

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И УПРУГИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ОКС МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Н.Л. Цапаева¹, Е.Э. Константинова², Н.О. Абрамова¹, О.В. Хоменко²

¹Белорусский государственный медицинский университет;

²Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси

В ряде случаев, несмотря на ранний тромбозис или эндovasкулярную реваскуляризацию миокарда, предотвратить новые коронарные атаки, внезапную смерть или развитие сердечной недостаточности не удается [1, 2]. Этот неутешительный факт определяет поиск новых маркёров и уточнение патогенетических звеньев, влияющих на исход острого коронарного синдрома (ОКС) [3]. В наших предыдущих исследованиях было установлено, что повышение деформируемости эритроцитов у большинства пациентов с нестабильной стенокардией коррелирует со стабилизацией состояния пациента, а высокая степень ригидности является предиктором трансформации НС в инфаркт миокарда [4]. В этой связи представляется чрезвычайно важным и актуальным определить истинные структурно-функциональные изменения клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов) при ОКС [5].

Цель работы — отработка и адаптация метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) для изучения особенностей структурно-функциональных свойств клеток крови в патогенезе развития ишемического повреждения миокарда при остром коронарном синдроме.

Материал и методы. Для отработки и адаптации диагностических методов, впервые использовавшихся у пациентов с ОКС, на этапе «скорой помощи» или в условиях экстренной коронарографии исследованы образцы крови у 92 человек, из них у 32 пациентов с ОКС (средний возраст — $48,8 \pm 8,4$ года), у 30 пациентов со стабильной стенокардией (средний возраст — $51,9 \pm 6,4$ года) и образцы крови 30 здоровых доноров (средний возраст — $28,9 \pm 6,4$ года).

Определены параметры сканирования поверхности форменных элементов крови, представленные в таблице 1. Установлено, что для изучения морфологии эритроцитов и тромбоцитов у пациентов с ОКС оптимально использовать зонд NSC11 с жесткостью 3 Н/м, как более устойчивый к латеральным силам, т. к. обладает малой жесткостью и не повреждает мембрану клетки. Для визуализации клеток оптимально использовать зонды с радиусом закругления 20–40 нм, которые позволяют получить изображения с высокой детализацией и четкими очертаниями. Для изучения упругих свойств эритроцитов и тромбоцитов оптимально использовать зонд CSC38 с жесткостью 0,03 Н/м с радиусом закругления 60–100 нм. Этот предел радиуса закругления зонда позволяет получать локальные значения модуля упругости без риска повреждения мембраны клетки. Однако промышленные зонды имеют радиус закругления около 20 нм. Для получения зондов с нужным радиусом закругления необходимо предварительно стесать его.

Таблица 1

Параметры сканирования поверхности клеток крови, получаемые при использовании метода АСМ для оценки их морфологических и упругих свойств у пациентов с ОКС

Параметр	Значение
Зонд для визуализации (тип, жесткость, радиус)	NSC11, 3 Н/м, 20–40 нм
Зонд для оценки упругости (тип, жесткость, радиус)	CSC38, 0,03 Н/м, 60–110 нм
Скорость внедрения индентора	30 нм/с
Разрешение сканирования	256×256 точек
Нагрузка	30%
Режим	Статический

Для этого производят несколько последовательных сканирований материала, жесткость которого больше кремния (сталь). Радиус закругления определяется с помощью калибровочной решетки TGT01. Вследствие вязкоупругого поведения изменения локальных механических свойств клетки необходимо проводить при одной скорости контактного деформирования, в диапазоне скоростей 30 ± 5 нм/с.

Разрешение сканирования. Для предварительного просмотра и поиска клеток целесообразно использовать разрешение 128×128 из-за его большой скорости. Однако для визуализации и определения морфологических характеристик оптимально разрешение 256×256 , которое в отличие от предыдущего дает более точную и полную информацию о морфологии клетки.

Во избежание повреждения поверхности мембраны, оптимальная прикладываемая нагрузка при проведении процедуры статической силовой спектроскопии составляет 30% (примерно 80 нН). При превышении нагрузки более 100 нН существует риск повреждения мембраны клетки.

Динамический режим позволяет получать изображения, отображающие внутреннюю структуру клетки. Однако данный режим весьма трудоемкий, необходима аккуратная настройка и калибровка, при этом время получения изображений сильно увеличивается. Поэтому для проведения динамического наблюдения изменений характеристик эритроцитов и тромбоцитов у пациентов с ОКС в процессе лечения целесообразно использовать статический режим сканирования из-за простоты настройки и скорости получения данных.

