

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

Т. Г. Матюхина¹, С. О. Пантелей², Т. А. Кузнецова³

¹ Гомельский медицинский институт, Гомель, Беларусь

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³ Институт порошковой металлургии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Эритроциты – традиционно излюбленная модель для биофизических исследований в области структурной и функциональной организации клеточных мембран.

Согласно интегральной твердокаркасной жидкостно-мозаичной модели, эритроцитарные мембраны описываются в виде непрерывного твердоупругого белкового каркаса, ячейки которого заполнены липидным бислоем. Белковый каркас представляет собой единую сеть, организованную за счет многочисленных слабых связей (ионных, водородных, ван-дер-ваальсовых и т.д.), действующих как на стыках протомеров, так и внутри них. Этот каркас обладает высокой эластичностью и обуславливает вязкоупругие свойства интактных мембран как целого. Белковый каркас, наряду с липидной фазой, контролирует подвижность мембранных рецепторов и ферментов, а также механические и морфологические свойства клеток.

Плазмолемма эритроцитов содержит не менее ста различных белков. Наиболее изучены из них следующие: спектрин, анкирин, белок, образующий анионный канал, белки полосы 3 и 4,1, гликофорин, актиноподобные белки. Большинство из них входит в состав цитоскелета, т.е. является структурными белками, которые обеспечивают форму эритроцита и определяют механические свойства его мембраны. Среди них интегральными комплексами, выступающими над поверхностью плазмолеммы, являются гликофорин и белок полосы 3, с которыми связаны подмембранные элементы цитоскелета. В целом они формируют цитоскелетный каркас, придающий эритроциту характерную двояковогнутую форму. Дефекты белков цитоскелета лежат в основе их разрушения при старении, а также ряда заболеваний (сфероцитоз, серповидноклеточная анемия и др.).

С этой точки зрения очень важно выявить закономерные взаимосвязи между перестройкой мембранного белкового каркаса и интегральными упруго-вязкостными свойствами плазмолеммы, которые лежат в основе поддержания нормальной дисковидной формы.

Подготовка образцов и метод исследования

Каплю периферической крови фиксировали в пробирке с 1 %-м раствором глютарового альдегида на фосфатном буфере. Затем центрифугировали 3 мин при 1500 об/мин. для получения осадка эритроцитарной массы. Центрифугирование повторяли еще дважды для отмывания осадка от фиксатора, используя дистиллированную воду. На последнем этапе в центрифужную пробирку помещали стек-

лянную подложку и проводили центрифугирование при 100 об/мин в течение 3 мин. Далее подложку высушивали при комнатной температуре на воздухе. Этот способ позволил получить равномерный монослой эритроцитов, прочно закрепленных на подложке (рис. 1).

