

© С. Н. Плескова, Р. Н. Крюков, С. Ю. Зубков, 2018
УДК 578.6:611.018.51

С. Н. Плескова, Р. Н. Крюков, С. Ю. Зубков

ИЗМЕНЕНИЯ СТРОЕНИЯ И ФРАКТАЛЬНОЙ РАЗМЕРНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА (ИССЛЕДОВАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ)

Научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур» (дир. — канд. физ.-мат. наук О. Н. Горшков), ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» Минобрнауки РФ

Цель — изучить морфометрические характеристики эритроцитов и выявить их изменения после воздействия наночастиц магнетита.

Материал и методы. Исследованы эритроциты крови 23 здоровых доноров обоего пола в возрасте от 20 до 40 лет с применением атомно-силовой микроскопии до и после инкубации с наночастицами магнетита в течение 60 мин. Измеряли диаметр, высоту, фрактальную размерность эритроцитов.

Результаты. Введение наночастиц магнетита вызывает изменение строения эритроцитов. Основные трансформированные формы — сфероциты, эхиноциты, кодоциты, стоматоциты. Небольшое количество трудно дифференцируемых форм имеют перфорации мембраны.

Выводы. Наночастицы магнетита в сублетальной концентрации вызывают увеличение числа необратимо измененных форм эритроцитов. Наиболее чувствительным морфометрическим критерием, позволяющим дифференцировать нормоциты от трансформированных форм, является фрактальная размерность эритроцитов.

Ключевые слова: эритроцит, атомно-силовая микроскопия, морфометрия, фрактальная размерность, наночастицы магнетита

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет получать изображения живых объектов с высоким разрешением и обладает целым рядом преимуществ: возможностью исследовать клетки в нативной среде в режиме реального времени, определять вязко-упругие свойства мембранно-цитоскелетных комплексов, адгезивные характеристики молекул, в перспективе — определять локальный потенциал клеточных мембран [5]. Одним из существенных преимуществ АСМ является получение высокоточных морфометрических характеристик молекул, надмолекулярных комплексов и клеток. Измерения диаметра и высоты позволяют ориентироваться не только на субъективную информацию об изменении строения клеток, но и предоставляют точную количественную оценку этих изменений. В процессе выполнения основных физиологических функций эритроциты деформируются [4]. Однако, наряду с физиологической деформацией клеток при ряде заболеваний и при воздействии неблагоприятных факторов, эритроциты трансформируются в патологические формы, которые в норме не встречаются.

Цель настоящей работы — определить различия высоты, диаметра и фрактальной размерности трансформированных эритроцитов по данным, полученным методом АСМ; выявить основные изменения строения эритроцитов после воздействия наночастиц магнетита (НЧМ).

Материал и методы. Исследовали 23 образца венозной крови здоровых доноров обоих полов в возрасте от 20 до 40 лет, полученных в Нижегородском областном центре крови им. Н. Я. Климовой. На проведение исследования получено разрешение комиссии по биоэтике Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского (№ 9 от 17.07.2017 г.). После однократного центрифугирования гепаринизированной крови (50 ЕД/мл) при 200 G в течение 3 мин и декантаривания плазмы и лейкоцитарно-тромбоцитарного слоя эритроциты пятикратно отмывали забуференным изотоническим раствором хлорида натрия (ЗИРХН). Отбирали 20 мкл эритроцитов, разводили в 50 раз, начальная концентрация клеток составляла 1×10^6 кл/мл. Эритроциты инкубировали с НЧМ в соотношении 1:1 (опыт) или с эквивалентным количеством ЗИРХН (контроль) в течение 60 мин при температуре 37 °C [6].

Наночастицы магнетита ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$), предоставленные кафедрой физики полупроводников Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского (руков.