На рисунке 1 представлены примеры изображения эритроцита и тромбоцита, полученных с использованием метода АСМ при применении выбранных параметров сканирования.

Все данные о пациентах заносились в базу данных, структура которой представлена в таблице 2.

Модуль упругости и сила адгезии определялись с помощью метода статической силовой спектроскопии, с последующей обработкой данных с помощью программ Surface Explorer, Microsoft Office Excel и Origin. Определение среднего размера и параметров шероховатости проводилось после обработки АСМ-изображений в программе Surface Explorer.

Ведение базы данных с разработанной структурой позволит наблюдать динамику изменений параметров, характеризующих морфологические и упругие свойства эритроцитов и тромбоцитов у пациентов с ОКС на различных этапах течения заболевания и проводить статистический анализ данных для определения факторов, прогностически значимых с точки зрения течения и исхода заболевания.

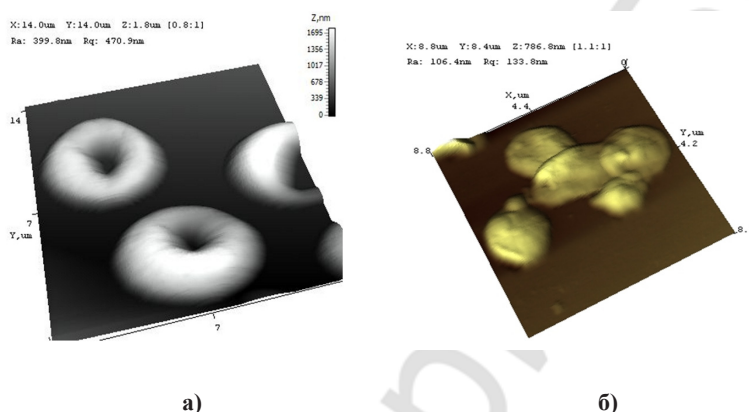


Рисунок 1а — Пример изображения эритроцита пациента с ОКС через 2 ч от начала ангинозного статуса; б — пример изображения тромбоцитов пациента с ОКС через 2 ч от начала ангинозного статуса

Таблица 2

Структура базы данных морфологических и упругих свойств клеток крови пациентов с ОКС

Наименование раздела базы данных	Перечень параметров, входящих в соответствующий раздел базы данных
Раздел 1. Сила адгезии	- Значение Deflection в точке отрыва на кривой отвода, нм
	- Контактная часть калибровочной кривой внедрения в txt формате
	- АСМ-изображение калибровочной TGT-решетки в spm формате
	- Тип зонда
	- Жесткость консоли, Н/м
Раздел 2. Средний размер и параметры шероховатостей	- АСМ-изображение клеток в spm формате
	- АСМ-изображение поверхности клетки в spm формате

Результаты и их обсуждение. В результате исследований морфологии, ультраструктуры и упругих свойств эритроцитов и тромбоцитов были получены следующие данные.

Значения модуля упругости эритроцитов у пациентов с ОКС находились в пределах от $57,5 \pm 6,6$ до $88,2 \pm 9,05$ МПа, у пациентов со стабильной стенокардией — от $04,5 \pm 8,2$ до $138,8 \pm 9,1$ МПа, у практически здоровых лиц — от $72,3 \pm 7,1$ до $81,4 \pm 7,9$ МПа.

Распределения значений данного параметра представлены на рисунке 2.