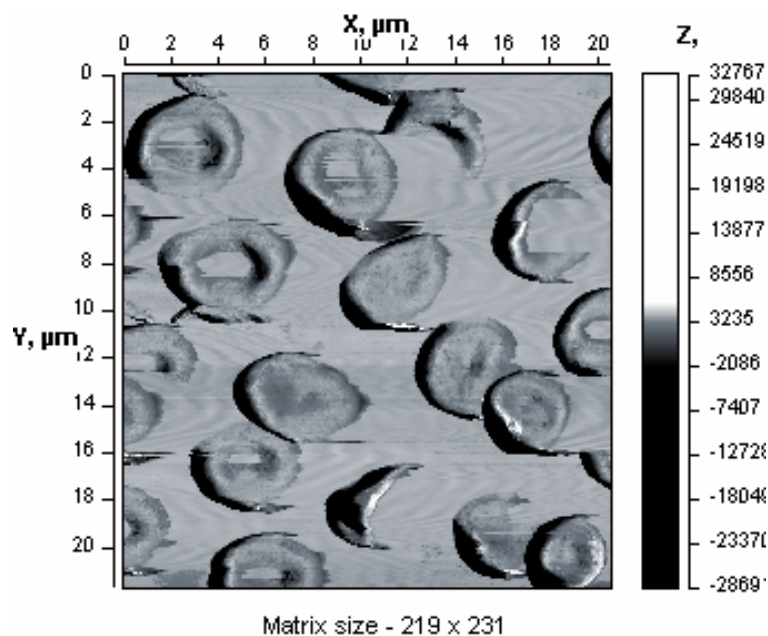


Рис. 1. АСМ-изображение участка исследуемого образца в режиме латеральных сил

АСМ-исследования проводили на приборе «НТ-206» (ОДО «Микротестмашины») с использованием стандартных кремниевых зондов («Mikromasch» Co.) в статическом (зонды CSC38) и динамическом (зонды NSC12) режимах. Кроме того, осуществлялось наноиндентирование различных зон клетки с помощью процедур статической силовой спектроскопии (рис. 2).

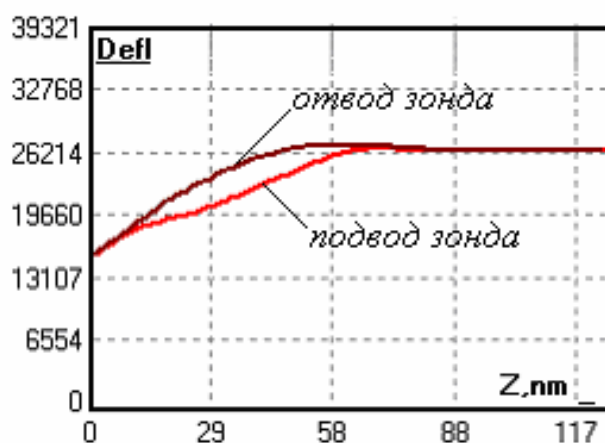


Рис. 2. Пример исходных экспериментальных кривых сближения зонда с поверхностью эритроцита

Результаты исследования

При больших полях сканирования получены изображения топографии и изображения латеральных сил и фазового контраста, отдельно лежащих на подложке эритроцитов (рис. 1). В большинстве случаев это дискоциты примерно одинакового диаметра – около 7 мкм. Однако кривизна центрального углубления варьируется значительно.

В контактном режиме на малых полях сканирования показана тонкая структура мембранной поверхности. В случае нормальных дискоцитов на их поверхности выявлены регулярные округлые выступы шириной 10–20 нм (рис. 3). Их организация была сходной как в углублении, так и на вершине тора (рис. 4). По размерам и характеру их распределения они хорошо соответствуют интегральным белковым комплексам, включенным в состав эритроцитарной мембраны. Подмембранный спектриновый цитоскелет не просматривается.