Сведения об авторах:

Плескова Светлана Николаевна (e-mail: pleskova@mail.ru), Крюков Руслан Николаевич (e-mail: kriukov.ruslan@yandex.ru), Зубков Сергей Юрьевич (e-mail: zubkov@phys.unn.ru), Научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур», ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» Минобрнауки РФ, 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, к. 3

исследовательской группы — проф. Д. А. Горин), получали методом химической преципитации из раствора солей двух- и трехвалентного железа [1]. На двугловом анализаторе размеров частиц и молекул ZetasizerNano («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания) измеряли гидродинамический диаметр и электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) НЧМ. Показатели составили 20 ± 4 нм и $-13,09$ мВ соответственно. НЧМ перед экспериментами взбалтывали в перемешивающем устройстве Vortex (ELMI Ltd., Латвия) в течение 10 мин, диспергировали в ультразвуковой ванне (РЭЛТЭК, Москва) продолжительностью 15 мин, добиваясь однородности, после чего использовали для инкубации с эритроцитами в конечной концентрации $0,0018$ мг/мл.

Эритроциты переносили на поверхность предметных стекол и фиксировали глутаровым альдегидом (2,5%; 20 мин; 24 °C), трижды отмывали и сканировали в полуконтактном режиме на воздухе с помощью АСМ Ntegra Spectra (NT-MDT, Россия). Для обработки результатов сканирования использовали программный пакет Gwyddion (Чешский метрологический институт, Чехия). Использовали зонды DNP (Bruker, США) с радиусом закругления кончика 20 нм, углом при вершине 15°, резонансной частотой около 65 кГц, константой жёсткости 0,35 Н/м. Измерения диаметра и высоты проводили по боковому сечению профиля клетки (рис. 1). Фрактальную размерность клеток рассчитывали на основе данных сканирования с помощью метода подсчета кубов [8].

Графическим методом определяли CL_{50} (50% летальную концентрацию) для НЧМ. Она составила $1,712$ мг/мл. Поскольку в биологических исследованиях и медицинской практике используются гораздо более низкие концентрации [2, 7], для эксперимента брали $0,0018$ мг/мл НМЧ, т. е. сублетальную концентрацию, вызывающую трансформацию эритроцитов, а не их гемолиз.

Значимость различий между двумя выборками полученных количественных данных определяли методом непараметрической статистики с использованием двухвыборочного критерия Вилкоксона. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для статистического анализа использовали программу Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, США).

Результаты исследования. На рис. 1 представлен нормальный по форме эритроцит (нормоцит). Результаты измерений основных морфометрических характеристик эритроцитов представлены в таблице. Поскольку у большинства трансформированных форм зона пеллора (центрального просвета) не оформлена, для измерения высоты всех эритроцитов, в том числе нормоцитов, брали самую высокую точку клетки (у нормоцита она находится в области тора).

Воздействие НЧМ на эритроциты вызывало их трансформацию. Наиболее часто встречались такие измененные формы, как сфероциты, затем эхиноциты, кодоциты и наименее часто — стоматоциты (рис. 2).

Сфероциты имели округлую, предгемолитическую форму, на микроструктуре их мембраны отчетливо визуализировались повреждения (см. рис. 2, а). Эхиноциты представляли собой сферические клетки, на поверхности которых распола-

