

## **ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

**Кухаренко Л.В., Гольцев М.В., Мороз-Водолажская Н.Н.**  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»  
Минск, Беларусь

*KukharenkoLV@bsmu.by, mgoltsev@mail.ru, n\_moroz@mail.ru*

*Атомно-силовая микроскопия (АСМ) становится многообещающим методом изучения тромбоцитов, включая как визуализацию внутрисосудистой активации тромбоцитов, так и измерение механических свойств (локальной жесткости, адгезии и эластичности) мембраны тромбоцитов. В этом исследовании внутрисосудистая активация тромбоцитов определялась с помощью АСМ 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. Методом АСМ визуализированы спонтанные тромбоцитарные агрегаты, определено их количество и количество тромбоцитов в агрегатах. Определялись морфометрические характеристики тромбоцитов (их форма и размеры) у здоровых лиц и у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности. Исследования с помощью атомно-силовой микроскопии выявили внутрисосудистую активацию тромбоцитов, повышение адгезивной и агрегационной активности тромбоцитов, а также снижение эластичности мембраны тромбоцитов у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности.*

**Ключевые слова:** *атомно-силовая микроскопия; тромбоцит; терминальная стадия хронической сердечной недостаточности*

## **INVESTIGATION OF PLATELET MORPHOFUNCTIONAL STATE OF PATIENTS WITH END-STAGE OF CHRONIC HEART FAILURE WITH ATOMIC FORCE MICROSCOPY**

**Kukharenko L.V., Goltsev M.V., Maroz-Vadalazhskaya N.N.**  
Belorussian State Medical University  
Minsk, Belarus

*The atomic force microscopy (AFM) is becoming a promising method of studying platelets, including both the visualization of intravascular platelet activation and measuring the mechanical properties (local stiffness, adhesion, and elasticity) of the platelets membrane. In this study, the intravascular platelet activation was determined with AFM 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 the heparin with protamine. The spontaneous platelet aggregates were visualized by AFM. The number of platelet aggregates and the number of platelets in the aggregates were determined. The morphometric characteristics of platelets (their shape and size) were investigated in healthy individuals and in patients with end-stage of chronic heart failure. Atomic*

*force microscopy investigations revealed intravascular platelet activation, an increase in the adhesive and aggregation activity of platelets, as well as a decrease in platelet membrane elasticity in patients with end-stage of chronic heart failure.*

**Key words:** *atomic force microscopy; platelet; end-stage of chronic heart failure*

Методы атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяют достигать уникальных научных результатов при изучении структуры и свойств различных биологических материалов [1]. В последние годы АСМ широко используется для исследования кровяных пластинок. С помощью АСМ на молекулярном уровне изучают морфологию поверхности тромбоцитов в интактном и активированном состояниях, а также исследуют локальные вязко-упругие свойства плазматической мембраны тромбоцитов. АСМ-изображения тромбоцитов имеют значительно большее разрешение, чем аналогичные изображения, получаемые с помощью оптической микроскопии и позволяют дифференцировать изменение поверхностной морфологии кровяных пластинок на разных этапах их внутрисосудистой активации. Изучение морфофункциональных особенностей тромбоцитов с помощью АСМ позволяет выявить ранние этапы их внутрисосудистой активации, охарактеризовать гемостазиологический статус пациентов, а также контролировать применение фармакологических средств, влияющих на их функции.

Цель данной работы состояла в использовании АСМ для оценки внутрисосудистой активации тромбоцитов, а так же для определения локальных вязко-упругих характеристик мембраны тромбоцитов (локальной жесткости, адгезии и эластичности) пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности с использованием имплантируемого одно- или двухжелудочкового вспомогательного сердца на этапах до операции и интраоперационно: до введения гепарина, после введения гепарина, после нейтрализации гепарина протамином.

Исследование топографии поверхности тромбоцитов осуществлялось с помощью АСМ Nanoscope (R) IIIa (Veeco) в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием стандартных кремниевых кантилеверов ( $k=29-57$  Н/м, Nanosensors GmbH). Наряду с топографией поверхности поточечно определялись локальная жесткость и адгезия тромбоцитов методом Pulse Force Modulation (PFM), который расширяет возможности атомно-силовой микроскопии. Наряду с топографией поверхности этот метод позволяет поточечно определить локальную жесткость и адгезию исследуемого биообъекта на микро-и наноуровне. 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. Служда 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 микроробирок, в которые добавляли 400 мкл клеточной суспензии. Микропробирки центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 секунд 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.

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.

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 изменению формы кровяных пластинок, что отражает определенное функциональное состояния клетки. Метод АСМ позволил не только регистрировать различные стадии внутрисосудистой активации тромбоцитов, но и исследовать их спонтанную агрегацию. На рис.1 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 а кровяном русле. Наблюдалось небольшое количество сфероцитов высотой 900 нм. А так же 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 так же 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 протаминам, а так же 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.

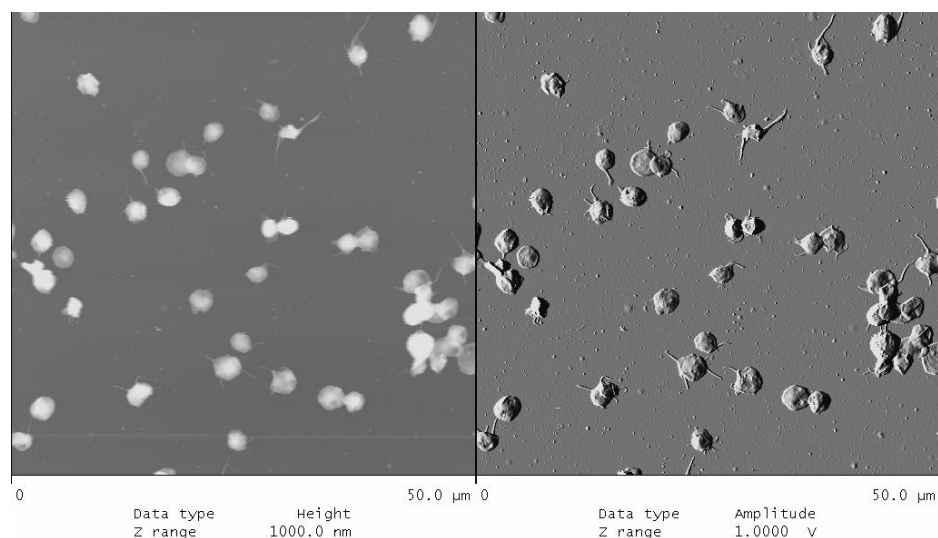


Рис. 1. АСМ-изображение тромбоцитов пациента основной группы (имплантация двухжелудочкового ВЖС) на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина.

Комплексный подход к исследованию кровяных пластинок осуществлялся путем измерения контраста упругих и адгезионных сил одновременно с топографией поверхности клеток. Контраст адгезионных сил 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 протамином. Как видно из АСМ-изображений контраста упругих сил жесткость мембраны тромбоцитов также уменьшается после введения гепарина и после нейтрализации гепарина протамином. С помощью атомно-силовой микроскопии выявлена внутрисосудистая активация тромбоцитов, а так же увеличение адгезивной и агрегационной активности кровяных пластинок у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности.

### Список литературы

1. Dufrene, Y.F. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology / Y.F. Dufrene, T. Ando, R. Garcia, D. Alsteens, D. Martinez-Martin, A. Engel, Ch. Gerber, D. J. Müller // Nature Nanotechnology. – 2017. – Vol.12, – P. 295–307