



Оригинальная статья

Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов

Шерстюкова Е.А.^{1,2} • Иноземцев В.А.¹ • Козлов А.П.² • Гудкова О.Е.¹ • Сергунова В.А.¹

Шерстюкова Екатерина Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9962-6315>
✉ 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25–2, Российская Федерация. Тел.: +7 (985) 965 78 17.
E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Иноземцев Владимир Александрович – науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4693-5624>. E-mail: va.inozemcev@physics.msu.ru

Козлов Александр Павлович – канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Гудкова Ольга Евгеньевна – ст. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

Сергунова Виктория Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., заведующая лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8425-0845>. E-mail: vika_23s82@mail.ru

¹ Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФНЦ РР; 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

Обоснование. Механические свойства мембран клеток и их структурная организация считаются одними из наиболее важных биологических параметров, влияющих на функциональное состояние клетки. При воздействии патогенных факторов различной природы мембраны эритроцитов теряют эластичность. Как при этом изменяются их биомеханические характеристики – вопрос важный, но малоизученный. Представляется интересным изучить деформацию нативных эритроцитов на глубину, соизмеримую с их деформацией в кровотоке.

Цель – исследовать закономерности глубокой деформации и особенности структурной организации мембран нативных эритроцитов до и после воздействия физико-химических агентов *in vitro*.

Материал и методы. Морфологию клеток, особенности наноструктуры и деформации мембран нативных эритроцитов в растворе гемоконсерванта CPD/SAGM исследовали с использованием атомно-силового микроскопа NTEGRA Prima. В качестве модификаторов применяли гемин, ионы цинка (Zn^{2+}) и ультрафиолетовое излучение (УФ). Для характеристики жесткости мембраны измеряли силовые кривые $F(h)$, h_{Hz} – глубину, до которой процесс погружения зонда описывается взаимодействием с однородной средой, а также оценивали величину модуля Юнга мембраны эритроцитов.

Результаты. Установлено, что воздействие гемина, Zn^{2+} и УФ приводило к трансформации формы клеток, возникновению топологических дефектов и изменению механических характеристик мембран эритроцитов. При воздействии

гемина модуль Юнга увеличился с 10 ± 4 до $27,2 \pm 8,6$ кПа ($p < 0,001$), под влиянием Zn^{2+} – до $21,4 \pm 8,7$ кПа ($p = 0,002$), УФ – до $18,8 \pm 5,6$ кПа ($p = 0,001$). Величина h_{Hz} составила 815 ± 210 нм для контрольного образца и уменьшалась после действия гемина до 420 ± 80 нм ($p < 0,001$), Zn^{2+} – до 370 ± 90 нм ($p < 0,001$), УФ – 614 ± 120 нм ($p = 0,001$).

Заключение. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов взаимодействия поверхностей мембран нативных эритроцитов со стенками мелких сосудов и могут быть полезны в клинической медицине как дополнительные характеристики при оценке качества эритроцитов, а также послужить основой для биофизических исследований механизма действия окислительных процессов различного происхождения.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, деформируемость мембраны, эритроциты, гемин, ионы цинка, ультрафиолетовое излучение, дефекты мембран

Для цитирования: Шерстюкова ЕА, Иноземцев ВА, Козлов АП, Гудкова ОЕ, Сергунова ВА. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):427–434. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-059.

Поступила 12.11.2021; доработана 25.11.2021; принята к публикации 29.11.2021; опубликована онлайн 06.12.2021

Механические свойства мембран клеток и их структурная организация считаются одними из наиболее важных биологических параметров, влияющих на функциональное состояние клетки, поскольку могут служить пусковым механизмом развития патологических процессов. В этой связи ведутся исследования наноструктуры

и механических свойств мембран клеток в разных условиях: воздействия физико-химических факторов, протекания воспалительных процессов в организме, при различных заболеваниях, под действием ионизирующего излучения, гемотрансфузии и др.

Эритроциты обладают уникальной способностью подвергаться клеточной деформации

и проходить через капилляры, размер которых меньше их диаметра, и выполнять свою роль в качестве переносчиков газа между кровью и тканями [1, 2]. Известно, что при микрососудистых заболеваниях, таких как диабетические осложнения, при серповидноклеточной анемии [3], гипергликемии [4], во время хранения донорской крови [5–7], при воздействии окислителей [1, 8–14], ионизирующего излучения [15, 16] и других факторов изменяются биомеханические характеристики, структура и упруго-эластичные свойства мембран эритроцитов, что в дальнейшем может привести к снижению скорости капиллярного кровотока и развитию застойных явлений в микроциркуляции.

Механические свойства эритроцитов во многом определяются жесткостью их мембран и состоянием цитоскелета, выстилающего внутреннюю сторону клетки [17]. Их оценка – технически и методически весьма сложная задача, которая может быть решена только путем измерения свойств нативных клеточных мембран [7, 18], исключая применение мембранных фиксаторов [19, 20]. Только в этом случае результат будет максимально приближен к характеристикам живого биологического объекта. Однако остается неясным, сохраняют ли эритроциты способность претерпевать значительные деформации, соизмеримые с деформацией в капиллярном русле. Для решения данной задачи наиболее перспективным представляется метод атомно-силовой спектроскопии.