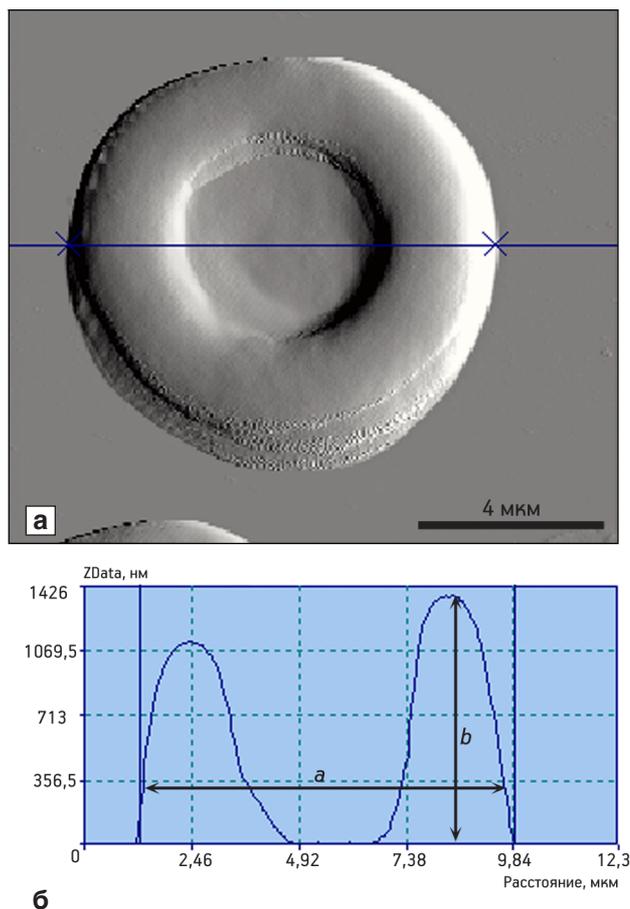


Рис. 1. Типичный эритроцит здорового донора и боковое сечение профиля эритроцита с измерением диаметра клетки (а), высоты клетки (б).

Атомно-силовая микроскопия. Ув. 5000

гались 30–50 сопоставимых по размеру спикул (см. рис. 2, б). Кодоциты — это мишеневидные клетки с куполообразным выбуханием в центре, часть поверхности которых в зоне тора могла быть повреждена (см. рис. 2, в). Стоматоциты — округлые клетки с щелевидной формой пеллора (см. рис. 2, г). Наряду с ними, крайне редко встречались дакриоциты, акантоциты и трудно дифференцируемые формы эритроцитов, в том числе эритроциты, имеющие перфорации на уровне мембраны [4] и кексообразные эритроциты (ранее не описаны). Эритроциты, имеющие перфорации на мембране, не были гемолизированы. Однако они имели форму, отличную от торообразной или сферической, но близкую к многограннику с тупыми углами, а глубина перфораций варьировала от 25 до 304 нм (см. рис. 2, д). Кексообразные эритроциты характеризовались выбуханием на вершине, характерным и для кодоцитов, однако, в отличие от последних, это выбухание имело многослойный характер, а пеллорическая зона абсолютно отсутствовала (см. рис. 2, е). Общее количество редко встречаю-