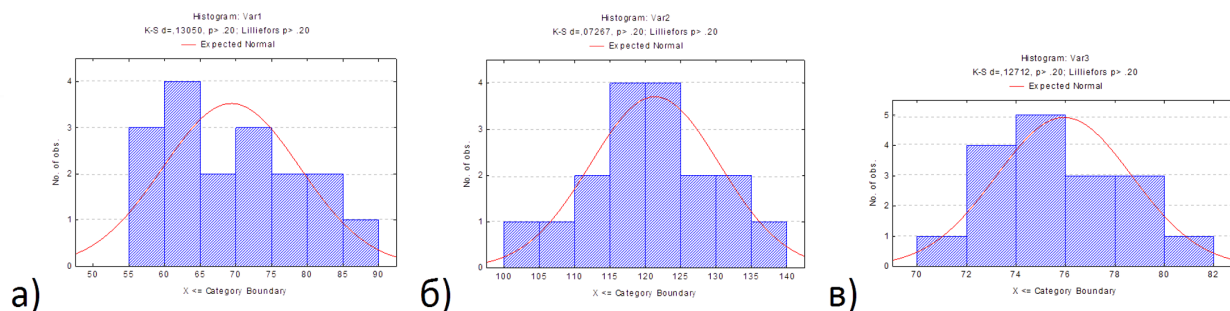


Рисунок 2 — Распределения значений модуля упругости эритроцитов: а) в группе пациентов с ОКС; б) в группе пациентов со стабильной стенокардией; в) в группе практически здоровых лиц

При этом значения силы адгезии находились в пределах, соответственно, от 22,2 до 33,3, от 21,3 до 28,4 и от 23,5 до 27,2 нН. Что касается морфологических характеристик красных клеток крови, значения поперечного и продольного диаметра клетки находились, соответственно, в пределах от 5,1 до 6,1 и от 6,65 до 7,74 мкм у пациентов с ОКС, от 5,4 до 5,73 и от 6,54 до 7,82 мкм и пациентов со стабильной стенокардией, от 6,4 до 6,8 и от 7,09 до 7,65 мкм у практически здоровых лиц, т. е. в результате исследования показано, что при ОКС есть тенденция к снижению модуля упругости эритроцитов как в сравнении с пациентами со стабильной стенокардией, так и с практически здоровыми лицами. При этом наибольшие значения данного показателя установлены у пациентов со стабильной стенокардией, т. е. при ОКС имеет место тенденция снижению ригидности эритроцитарных мембран, в то время как при стабильной стенокардии — к ее увеличению. Наибольшая сила адгезии также имела место у пациентов с ОКС. Что касается морфологических характеристик красных клеток, то по размерам клетки обследованных пациентов с ОКС и хронической ИБС практически не различаются, в то время как у практически здоровых лиц они более крупные.

Что касается состояния тромбоцитов, то здесь получены следующие данные: у лиц с хронической ИБС имеет место более высокая агрегационная активность кровяных пластинок, в то время как при ОКС тромбоциты отличаются более сферической формой и наличием большего количества псевдоподий, что свидетельствует об активации кровяных пластинок. При этом впервые установлено, что при ОКС обнаружен более высокий модуль упругости, свидетельствующий об активации тромбоцитов.

Таким образом, в результате выполнения исследований на данном этапе показано, что основной особенностью эритроцитов при ОКС является более низкий модуль упругости при более высоких значениях силы адгезии. Это указывает на дестабилизацию мембранных структур красных клеток крови при ОКС. Кроме того, данные АСМ показывают, что при ОКС имеет место активация тромбоцитов. Дальнейшие наблюдения позволят выявить особенности динамики изучаемых параметров в процессе экстренной терапии и длительного наблюдения пациентов с ОКС, что, в свою очередь даст возможность определить диагностически значимые с точки зрения течения и исхода ОКС параметры, характеризующие морфофункциональное состояние эритроцитов и тромбоцитов.

STUDY OF MORPHOLOGIC AND ELASTICITY CHARACTERISTIC OF RED CELLS AND PLATELETS WITH ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN ACS

N.L. Tsapaeva, E.K. Konstantinova, N.O. Abramova, O.V. Homenko

Study and adapted method of Atomic force microscopy probing of morphologic and elasticity property of red cells and platelets.

Литература

1. Epidemiology and pathophysiology of acute coronary syndrome / H. Eftekhari [et al.] // Acute Coronare Syndrome. — London: Springer, 2008. — P. 25–36.
2. Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / W. Wijns [et al.] // Eur. Heart J. — 2010. — Vol. 31. — P. 2501–2555.
3. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation // Eur. Heart J. — 2012. — Vol. 33, № 20. — P. 2569–2619.
4. Tsapaeva, N. Microcurculatory and haemorhological disorders in patients with IHD with differents anatomic and functional status of collateral blood flow / N. Tsapaeva // Abst. of XVIII ESC and FSC, Paris, Jun. 16–19. — Paris, 2008. — P. 245–246.

5. Дрозд, Е.С. Атомно-силовая микроскопия структурно-механических свойств мембран эритроцитов / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, Е.Э. Константинова // Рос. журн. биомеханики. — 2009. — Т. 13, № 4 (46). — С. 22–30.