Цель – исследовать закономерности глубокой деформации и особенности структурной организации мембран нативных эритроцитов до и после воздействия патогенных факторов *in vitro*.

Материал и методы

На рис. 1 дана схема эксперимента. Все эксперименты проводили *in vitro*. На первом этапе эксперимента удаляли остатки консервирующего раствора путем трехкратного центрифугирования 200 мкл эритроцитной взвеси (ЭВ) при 1500 об/5 минут в фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7,4 (MP Biomedicals, Франция). На втором этапе к эритроцитам добавляли различные модификаторы или воздействовали ультрафиолетовым излучением (УФ).

Для экспериментов использовали ЭВ в герметичных контейнерах с антикоагулянтом CPD и ресуспендирующим раствором SAGM. ЭВ получали в центрах переливания крови г. Москвы и хранили при 4 °С. Для экспериментов применяли ЭВ 2–5 суток хранения.

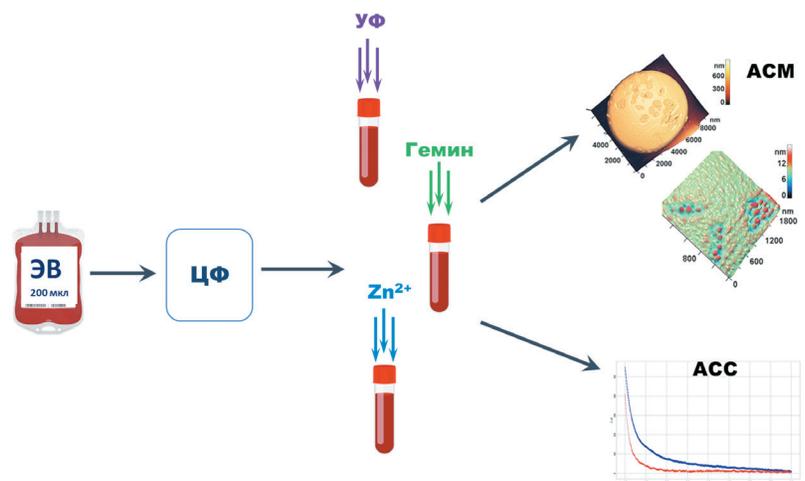


Рис. 1. Схема эксперимента; АСМ – атомно-силовая микроскопия, АСС – атомно-силовая спектроскопия, УФ – ультрафиолетовое излучение, ЦФ – центрифуга, ЭВ – эритроцитная взвесь

На мембраны эритроцитов воздействовали различными физико-химическими агентами: гемин (природный окислитель), ионами тяжелых металлов (Zn^{2+}) и УФ.

В первой серии экспериментов использовали сухой гемин (Sigma, США). Для приготовления рабочего раствора А растворяли 200 мг NaOH в 10 мл дистиллированной воды. Затем приготавливали раствор В. Для этого 50 мг сухого гемина растворяли в 1 мл раствора А и добавляли 5 мл дистиллированной воды. Раствор В вводили в объеме 50 мкл в пробирку с ЭВ. Время воздействия составило 15 минут.

Во второй серии экспериментов использовали Zn^{2+} . Для приготовления модификатора растворили 180 мг $ZnSO_4$ (Sigma, США) в 10 мл фосфатного буфера pH 7,4. Затем 10 мкл полученного раствора добавили в 100 мкл эритроцитов. Концентрация ионов Zn^{2+} составляла 4 мМ. Время воздействия – 15 минут.

В третьей серии экспериментов в качестве источника УФ использовался ультрафиолетовый бактерицидный облучатель (ОРУБп-3-3 фирмы «КРОНТ», Россия). Длина волны излучения $\lambda = 254$ нм, энергия фотона $E = 4,8$ эВ. Площадь облучаемой поверхности суспензии в кювете $S = 12,6$ см². Для обеспечения однородности облучения 150 мкл ЭВ разбавляли в 50 мл PBS pH 7,4. Облучали 20 мл суспензии в течение 30 минут.

Для получения монослоя клеток использовали устройство V-Sampler (Vision, Австрия).

Для исследования механических свойств мембран приготавливали суспензию эритроцитов.



Для этого 50 мкл эритроцитов добавляли в 10 мл PBS. Затем 200 мкл полученной суспензии наносили на покровные стекла, предварительно покрытые раствором полилизина (MP Biomedicals, Франция), и оставляли на 30 минут для осаждения клеток. Полученный образец промывали в PBS в течение 10 секунд, после чего измеряли силовые кривые.

