

*Кухаренко Л.В.¹, Чижи́к С.А.², Дрозд Е.С.², Гольцев М.В.¹,
Мороз-Водолажская Н.Н.¹*

**Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов
пациентов с хронической сердечной недостаточностью
с помощью атомно-силовой микроскопии**

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Беларусь

²Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси,
г. Минск, Беларусь

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) широко используется для исследования морфологии поверхности и локальных вязко-упругих свойств плазматической мембраны тромбоцитов в условиях максимально приближенных к нативным. Известно, что тромбоциты играют одну из ключевых ролей в патогенезе хронической сердечной недостаточности. Так, триггером гиперкоагуляционного синдрома является увеличение адгезивной и агрегационной активности тромбоцитов. Поэтому определение внутрисосудистой активации кровяных пластинок, а так же характеристика упруго-вязких свойств их клеточной мембраны особенно важны для оценки гемостазиологического статуса пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

В данной работе методом АСМ определялась внутрисосудистая активация тромбоцитов для оценки их адгезивной и агрегационной активности, а так же определялись локальные вязко-упругие характеристики мембраны тромбоцитов (локальный модуль Юнга, адгезия, жесткость) пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности с использованием имплантируемого двухжелудочкового вспомогательного сердца.

Исследование упругих свойств кровяных пластинок осуществлялось при помощи специализированного экспериментального комплекса, совмещающего функции сканирующей зондовой и оптической микроскопии. Данный комплекс состоит из атомно-силового микроскопа

NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) с возможностями микропозиционирования зонда над образцом в пределах площадки 10x10 мм и оптической системы (НПРУП «ЛЭМТ» БелОМО, Беларусь). АСМ сканирование проводили стандартными кремниевыми зондами в контактном режиме. Статическая силовая спектроскопия выполнялась кремниевыми зондами («MikroMasch» Co., Эстония) CSC38 с жесткостью консоли 0,03 Н/м. Радиус закругления острия игл, используемых для оценки упругих свойств, составлял 60 нм. Суть статической силовой спектроскопии состоит в реализации контактного деформирования исследуемого объекта острием зонда и в измерении зависимости силы взаимодействия зонда с поверхностью образца от расстояния между ними. Расчет модуля упругости выполнялся по регистрируемым кривым с использованием модели Герца.

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 с использованием стандартных кремниевых кантилеверов NSC12/Si3N4/50 ($k=0,65$ Н/м, MikroMasch).

Для того чтобы исследуемые морфологические признаки тромбоцитов соответствовали их функциональному состоянию в кровотоке, забор крови из локтевой вены проводился максимально быстро с последующей фиксацией 2 мл крови в 4 мл 0,125% глутаральдегида.

С помощью атомно-силовой микроскопии выявлена внутрисосудистая активация тромбоцитов, а также увеличение адгезивной и агрегационной активности кровяных пластинок у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности. В результате оценки модуля упругости методом АСМ было установлено, что у пациентов основной группы (имплантация двухжелудочкового ВЖС) на этапе дооперационного исследования модуль упругости тромбоцитов ($E=111,8\pm 6,9$ кПа) достоверно выше, чем в группе здоровых лиц ($E=62,6\pm 6,2$ кПа). При повторных заборах крови наблюдается тенденция к увеличению модуля упругости кровяных пластинок относительно исходных значений, а, следовательно, эластичность мембраны тромбоцитов снижается и клетки становятся более жесткими. Значение модуля упругости у здоровых лиц существенно отличается от значения данного параметра у пациентов с имплантированным двухжелудочковым ВЖС в ранние и поздние сроки после операции. Так, значение локального модуля упругости на 30 сутки после операции в 2,4 раза больше, значения локального модуля упругости у здоровых лиц.