультраструктурной и биохимической перестройки. С помощью АСМ выявлена внутрисосудистая активация тромбоцитов, проявляющаяся в изменении морфофункционального состояния кровяных пластинок. Визуализировано последовательное изменение формы кровяных пластинок, что отражает определенное функциональное состояние клетки. Метод АСМ позволил не только регистрировать различные стадии внутрисосудистой активации тромбоцитов, но и исследовать их спонтанную агрегацию.

На рис. 4 представлено АСМ-изображение тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочкового ВЖС) на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина. АСМ исследования показали, что тромбоциты на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина имели дисковидную форму (дискоэхиноциты) с диаметром 1,8–2,5 мкм и высотой 400–550 нм. Визуализировано большое количество кровяных пластинок с филоподиями длиной от 500 нм до 2,5 мкм. Появление филоподий увеличивает частоту столкновений тромбоцитов и способствует их спонтанной агрегации в кровяном русле. Наблюдалось небольшое количество сфероцитов высотой 900 нм. Также визуализированы тромбоцитарные агрегаты диаметром от 5 до 13 мкм. Количество тромбоцитов в агрегатах варьировало от 2 до 11.

Для пациентов на этапе интраоперационного исследования после введения гепарина наблюдалось уменьшение количества тромбоцитов с филоподиями, а также тромбоцитарных агрегатов. С помощью АСМ визуализированы тромбоциты сферической формы диаметром от 1,9 до 2,2 мкм и высотой 900 нм на этапе интраоперационного исследования после нейтрализации гепарина протамином, а также наблюдалось уменьшение количества тромбоцитов с филоподиями и тромбоцитарных агрегатов. Целесообразность определения с помощью АСМ спонтанных тромбоцитарных агрегатов (их количества и количества тромбоцитов в агрегатах) обуславливается тем, что в процессе агрегации тромбоциты выделяют большое количество как дальнейших индукторов активации и агрегации, так и сильных вазоконстрикторов.

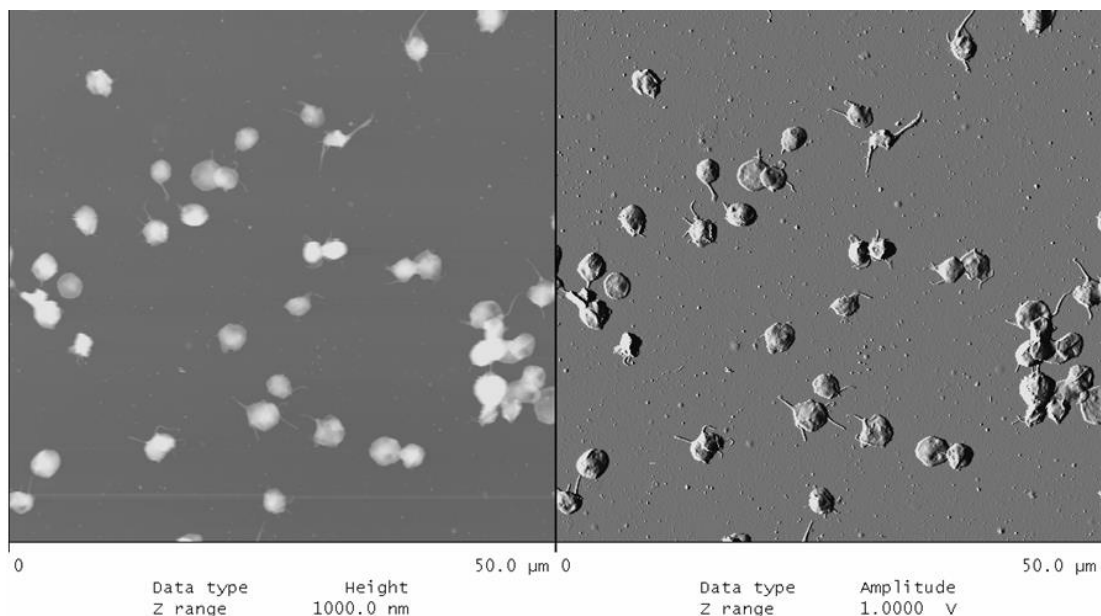


Рис. 4. АСМ-изображение тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочкового ВЖС) на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина

Заключение

С помощью АСМ выявлена внутрисосудистая активация тромбоцитов, а также увеличение адгезивной и агрегационной активности кровяных пластинок у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности. В результате оценки модуля упругости методом АСМ было установлено, что у пациентов основной группы (имплантация двухжелудочкового ВЖС) на этапе дооперационного исследования модуль упругости тромбоцитов ($E = 111,8 \pm 6,9$ кПа) достоверно выше, чем в группе здоровых лиц ($E = 62,6 \pm 6,2$ кПа). При повторных заборах крови наблюдается тенденция к увеличению модуля упругости кровяных пластинок относительно исходных значений, следовательно, эластичность мембраны тромбоцитов снижается и клетки становятся более жесткими. Значение модуля упругости у здоровых лиц существенно отличается от значения данного параметра у пациентов с имплантированным двухжелудочковым ВЖС в ранние и поздние сроки после операции. Так, значение локального модуля упругости на 30 сутки после операции в 2,4 раза больше значения локального модуля упругости у здоровых лиц.

Список литературы / References

1. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology / Y.F. Dufrene [et al.] // Nature Nanotechnology. 2017. Vol. 12. P. 295–307.
2. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope / M. Radmacher [et al.] // Biophys. J. 1996. P. 556–567.
3. Toward correlating structure and mechanics of platelets / S. Sorrentino [et al.] // Cell Adhesion and Migration. 2016. Vol. 10. P. 568–575.

Сведения об авторах

Кухаренко Л.В., к.ф.-м.н., доцент, доцент Белорусского государственного медицинского университета.

Чижик С.А., д.т.н., академик, главный научный сотрудник ГНУ «Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси».

Information about the authors

Kukhareno L.V., PhD, associate professor, associate professor of Belarusian state medical university.

Chizhik S.A., D.Sci, academician, head researcher of Heat and mass transfer institute named after A.V. Luikov of National academy of sciences of Republic of Belarus.

Дрозд Е.С., к.ф.-м.н., научный сотрудник
ГНУ «Институт тепло- и массообмена
им. А.В. Лыкова НАН Беларуси».

Гольцев М.В. к.ф.-м.н., доцент, заведующий
кафедрой медицинской и биологической физики
Белорусского государственного медицинского
университета.

Мороз-Водолажская Н.Н., к.м.н., доцент
Белорусского государственного медицинского
университета.

Адрес для корреспонденции

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр. Дзержинского, 83
Белорусский государственный
медицинский университет
тел. +375-44-554-73-28
e-mail: KukharenkoLV@bsmu.by
Кухаренко Людмила Валентиновна

Drozdz E.S., PhD., researcher of the Heat and mass
transfer institute named after A.V. Luikov of National
academy of sciences of Republic of Belarus.

Goltsev M.V., PhD., associate professor, head
of medical and biological physics department
of Belarusian state medical university.

Maroz-Vadalazhskaya N.N., PhD, associate professor
of Belarussian state medical university.

Address for correspondence

220116, Republic of Belarus,
Minsk, Dzerzhinsky ave., 83,
Belarussian state
medical university
tel. +375-44-554-73-28
e-mail: KukharenkoLV@bsmu.by
Kukharenko Lyudmila Valentinovna