Атомно-силовой микроскоп (АСМ) NTEGRA Prima (NT-MDT Spectrum Instruments, Россия) использовался для получения изображения клеток, их наноструктуры, а также для измерения жесткости мембран нативных эритроцитов. Изображения получали с помощью кантилеверов NSG01 с золотым отражающим покрытием, радиусом зонда 10 нм и коэффициентом жесткости 5 Н/м (TipsNano, Эстония). В полуконтактном режиме сканировали поля размером от 50×50 до 2×2 мкм². Для каждого изображения устанавливалось количество точек от 512 до 1024. Для измерения механических свойств мембран эритроцитов использовали кантилеверы SD-R150-T3L450B-10 (Nanosensors, Швейцария) с радиусом зонда 150 нм и коэффициентом жесткости 1 Н/м.

Поверхность мембраны эритроцитов представляет собой сложную неоднородную структуру. С помощью пространственного преобразования Фурье сложное изображение наноповерхности мембран эритроцитов, полученное на АСМ, раскладывалось на поверхности двух порядков. При этом спектральное окно с низкими пространственными частотами ($0,002$ – $0,001$ нм⁻¹) давало возможность получить изображения мембранных структур с большим пространственным периодом, а спектральное окно с высокими частотами ($0,02$ – $0,003$ нм⁻¹) – изображения мембранных структур с небольшим пространственным периодом. Параметры пространственных масштабов подбирались в соответствии с природными структурами мембран эритроцитов.

Разложение наноповерхности осуществляли в несколько этапов. На первом этапе с помощью АСМ было получено изображение наноповерхности мембран клеток размером от 2×2 мкм². Полученное изображение обозначали как Π_0 . На втором этапе производилось разложение исходной поверхности Π_0 на сумму поверхностей двух пространственных масштабов ($\Pi_1 + \Pi_2$). Каждая из полученных поверхностей соответствует физиологическим структурам мембран эритроцитов – зонам фликкеринга эритроцита (Π_1), цитоскелету (Π_2). Далее пространственные масштабы Π_1 и Π_2 были названы как порядок. Для получения поверхности первого порядка Π_1

выполняли сглаживание изображения исходной поверхности Π_0 в программе FemtoScan Online. Для мембран клеток использовали сглаживающий фильтр с маской 9 точек. Затем из изображения Π_0 вычитали Π_1 и получали изображение Π_2 , которое сглаживали фильтром с маской 3 точек. Таким образом получалось изображение второго порядка Π_2 .

Более подробное разложение исходной поверхности на сумму поверхностей трех пространственных периодов описано в работе [21]. На каждом полученном изображении поверхности первого и второго порядков были измерены типовые параметры топологических наноструктур: средняя высота h впадины до максимумов и пространственный период L между максимумами структуры.

Механические свойства мембран эритроцитов определяли по силовым кривым, полученным в результате прогиба мембраны внутрь клетки под действием приложенной силы. Модуль Юнга E (кПа) использовался для оценки жесткости мембран эритроцитов на основе модели Герца [22], описывающей упругую деформацию двух контактирующих тел [19, 23–25]:

$$F = \frac{4}{3}ER^{0.5}h^{1.5}, \quad (1)$$

где E – модуль Юнга материала, R – радиус зонда, h – глубина прогиба мембраны. При этом делается предположение, что эритроцит является однородным материалом при малых глубинах прогиба по сравнению с толщиной всей клетки, а зонд не деформируется, и нет никаких дополнительных взаимодействий между зондом и образцом (мембраной эритроцитов). Следовательно, если степень при h не равна 1,5, то взаимодействие происходит с неоднородным материалом. Именно поэтому экспериментальные силовые кривые $F(h)$ также аппроксимировали функцией вида:

$$F(h) = ah^b, \quad (2)$$

где a – некоторый коэффициент, h – глубина прогиба мембраны, b – показатель степени функции. Степень b определяли пошагово для различных глубин прогиба мембраны h_i с шагом $\Delta h = 5$ нм. Вычисление b производили от глубины h_{\max} до глубины h_i , на которой показатель степени функции (2) совпадает с показателем в формуле Герца, то есть $b = 1,50$. Эту глубину прогиба будем называть h_{Hz} .

Другими словами, глубина h_{Hz} – это наибольшая глубина погружения зонда в мембрану

эритроцита, где мембрану можно рассматривать как однородную линейную упругую среду. На глубине h_{Hz} экспериментальная кривая $F(h)$ подчиняется модели Герца.

Для каждого образца было приготовлено по 3 мазка с монослоями эритроцитов. На каждом мазке было просканировано по 5 АСМ-изображений размером 50×50 мкм². Для анализа наноструктуры мембран эритроцитов сканировался участок размером 2×2 мкм² на 30 клетках для каждого образца. Всего было проанализировано 360 участков мембран.

В режиме атомно-силовой спектроскопии действовали на клетки с заданной силой F и получали силовые кривые. На каждом образце измеряли по 100 нативных клеток. Для каждой эмпирической кривой $I(Z)$ делали переход к зависимости $F(h)$ для расчета модуля Юнга мембран эритроцитов [19, 26]. Всего в исследовании было проанализировано 400 нативных клеток.

Этическая экспертиза. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФНКЦ РР (протокол № 2/20 от 10.06.2020).