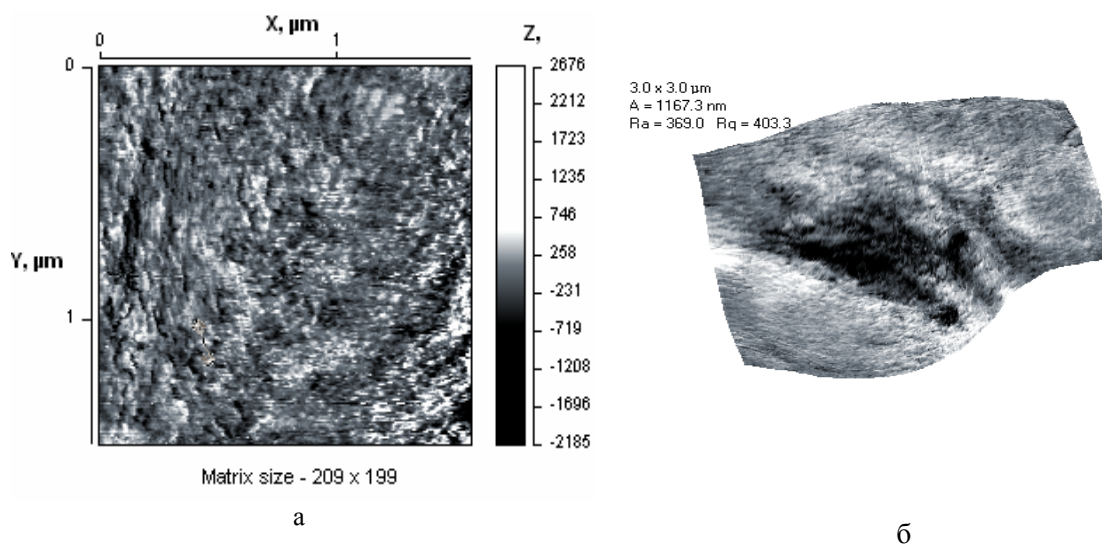


Рис. 3. АСМ-изображения тонкой структуры мембранной структуры эритроцита (нормальных дискоцитов): а – изображение латеральных сил, б – смешанное изображение; топография + латеральные силы

В случае изменения нормальной дискоидальной формы на поверхности эритроцитов, наряду с такими структурами, формировались более крупные выступы (до 100 нм). В центральных участках отмечены также гребни, расположенные параллельно. Предположительно, это могут быть элементы спектринового цитоскелета.

Особый интерес представляют структуры треугольной формы, выявленные в центральном углублении эритроцитов (рис. 5). Большой размер сторон этих структур равняется 1–1,5 мкм. Поверхность этих структур имеет такие же глобулярные выступы, как и остальная эритроцитарная поверхность. Вероятно, это выступы, которые обеспечивают агрегацию эритроцитов в «монетные столбики», когда они перемещаются в центральном потоке крови внутри сосудов. Следует отметить, что метод стандартной сканирующей электронной микроскопии не выявляет этих структур.

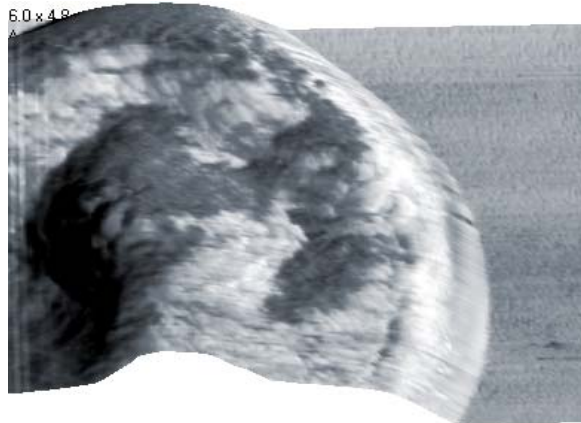


Рис. 4. Смешанное изображение (топография + латеральные силы) для эритроцита измененной дискоидальной формы

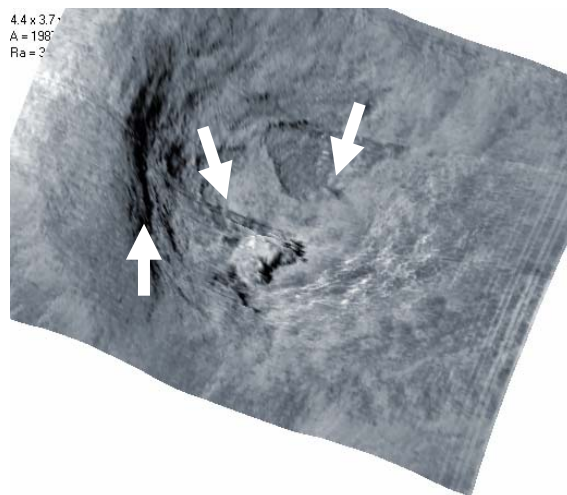


Рис. 5. Смешанное АСМ-изображение (топография + латеральные силы), отражающее структуры агрегации

Были также проведены исследования по определению упругостных свойств эритроцитов в различных участках его поверхности. Проводилось локальное индентирование клетки в различных зонах (рис. 6,а) с помощью микрозонда жесткостью 10 Н/м.

Результаты наноиндентирования показывают, что жесткость эритроцитарной поверхности на вершине тора (зона А) была ниже, чем в центральном углублении (зона Б). В этом отношении можно сделать несколько предположений. Во-первых, в центральной части происходит сближение двух мембран, а следовательно, сближаются и их подмембранные цитоскелетные структуры, что приводит к повышению интегральных упругостных показателей. Во-вторых, на эти по-

казатели может влиять близость жесткой стеклянной подложки. Уменьшение модуля упругости со временем нагружения (увеличения нагрузки) свидетельствует об вязкоупругом поведении материала исследуемых биоклеток.