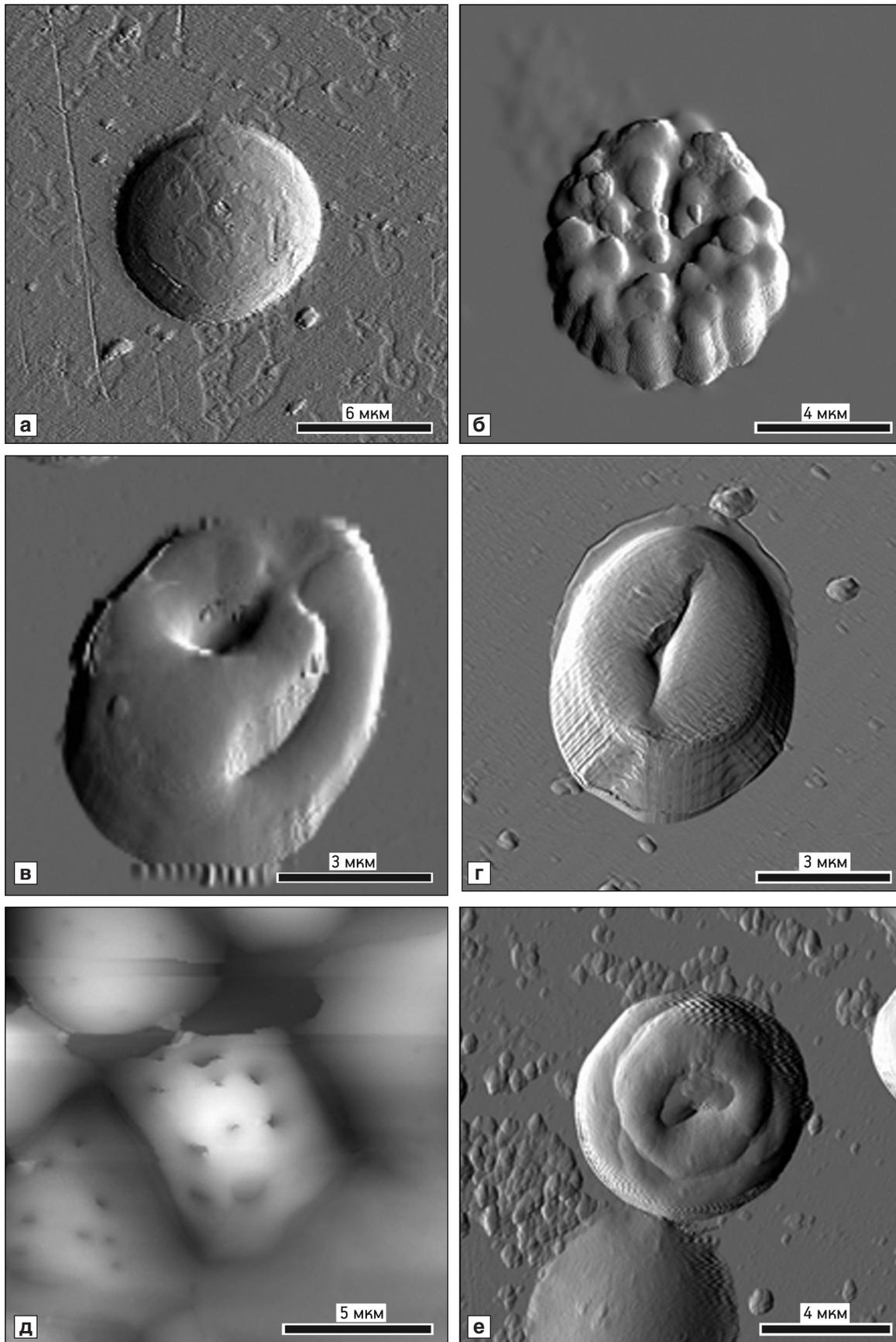


Рис. 2. Формы эритроцитов, трансформированных после воздействия наночастиц магнетита.

а — сфероцит; б — эхиноцит; в — кодоцит; г — стоматоцит; д — эритроциты, имеющие трудно дифференцируемую форму и перфорации в клеточной мембране; е — кексовидные эритроциты. Атомно-силовая микроскопия. Ув. 5000

щихся форм было менее 2 %, поэтому статистический анализ их морфометрических характеристик был невозможен.

По высоте от нормоцитов значимо отличаются эхиноциты и стоматоциты (см. таблицу). Между трансформированными формами значимые различия по высоте клетки отмечались между сфероцитами и эхиноцитами, сфероцитами и стоматоцитами, эхиноцитами и кодоцитами, кодоцитами и стоматоцитами. По диаметру значимо от нормоцитов отличались только эхиноциты. Между трансформированными формами значимые отличия по диаметру клетки отмечались между сфероцитами и стоматоцитами, эхиноцитами и стоматоцитами.

По фрактальной размерности все трансформированные формы значимо отличались от нормоцитов (см. табл.). Между трансформированными формами значимые отличия во фрактальной размерности отмечались между сфероцитами и эхиноцитами, сфероцитами и кодоцитами, сфероцитами и стоматоцитами, эхиноцитами и стоматоцитами.

Обсуждение полученных данных. Согласно литературным данным [3], к обратимым формам эритроцитов относят эхиноциты и стоматоциты, к необратимым — кодоциты и сфероциты. Эритрограмма в контроле (без воздействия) выглядит следующим образом: 88,9 % — нормоцитов; обратимых форм 5,3 % (из них 4,3 % — эхиноцитов и 1 % — стоматоцитов); необратимых форм — 5,8 % (из них 2,4 % — сфероцитов, 3,4 % — кодоцитов). При воздействии НЧМ наблюдается смещение эритрограммы в сторону необратимых форм: 51,4 % — нормоцитов, общее количество обратимо трансформированных форм составляло 12 % (из них 10 % — эхиноцитов, 2 % — стоматоцитов), необратимых форм — 36,6 % (из них 30,6 % — сфероциты, 6 % — кодоциты).