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью программы OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, США). Статистические данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($M \pm \sigma$). Непрерывные переменные предварительно анализировали на нормальность распределения при помощи теста Шапиро – Уилка. Для проверки значимости различия между средними в разных группах использовали программу ANOVA и критерий Краскела – Уоллиса с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для каждой измеренной в эксперименте силовой кривой были определены модуль Юнга E и глубина h_{Hz} .

В контрольном образце наблюдались двояковогнутые дискоциты. Размер клеток был $8,5 \pm 0,7$ мкм. Пространственный период L наноповерхности мембраны, показанный на рис. 2Б, составлял $74,8 \pm 12,1$ нм, а высота ее шероховатости h не превышала 2 ± 1 нм.

При этом по 100 измеренным силовым кривым жесткость мембран контрольных эритроцитов составила 10 ± 4 кПа, а глубина однородной деформации h_{Hz} – 815 ± 210 нм (рис. 3).

После воздействия на мембраны эритроцитов геминном, ионами Zn^{2+} , УФ-излучением наблюдали изменения собственных параметров мембран.

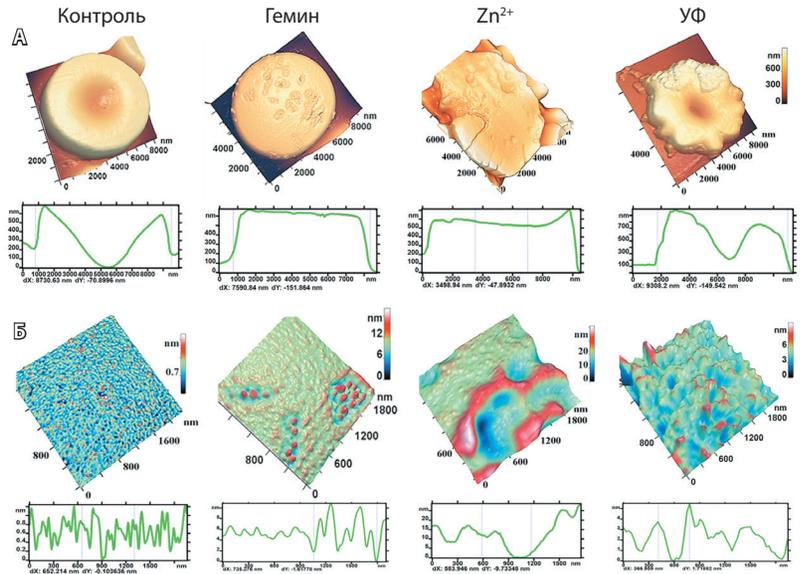


Рис. 2. Эритроциты после воздействия гемина, Zn^{2+} и ультрафиолетового излучения (УФ): **А** – атомно-силовая микроскопия (АСМ): 3D-изображения типовых форм клеток (сверху) и их профиль (снизу); **Б** – АСМ-изображение второго порядка P_2 и соответствующие профили. Приведены цветовые шкалы, соответствующие разным высотам

Выбранные агенты имели различную физико-химическую природу и разные механизмы действия. На рис. 2 показаны характерные формы клеток, параметры наноструктуры и их профили соответственно.

Гемин – окислитель биологических структур, в частности, изменяющий морфологию эритроцитов. Гемин влияет на конформацию спектрина, белковой полосы 4.1 и ослабляет связи между ними [27, 28]. В результате воздействия гемина дискоциты превращались в планоциты с дефектами на мембране. На рис. 2А показана типовая клетка после действия гемина и ее профиль. Гемин приводил к формированию зерен на поверхности мембраны. Типичный размер зерна был 160 ± 40 нм. Высота каждого зерна составляла 12 ± 5 нм. Топологические зерна были организованы на клеточной мембране в виде отдельных доменов. Размеры доменов варьировались от 300 до 1500 нм.

Воздействие гемина вызывало рост модуля Юнга E по сравнению с контролем до $27,2 \pm 8,6$ кПа ($p < 0,001$), а глубина прогиба мембраны уменьшилась до $h_{Hz} = 420 \pm 80$ нм ($p < 0,001$) (см. рис. 3).

Ионы Zn^{2+} вызывают изменение вторичных белковых структур и приводят к их агрегации [29, 30]. АСМ-изображение характерной клетки и ее профиль после действия Zn^{2+} представлены на рис. 2А. Характерные высоты $h = 17 \pm 5$ нм и пространственные периоды $L = 240 \pm 60$ нм