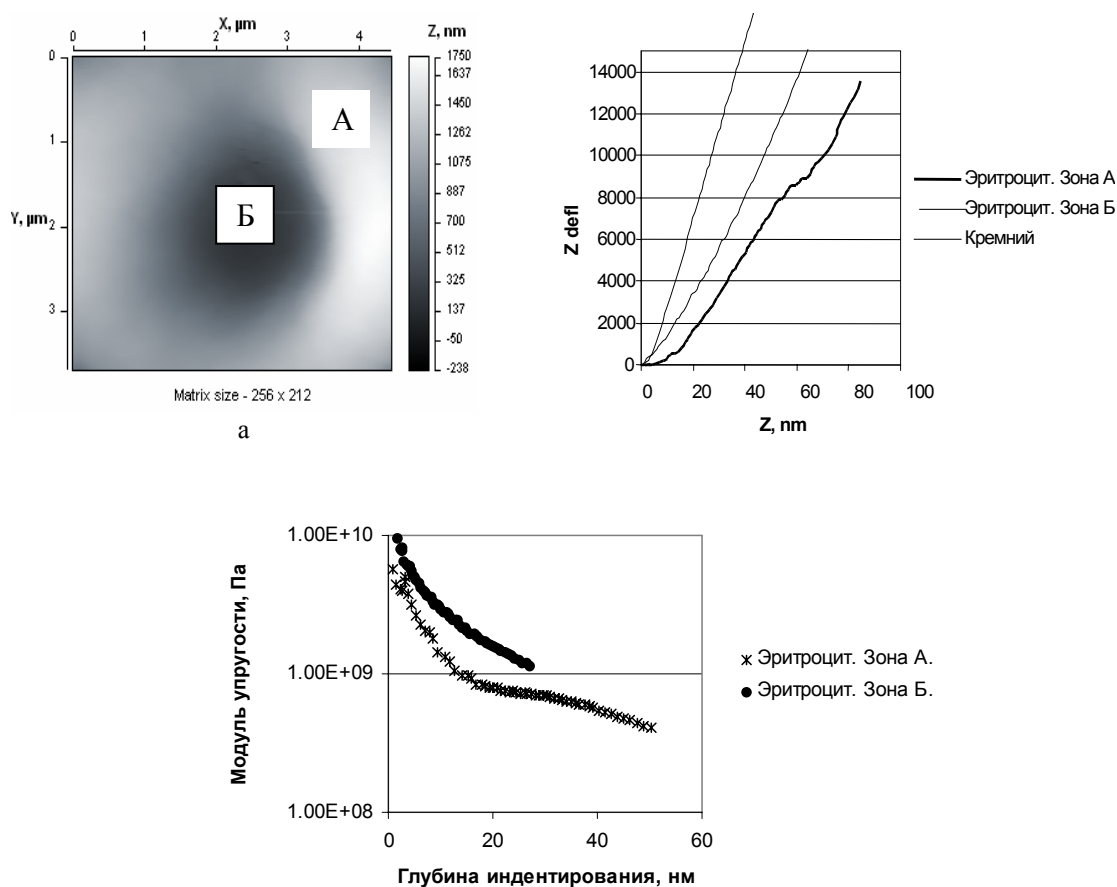


Рис. 6. Результаты статической силовой спектроскопии эритроцита в зонах «А» и «Б» (а); изгиб консоли для различных зон эритроцита в сравнении с жесткой поверхностью (кремний) (б); результаты расчета модуля упругости (в)

Таким образом, проведены комплексные АСМ-исследования эритроцитарных мембран. Показана неоднородность поверхностных механических свойств в режимах изображений контраста и статической силовой микроскопии. Поскольку исследования проводились для клеток, зафиксированных в воздушной среде, то количественные оценки эластичности в различных зонах мембраны можно считать завышенными и они могут значительно отличаться от значений для эритроцитов в привычной биосреде.