

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ТРОМБОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

**Кухаренко Л.В.¹, Чижик С.А.², Дрозд Е.С.², Гольцев М.В.¹,
Мороз-Водолажская Н.Н.³**

*¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск,
Беларусь, lvk@europa.com*

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

³Республиканский научно-практический центр спорта, Минск, Беларусь

В последние годы атомно-силовая микроскопия (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. Цель данной работы состояла в использовании метода АСМ для определения локальных вязко-упругих характеристик мембран тромбоцитов (локальный модуль упругости, адгезия, жесткость) 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 протаминам. Так же проводилась оценка внутрисосудистой активации тромбоцитов с помощью АСМ и оптической микроскопии.

Исследование упругих свойств тромбоцитов 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 так же 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 (PFM) 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. Кровь сразу же фиксировали в 0,125 % растворе глутарового альдегида. Фиксированную кровь центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин для получения обогащенной тромбоцитами плазмы. По одному кусочку свежесколотой слюды помещали на дно микропробирок, в которые добавляли 400 мкл клеточной суспензии. Микропробирки центрифугировали при 3000 об/мин в течение

30с для осаждения тромбоцитов на слюду. Через 20 мин образцы промывали фосфатным буфером, а затем дегидратировали в этаноле и высушивали на воздухе.

С помощью АСМ и оптической микроскопии показано, что тромбоциты пациентов, с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности, на этапе интраоперационного исследования, до введения гепарина, имели дисковидную форму с диаметром 1,8 – 2,5 мкм и высотой 400 - 550 нм (рис.1).

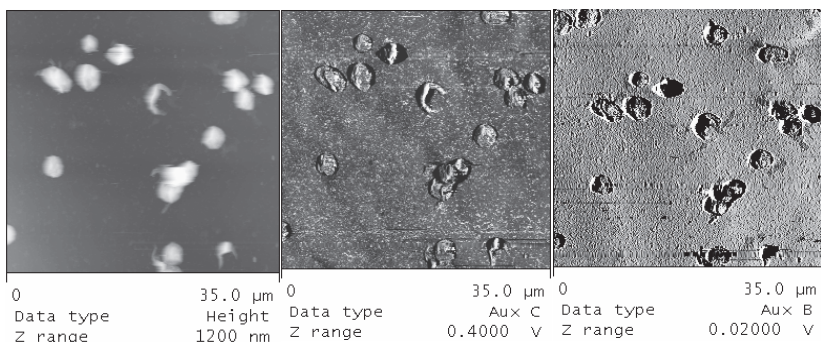


Рисунок 1. АСМ-изображение тромбоцитов пациента с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина: а - топография; б - контраст адгезионных сил; в - контраст упругих сил.

Большое количество кровяных пластинок имели короткие филоподии длиной от 500 нм до 2,5 мкм. Наблюдалось небольшое количество сфероцитов высотой 900 нм. Визуализированы тромбоцитарные агрегаты диаметром от 5 до 13 мкм. Количество тромбоцитов в агрегатах варьировало от 2 до 11. После введения гепарина наблюдалось уменьшение количества тромбоцитов с филоподиями, а так же – тромбоцитарных агрегатов (рис.2). АСМ и оптическая микроскопия показали наличие тромбоцитов сферической формы диаметром от 1,9 до 2,2 мкм и высотой 900 нм на этапе интраоперационного исследования после нейтрализации гепарина протамином, а так же уменьшение количества тромбоцитов с филоподиями и тромбоцитарных агрегатов. Контраст адгезионных сил на АСМ-изображениях показал, 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. Так же наблюдалось уменьшение жесткости мембраны кровяных

пластинок после введения гепарина и после нейтрализации гепарина протамином.

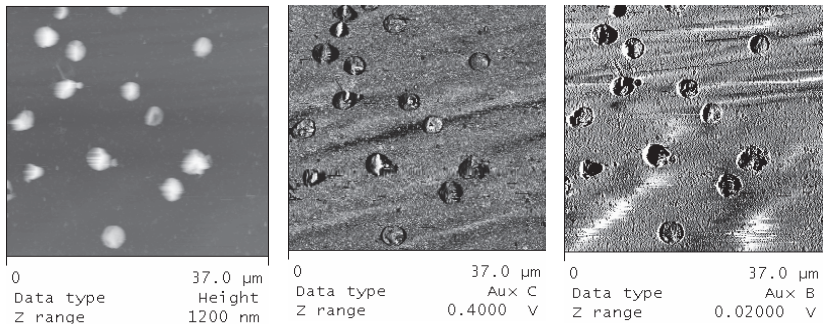


Рисунок 2. АСМ-изображение тромбоцитов пациента с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности на этапе интраоперационного исследования после введения гепарина: а - топография; б - контраст адгезионных сил; в - контраст упругих сил.

В результате оценки модуля упругости методом атомно-силовой микроскопии было установлено, что модуль упругости тромбоцитов у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности ($E=111,8\pm 6,9$ кПа) достоверно выше, чем в группе здоровых лиц ($E=62,6\pm 6,2$ кПа).