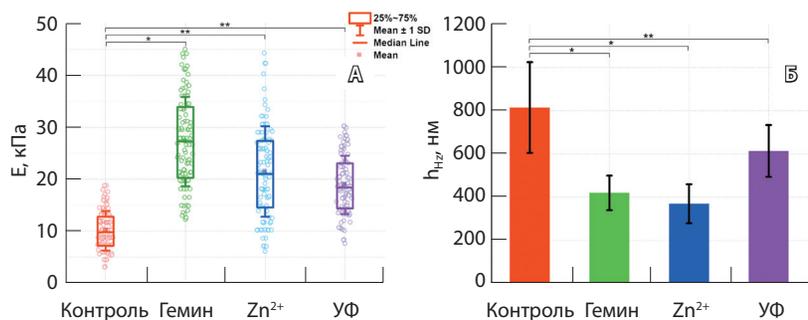


Рис. 3. Изменение модуля Юнга E (А) и глубины h_{Hz} (Б) эритроцитов после воздействия гемина, Zn^{2+} и ультрафиолетовым излучением (УФ): А – данные в прямоугольниках представлены от 25- до 75-го перцентилей со стандартным отклонением, горизонтальная линия показывает медианное значение, экспериментальные данные показаны точками; Б – экспериментальные данные изменения глубины h_{Hz} ; по оси абсцисс – экспериментальные образцы, по оси ординат – глубины h_{Hz} (нм); * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольным образцом

наноструктуры указывали на то, что воздействие ионов цинка не только вызывает изменение формы клеток, но и повреждает мембранную структуру (см. рис. 2Б). Воздействие цинка увеличивало фликкеринг мембраны, нарушало структуру цитоскелета и вызывало агрегацию белков. При этом на АСМ-изображениях наблюдались дефекты в виде провалов и пор глубиной до 40–60 нм и диаметром 500–700 нм.

Величина модуля Юнга при действии цинка составила $21,4 \pm 8,7$ кПа ($p = 0,002$). Кроме того, воздействие ионов Zn^{2+} вызвало уменьшение глубины прогиба h_{Hz} до 370 ± 90 нм ($p < 0,001$) (см. рис. 3Б).

Воздействие УФ-излучения приводит к активации активных форм кислорода в крови и тем самым к развитию окислительных процессов [31, 32]. В результате воздействия УФ на кровь возникал полиморфизм клеток, появлялись дефекты на мембране эритроцитов (см. рис. 2А). Дискциты трансформировались в стоматоциты, эхиноциты, сфероэхиноциты, сфероциты, тени. На рис. 2 показан типичный эхиноцит размером 9,3 мкм, высота которого 900 нм. А жесткость мембран эритроцитов увеличивалась в 1,8 раза до $18,8 \pm 5,6$ кПа ($p = 0,001$), при этом глубина h_{Hz} составила 614 ± 120 нм ($p = 0,001$).

Обсуждение

Механические свойства мембран эритроцитов, наряду с морфологией клеток и наноструктурой их мембран, в большой степени определяют реологические свойства крови в целом. В частности, от деформируемости эритроцитов зависит их способность проникать в русло капилляров и осуществлять газообмен [2].

В настоящем исследовании мы оценивали жесткость мембран эритроцитов, способность мембраны прогибаться внутрь клетки, а также изменение морфологии и наноструктуры после воздействия различных физико-химических факторов. Эндогенные и экзогенные факторы могут влиять на форму эритроцитов и превращать их из дискоцитов в другие формы клеток за счет изменения белковых структур мембраны [3, 5, 15, 30]. Мембрана эритроцитов более чем на 50% состоит из белков, играющих ключевую роль во многих процессах жизнедеятельности клетки. К основным компонентам белкового цитоскелета эритроцитов относятся спектрин, белковые комплексы актина, белок 4.1R, анкирин, а также связанные с ними тропомиозин, тропомодулин, аддуцин и дематин. Нарушение связей между этими компонентами может вызвать образование дефектов, провалов на мембране или агрегацию ее белковых структур, которые в конечном счете приведут к изменению формы клетки.

Другими авторами было показано, что форма клеток и их деформационная способность изменяются. Так, у больных сахарным диабетом отмечалось снижение деформационной способности эритроцитов, а форма клеток становилась более вытянутой и сильно отличалась от контрольной группы [5, 33]. В работе [34] установлено, что у пациентов, находящихся в критических состояниях, происходили патологические изменения морфологии и наноструктуры эритроцитов, при этом механические свойства не оценивались. При исследовании влияния рентгеновского излучения на эритроциты оказалось, что жесткость клеток увеличивается в несколько раз [15, 16]. Согласно результатам ряда исследований, изучавших длительное хранение эритроцитной взвеси, было установлено, что по мере хранения эритроциты трансформировались преимущественно в эхиноциты и сфероэхиноциты и одновременно наблюдалось увеличение жесткости мембран эритроцитов [6, 7].

При анализе механических свойств мембран эритроцитов необходимо иметь в виду, что мембрана представляет собой сложную структуру. Следовательно, при погружении зонда в клетку слои мембраны будут обладать разными механическими свойствами, и только на определенной глубине (на глубине h_{Hz}) мембрана будет деформироваться однородно и описываться моделью Герца. Именно поэтому в нашей работе была проведена оценка глубины h_{Hz} для каждого образца. Данный параметр имеет важное значение для реологии крови. При прохождении через капилляр диаметром около 5 мкм эритроциту необходимо изогнуться



с каждой стороны примерно на 600–1000 нм. В этой связи важно было не только понять, как воздействие различных физико-химических агентов влияет на мембрану, но и узнать, какое действие они оказывают на деформационную способность клеток. В результате было установлено, что мембраны контрольных эритроцитов ведут себя как однородные упругие структуры вплоть до 1000 нм, что соизмеримо с деформациями в капиллярном русле, а воздействие УФ-излучения и мембранных модификаторов приводило к уменьшению глубины однородной деформации.