Альтерация эритроцитов под влиянием НЧМ проявляется в изменении формы эритроцитов, их морфометрических параметров и смещении эритрограммы в сторону необратимых форм (сфероцитов и кодоцитов). Однако морфометрический анализ трансформированных форм эритроцитов с последующей статистической обработкой, как правило, не позволяет выявить параметры, достаточно чувствительные для диагностического дифференцирования нормоцитов от трансформированных форм эритроцитов. Это связано, прежде всего, с крайне высокой вариабельностью всех параметров у трансформированных эритроцитов. АСМ является высокоразрешающим и высокоточным методом измерения, поэтому позволяет коли-

Основные морфометрические характеристики нормоцитов и трансформированных форм эритроцитов (n=10)

Форма эритроцита	Высота, нм	Диаметр, мкм	Фрактальная размерность
Нормоцит	1635±419 (V=0,256)	7,40±0,18 (V=0,024)	2,301±0,019 (V=0,009)
Сфероцит	1630±109 (V=0,067)	7,79±0,54 (V=0,068)	2,165±0,012* (V=0,006)
Эхиноцит	2175±389* (V=0,179)	7,67±0,25* (V=0,032)	2,202±0,022* (V=0,009)
Кодоцит	1571±450 (V=0,287)	7,27±1,02 (V=0,14)	2,221±0,045* (V=0,021)
Стоматоцит	2375±683* (V=0,287)	6,98±0,76 (V=0,109)	2,226±0,017* (V=0,008)

* Различия с нормоцитом статистически значимы (p<0,05).

Примечание. n — количество замеров каждого параметра; V — коэффициент вариации выборки.

чественно выявить эти колебания. Полученные данные дают представление о том, что групповые различия нормоцитов с трансформированными формами наблюдаются не только в случае значительных различий средних значений выборок, но и в случае малых значений их коэффициентов вариации. Исключение составляет показатель фрактальной размерности, являющийся наиболее чувствительным критерием, позволяющим не только дифференцировать нормоциты от трансформированных форм, но и различить трансформированные формы между собой. Это обусловлено тем, что фрактальная размерность является мерой заполнения пространства исследуемой структурой. Поэтому любые изменения строения эритроцитов приводят к отклонению от «идеальной» торообразной формы эритроцитов и, как следствие, к уменьшению этого параметра. Фрактальная размерность является математической характеристикой формы клетки, составляющая максимальную величину у нормоцита. Для всех трансформированных форм эритроцитов фрактальная размерность статистически значимо уменьшается. Минимальное значение фрактальной размерности выявлено для предгемолитической формы — сфероцита. Это говорит о том, что все трансформированные формы эритроцитов имеют меньшую эффективную площадь поверхности, что снижает их функциональные возможности, например, нарушаются газообменная функция и функция транспорта веществ.

Таким образом, даже низкая концентрация НЧМ (в 10^3 меньшая CL_{50}) способна вызвать существенную трансформацию эритроцитов с выраженным смещением в сторону необратимых форм. Метод АСМ позволяет с высокой точностью измерить высоту, диаметр и фрактальную размер-

ность клетки. Однако единственным высокочувствительным параметром, позволяющим на основе морфометрических измерений дифференцировать нормоциты от трансформированных форм эритроцитов, является фрактальная размерность.

Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского д-ру хим. наук проф. Д. А. Горину и канд. хим. наук С. В. Герману за синтез и предоставление наночастиц магнетита.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 16-14-10179.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: С. Н. П.

Сбор и обработка материала: Р. Н. К.

Статистическая обработка данных: Р. Н. К., С. Ю. З.

Анализ и интерпретация данных: С. Н. П.

