

Изучение наноструктуры красных клеток крови при интоксикации. АСМ-исследования

Е.К. КОЗЛОВА, В.В. МОРОЗ, А.М. ЧЕРНЫШ

Научно-исследовательский институт общей реаниматологии (НИИОР)
им. В.А. Неговского, РАМН, г. Москва

Study of Red Blood Cell Nanostructure during Intoxication. AFM Investigation

E.K. KOZLOVA, V.V. MOROZ, A.M. CHERNYSH

V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology (SRIGR)
of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

При интоксикации организма изменяется функциональное состояние клеток крови. Для выработки правильной тактики лечения необходимо знать механизм возникновения патологических нарушений в красных клетках крови.

Цель работы – изучить изменение наноструктуры мембран эритроцитов при интоксикации крови *in vitro* в результате действия фармакологических и химических препаратов высокой концентрации.

Монослои клеток готовили из крови здоровых доноров с помощью устройства «V-Sampler» («Microscopy Vision», Австралия). Все доноры дали добровольное согласие на исследование своей крови в соответствии с нормами этического комитета НИИОР. В микроветы (200 мкл) с кровью и ЭДТА добавляли растворы гемина, фуросемида, хлорпромазина, $ZnSO_4$. Эти вещества оказывают воздействие на белки мембран эритроцитов. Концентрация веществ изменялась в крови *in vitro* от 0,1 до 5 мМ. Изображения клеток, мембран, их фрагментов получали с помощью атомной силовой микроскопии (АСМ) («NTEGRA Prima», «NT-MDT», РФ) в полуконтактном и контактном режимах. Для получения детального изображения наноструктуры использовали пространственное Фурье преобразование.

С помощью АСМ получены изображения мембран клеток. Проведен количественный анализ параметров наноструктуры до и после воздействия. Экспериментально установлено, что при действии указанных препаратов возникали специфические структуры на поверхности мембран красных клеток крови. В зависимости от концентрации препаратов их диаметр варьировался от 70 до 1000 нм, а высота от 10 до 100 нм. Форма возникающих упорядоченных структур специфична для каждого препарата. Действие гемина приводило к возникновению доменов с зернистой структурой, хлорпромазина – щелевидных структур, фуросемида – кольцевых образований, ионов цинка – сетевых структур. В опытах проводили коррекцию наноструктуры с помощью альбумина и перфторуглеродной эмульсии.

Интоксикация крови *in vitro* существенно влияет на наноструктуру мембран эритроцитов. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с нарушением собственных параметров мембраны (flickering, спектриновый матрикс, белковые кластеры). Изучение наноструктуры важно для установления механизма влияния физических и химических факторов на мембраны клеток крови.

Functional state of blood cells changes during organism intoxication. To develop a proper therapeutic approach we should know the mechanism of appearing pathological disorders in red blood cells.

The research aim was to study the changes of erythrocyte membrane nanostructure during blood intoxication *in vitro* under effect of pharmacological and chemical preparations of high concentration.

Cell monolayers were prepared from blood of healthy donors with V-Sampler (Microscopy Vision, Australia). All the donors consented for investigation of their blood according to the Guidelines of SRIGR Ethics Committee. Microvettes (200 μ l) with blood and EDTA were supplemented with solutions of hemin, furosemide, chlorpromazine, $ZnSO_4$. These substances affect the erythrocyte protein membranes. Concentration of substances was changed in blood *in vitro* from 0.1 up to 5 mM. Images of cells, membranes, their fragments were obtained with atomic force microscopy (AFM) (NTEGRA Prima, NT-MDT, Russia) in semi-contact and contact regimens. To obtain a detailed representation of nanostructure we used space Fourier transform.

The images of cell membranes were obtained with AFM. Quantitative analysis of nanostructure parameters prior to and after exposure has been performed. We experimentally proved that specific structures appeared on a membrane surface of red blood cells during effect of mentioned preparations. Depending on concentration of preparations their diameter varied from 70 up to 1,000 nm, and the height did from 10 up to 100 nm. The shape of appearing ordered structures was specific for each preparation. Hemin effect induced the appearance of domains with granular structure, chlorpromazine did with fissured structures, for furosemide it was ring formations, zinc ions were with net structures. During experiments we corrected nanostructure with albumin and perfluoridecarbon emulsion.

Blood intoxication *in vitro* significantly affects the erythrocyte membrane nanostructure. The observed changes may be associated with disorder of own membrane parameters (flickering, spectrin matrix, protein clusters). Study of nanostructure is important to reveal the mechanism of physico-chemical factors effect on blood cell membranes.