Отметим, что в опубликованных к настоящему времени работах показано влияние различных патогенных факторов на форму клеток и структуру их мембраны, есть отдельные исследования упруго-эластичных свойств мембран эритроцитов, однако комплексного исследования проведено не было. Кроме того, в имеющихся работах модуль Юнга оценивают на глубинах до 200 нм. Преимуществом нашей работы является тот факт, что мы проводим оценку жесткости мембраны на глубине, которая соизмерима с деформацией в капилляре.

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 0427-2021-0003.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Е.А. Шерстюкова – концепция и дизайн исследования, участие в эксперименте, анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; В.А. Иноземцев – выполнение экспериментального исследования, измерение и обработка силовых кривых,

Заключение

С помощью атомно-силовой микроскопии мы показали, что воздействие гемина, ионов Zn^{2+} и УФ-излучения приводило к изменению формы клеток и наноструктуры их мембран с образованием топологических локальных дефектов. Методом атомно-силовой спектроскопии было установлено увеличение жесткости мембран эритроцитов для всех опытных образцов, при этом глубина однородной деформации становилась меньше. Таким образом, действие различных физико-химических агентов на эритроциты может не только вызвать изменения формы клеток и их мембран, но и существенно изменить их механические свойства. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов взаимодействия поверхностей мембран нативных эритроцитов со стенками мелких сосудов и могут быть полезны в клинической медицине как дополнительные характеристики при оценке качества эритроцитов, а также послужить основой для биофизических исследований механизма действия окислительных процессов различного происхождения. ☺

расчет глубины $h_{из}$, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; А.П. Козлов – выполнение экспериментального исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; О.Е. Гудкова – выполнение экспериментального исследования, редактирование рукописи; В.А. Сергунова – выполнение экспериментального исследования, получение изображений с помощью атомно-силового микроскопа и их обработка, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2014;8(5):051501. doi: 10.1063/1.4895755.
2. Александрова НП, Карандашов ВИ, Кудлай ДА. Особенности механизма нарушения деформируемости эритроцитов при различных заболеваниях. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2021;(1):74–80. doi: 10.25555/THR.2021.1.0965. [Alexandrova NP, Karandashov VI, Kudlay DA. [Specificities in mechanism of erythrocyte deformability disorders in various diseases]. *Thrombosis, Hemostasis and Rheology*. 2021;(1):74–80. Russian. doi: 10.25555/THR.2021.1.0965.]
3. Gutierrez M, Shamoun M, Seu KG, Tanski T, Kalfa TA, Eniola-Adefeso O. Characterizing bulk rigidity of rigid red blood cell populations in sickle-cell disease patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):7909. doi: 10.1038/s41598-021-86582-8.
4. Shin S, Ku Y. Hemorheology and clinical application: Association of impairment of red blood cell deformability with diabetic nephropathy. *Korea Aust Rheol J*. 2005;17(3):117–123.
5. Buys AV, Van Rooy MJ, Soma P, Van Papendorp D, Lipinski B, Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:25. doi: 10.1186/1475-2840-12-25.
6. Xu Z, Zheng Y, Wang X, Shehata N, Wang C, Sun Y. Stiffness increase of red blood cells during storage. *Microsystems Nanoeng*. 2018;4:17103. doi: 10.1038/micronano.2017.103.
7. Манченко ЕА, Козлова ЕК, Сергунова ВА, Черныш АМ. Однородная деформация нативных эритроцитов при их длительном хранении. *Общая реаниматология*. 2019;15(5):4–10. doi: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10. [Manchenko EA, Kozlova EK, Sergunova VA, Chernysh AM. [Homogeneous Deformation of Native Erythrocytes During Long-Term Storage]. *General Reanimatology*. 2019;15(5):4–10. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10.]