Написание текста: С. Н. П., Р. Н. К., С. Ю. З.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Герман С.В., Иноземцева О.А., Маркин А.В., Метвалли Х., Хомутов Г.Б., Горин Д.А. Синтез гидрозолей магнетита в инертной атмосфере // Коллоидный журнал. 2013. Т. 75, № 4. С. 534–537 [German S.V., Inozemtseva O.A., Markin A.V., Metvalli Kh., Khomutov G.B., Gorin D.A. Synthesis of magnetite hydrosols in inert atmosphere // Kolloidnyi zhurnal. 2013. Vol. 75, № 4. P. 534–537. In Russ.] Doi: 10.7868/S0023291213040046.
- Герман С.В., Иноземцева О.А., Наволокин Н.А., Пудовкина Е.Е., Зуев В.В., Волкова Е.К., Бучарская А.Б., Плескова С.Н., Маслякова Г.Н., Горин Д.А. Синтез гидрозолей магнетита и их воздействие на живые системы на клеточном и тканевом уровнях при использовании МРТ и морфологических методов исследования // Российские нанотехнологии. 2013. Т. 8, № 7–8. С. 128–133 [German S.V., Inozemtseva O.A., Navolokin N.A., Pudovkina E.E., Zuev V.V., Volkova E.K., Bucharskaya A.B., Pleskova S.N., Maslyakova G.N., Gorin D.A. Synthesis of magnetite hydrosols and assessment of their impact on living systems at the cellular and tissue levels using MRI and morphological investigation // Rossiiskie nanotekhnologii. 2013. Vol. 8, № 7–8. P. 128–133. In Russ.].
- Козинец Г.И., Шишканова З.Г., Сарычева Т.Г. Клетки крови и костного мозга. Атлас. М.: Медицинское информационное агентство, 2004 [Kozinets G.I., Shishkanova Z.G., Sarycheva T.G. Cells of blood and bone marrow. Atlas. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2004. In Russ.].
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Быстрицкий Л.Д., Ткаченко С.Б. Атлас. Клинический патоморфоз эритроцита. Томск: Изд-во Томск. ун-та. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003 [Novitskii V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Bystritskiy L.D., Tkachenko S.B. Atlas. Clinical pathomorphosis of erythrocytes. Tomsk: Izdatel'stvo Tomskogo universiteta. M.: GEOTAR-MED, 2003. In Russ.].
- Плескова С.Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Долгопрудный: Издательский дом «Интеллект», 2011 [Pleskova S.N. Atomic force microscopy in biology and medicine. Dolgoprudnyi: Izdatel'skii dom «Intellekt», 2011. In Russ.].
- Плескова С.Н., Пудовкина Е.Е., Михеева Э.Р., Горшкова Е.Н. Взаимодействие квантовых точек с эритроцитами крови здоровых доноров // Бюл. экспер. биол. 2013. Т. 156, № 9. С. 362–366 [Pleskova S.N., Pudovkina E.E., Mikheeva E.R., Gorshkova E.N. Interaction between quantum dots and blood erythrocytes of healthy volunteers // Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2013. Vol. 156, № 9. P. 362–366. In Russ.].
- Якушева Е.В., Мирошников С.А., Кван О.В. Оценка влияния наночастиц металлов на морфологические показатели периферической крови животных // Вестн. Оренбургск. гос. ун-та. 2013. Т. 12, № 161. С. 203–207 [Yakusheva E.V., Miroshnikov S.A., Kvan O.V. Evaluation of the effect of metal nanoparticles on the morphological parameters of peripheral blood of animals // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2013. Vol. 12, № 161. P. 203–207. In Russ.].
- Starodubtseva M.N., Starodubtsev I.E., Starodubtsev E.G. Novel fractal characteristic of atomic force microscopy images // Micron. 2017. Vol. 96. P. 96–102. Doi: 10.1016/j.micron.2017.02.009.

Поступила в редакцию 11.10.2017

Получена после доработки 28.10.2017

CHANGES IN THE STRUCTURE AND FRACTAL DIMENSION OF ERYTHROCYTES EXPOSED TO MAGNETITE NANOPARTICLES (AN ATOMIC FORCE MICROSCOPIC STUDY)

S. N. Pleskova, R. N. Kriukov, S. Yu. Zubkov

Objective — to study the basic morphometric characteristics of erythrocytes and to detect their changes after exposure to magnetite nanoparticles.

Material and methods. Red blood cells of 23 healthy donors of both sexes aged 20 to 40 years were examined with the use of atomic force microscopy before and after incubation with magnetite nanoparticles for 60 min. Red blood cell diameter, height and fractal dimensions were measured.

Results. Incubation with the magnetite nanoparticles caused structural changes in the red blood cells. The main transformed forms were spherocytes, echinocytes, codocytes, stomatocytes. A small amount of forms that could be hardly differentiated, had perforation of the membrane.

Conclusion. Magnetite nanoparticles in sub-lethal concentration cause a significant increase in the number of irreversibly deformed erythrocyte forms. The most sensitive morphometric criterion for differentiating normocytes from all the transformed forms is erythrocyte fractality.

Key words: *erythrocyte, atomic force microscopy, morphology, fractality, magnetite nanoparticles*

«Physics of Solid-State Nanostructures» Research and Education Center, N. I. Lobachevskiy Nizhniy Novgorod State University, 23, Bld 3, Prospekt Gagarina, Nizhniy Novgorod 603950