8. Li M, Liu L, Xi N, Wang Y, Dong Z, Xiao X, Zhang W. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci China Life Sci.* 2012;55(11):968–973. doi: 10.1007/s11427-012-4399-3.
9. Dulińska I, Targosz M, Strojny W, Lekka M, Czubka P, Balwierz W, Szymoński M. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J Biochem Biophys Methods.* 2006;66(1–3):1–11. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.11.003.
10. Sisqueña X, Nebl T, Thompson JK, Whitehead L, Malpede BM, Salinas ND, Rogers K, Tolia NH, Fleig A, O'Neill J, Tham WH, Horgen FD, Cowman AF. Plasmodium falciparum ligand binding to erythrocytes induce alterations in deformability essential for invasion. *Elife.* 2017;6:e21083. doi: 10.7554/eLife.21083.
11. Vayá A, Rivera L, de la Espriella R, Sanchez F, Suescun M, Hernandez JL, Fácila L. Red blood cell distribution width and erythrocyte deformability in patients with acute myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015;59(2):107–114. doi: 10.3233/CH-131751.
12. Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sick cell biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12:345–367. doi: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105339.
13. Fornal M, Lekka M, Pyka-Fościk G, Lebed K, Grodzicki T, Wizner B, Styczeń J. Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(1–2):273–276.
14. Papi M, Ciasca G, Palmieri V, Maulucci G, Rossi C, Minelli E, De Spirito M. Nano-Mechanical Response of Red Blood Cells. Chapter 2. In: Korach CS, Tekalur SA, Zavattieri P, editors. *Mechanics of Biological Systems and Materials.* Vol. 6. Springer International Publishing; 2017. p. 11–16.
15. Zhang B, Liu B, Zhang H, Wang J. Erythrocyte stiffness during morphological remodeling induced by carbon ion radiation. *PLoS One.* 2014;9(11):e112624. doi: 10.1371/journal.pone.0112624.
16. Челнокова ИА, Шклярлова АН, Цуканова ЕВ, Никитина ИА, Стародубцева МН. Влияние рентгеновского излучения на наномеханические свойства поверхности эритроцитов крыс при гиперхолестериновой диете. *Проблемы здоровья и экологии.* 2021;(3):105–115. doi: 10.51523/2708-6011.2021-18-3-13. [Chelnokova IA, Shklyarova NM, Tsukanova AU, Nikitina IA, Starodubtseva MN. [Effect of X-ray radiation on the nanomechanical properties of the erythrocyte surface of rats on a high-cholesterol diet]. *Health and Ecology Issues.* 2021;(3):105–115. Russian. doi: 10.51523/2708-6011.2021-18-3-13.]
17. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 1993;30(3):171–192.
18. Lekka M, Fornal M, Pyka-Fościk G, Lebed K, Wizner B, Grodzicki T, Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. *Biorheology.* 2005;42(4):307–317.
19. Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron.* 2007;38(8):824–833. doi: 10.1016/j.micron.2007.06.011.
20. Сергунова ВА, Козлова ЕК, Мягкова ЕА, Черныш АМ. Измерение упруго-эластичных свойств мембраны нативных эритроцитов in vitro. *Общая реаниматология.* 2015;11(3):39–44. doi: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44. [Sergunova VA, Kozlova EK, Myagkova EA, Chernysh AM. [In Vitro Measurement of the Elastic Properties of the Native Red Blood Cell Membrane]. *General Reanimatology.* 2015;11(3):39–44. doi: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44.]
21. Kozlova EK, Chernysh AM, Moroz VV, Kuzovlev AN. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron.* 2013;44:218–227. doi: 10.1016/j.micron.2012.06.012.
22. Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik.* 1882;1882(92):156–171. German. doi: 10.1515/crll.1882.92.156.
23. Thomas B, Burnham NA, Camesano TA, Wen Q. Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *J Vis Exp.* 2013;(76):50497. doi: 10.3791/50497.
24. Codan B, Martinelli V, Mestroni L, Sbaizero O. Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: an investigation of cell elasticity changes due to fixation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(6):3303–3308. doi: 10.1016/j.msec.2013.04.009.
25. Li M, Liu L, Xu X, Xing X, Dang D, Xi N, Wang Y. Nanoscale characterization of dynamic cellular viscoelasticity by atomic force microscopy with varying measurement parameters. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;82:193–201. doi: 10.1016/j.jmbm.2018.03.036.
26. Kozlova E, Chernysh A, Manchenko E, Sergunova V, Moroz V. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning.* 2018;2018:1810585. doi: 10.1155/2018/1810585.
27. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Gudkova O, Sergunova V, Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci Rep.* 2014;4:6033. doi: 10.1038/srep06033.
28. Космачевская ОВ, Насыбуллина ЭИ, Блиндарь ВН, Топунов АФ. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019;55(2):107–123. doi: 10.1134/S0555109919020090. [Kosmachevskaya OV, Nasybullina EI, Topunov AF, Blindar VN. [Binding of erythrocyte hemoglobin to the membrane to realize signal-regulatory function (review) *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology]. 2019;55(2):107–123. Russian. doi: 10.1134/S0555109919020090.]
29. Turrini F, Mannu F, Arese P, Yuan J, Low PS. Characterization of the autologous antibodies that opsonize erythrocytes with clustered integral membrane proteins. *Blood.* 1993;81(11):3146–3152. doi: 10.1182/blood.V81.11.3146.3146.
30. Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV, Sergunova VA, Gudkova OYe, Fedorova MS. Reversible zinc-induced injuries to erythrocyte membrane nanostructure. *Bull Exp Biol Med.* 2012;154(1):84–88. doi: 10.1007/s10517-012-1881-7.
31. Misra RB, Ray RS, Hans RK. Effect of UVB radiation on human erythrocytes in vitro. *Toxicol Vitro.* 2005;19(3):433–438. doi: 10.1016/j.tiv.2004.12.004.
32. Kozlova E, Chernysh A, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E, Kozlov A. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *J Mol Recognit.* 2018;31(10):e2724. doi: 10.1002/jmr.2724.
33. Шаповалова ОО, Шамрова ЕА, Федосеев ЕН. Исследование деформируемости мембран эритроцитов у больных сахарным диабетом. *Территория инноваций.* 2019;1(29):80–86. [Shapovalova OO, Shamrova EA, Fedoseev EN. [Erythrocyte membrane deformability study in diabetics]. *Territoriya innovatsiy* [Territory of Innovations]. 2019;1(29):80–86. Russian.]
34. Гречко АВ, Молчанов ИВ, Сергунова ВА, Козлова ЕК, Черныш АМ. Дефекты мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга (пилотное исследование). *Общая реаниматология.* 2019;15(6):11–20. doi: 10.15360/1813-9779-2019-6-11-20. [Grechko AV, Molchanov IV, Sergunova VA, Kozlova EK, Chernysh AM. [Defects of Red Blood Cell Membranes in Patients with Brain Dysfunction (Pilot Study)]. *General Reanimatology.* 2019;15(6):11–20. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2019-6-11-20.]



Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents

E.A. Sherstyukova^{1,2} • V.A. Inozemtsev¹ • A.P. Kozlov² •
O.E. Gudkova¹ • V.A. Sergunova¹

Background: Mechanical properties of cell membranes and their structural organization are considered among the most important biological parameters affecting the functional state of the cell. Under the influence of various pathogenic factors, erythrocyte membranes lose their elasticity. The resulting changes in their biomechanical characteristics is an important, but poorly studied topic. It is of interest to study the deformation of native erythrocytes to a depth compatible with their deformation in the bloodstream.

Aim: To investigate the patterns of deep deformation and the particulars of structural organization of native erythrocyte membranes before and after their exposure to physicochemical agents *in vitro*.

Materials and methods: Cell morphology, nanostructure characteristics, and membrane deformation of native erythrocytes in a solution of hemoconservative CPD/SAGM were studied with atomic force microscope NTEGRA Prima. Hemin, zinc ions (Zn^{2+}), and ultraviolet (UV) radiation were used as modifiers. To characterize the membrane stiffness, we measured the force curves $F(h)$, h_{Hz} (the depth to which the probe immersion is described by interaction with a homogeneous medium), and the Young's modulus values of the erythrocyte membrane.

Results: Exposure to hemin, Zn^{2+} and UV radiation led to transformation of the cell shape, appearance of topological defects and changes in mechanical characteristics of erythrocyte membranes. Under exposure to hemin, Young's modulus increased

from 10 ± 4 kPa to 27.2 ± 8.6 kPa ($p < 0.001$), exposure to Zn^{2+} , to 21.4 ± 8.7 kPa ($p = 0.002$), and UV, to 18.8 ± 5.6 kPa ($p = 0.001$). The h_{Hz} value was 815 ± 210 nm for the control image and decreased under exposure to hemin to 420 ± 80 nm ($p < 0.001$), Zn^{2+} , to 370 ± 90 nm ($p < 0.001$), and UV, to 614 ± 120 nm ($p = 0.001$).

Conclusion: The results obtained contribute to a deeper understanding of interaction between membrane surfaces of native erythrocytes and small vessel walls. They can be useful in clinical medicine as additional characteristics for assessment of the quality of packed red blood cells, as well as serve as a basis for biophysical studies into the mechanisms of action of oxidative processes of various origins.

Key words: atomic force microscopy, membrane deformability, erythrocytes, hemin, zinc ions, ultraviolet radiation, membrane defects

For citation: Sherstyukova EA, Inozemtsev VA, Kozlov AP, Gudkova OE, Sergunova VA. Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents. Almanac of Clinical Medicine. 2021;49(6):427–434. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-059.

Received 12 November 2021; revised 25 November 2021; accepted 29 November 2021; published online 6 December 2021

Ekaterina A. Sherstyukova – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; Assistant Professor, Chair of Medical and Biological Physics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9962-6315>

✉ 25–2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation. Tel.: +7 (985) 965 78 17. E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Vladimir A. Inozemtsev – Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4693-5624>. E-mail: va.inozemtcev@physics.msu.ru

Aleksandr P. Kozlov – PhD (in Phys. and Math.), Associate Professor, Chair of Medical and Biological Physics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Olga E. Gudkova – Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

Viktoriya A. Sergunova – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Head of Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8425-0845>. E-mail: vika_23s82@mail.ru

Funding

The study was performed as a part of the State task from the Ministry of Health of the Russian Federation # 0427-2021-0003.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests related to the study.

Authors' contributions

E.A. Sherstyukova, the study concept and design, participation in the experiment, data analysis, text writing, editing of the manuscript; V.A. Inozemtsev, the experimental part of the study, measurement and processing of the force curve, calculation of h_{Hz} depth, analysis and interpretation of the study results, editing of the manuscript; A.P. Kozlov, the experimental part of the study, analysis and interpretation of the study results, editing of the manuscript; O.E. Gudkova, the experimental part of the study, editing of the manuscript; V.A. Sergunova, the experimental part of the study, image acquisition with the atomic force microscope and their processing, statistical analysis, text writing, editing of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

¹V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology; 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation