

УДК 611.018.51+611.018.18

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЯЗКО-ЭЛАСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

¹Столбовская О.В., ¹Хайруллин Р.М., ¹Куликова Т.К.,

²Снежкина А.В., ²Садритдинова А.Ф.

¹ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»,

Ульяновск, e-mail: ov_stolbovskaya@mail.ru;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН ГСП-1,

Москва, e-mail: lefiger@rambler.ru

Проведён анализ вязко-эластических свойств цитоплазматической мембраны фиксированных лимфоцитов крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом методом атомно-силовой микроскопии. Вязко-эластические свойства клеточной мембраны оценивали с помощью модуля Юнга. Выявлены различия модуля Юнга лимфоцитов крови доноров в зависимости от возраста. Модуль Юнга лимфоцитов крови больных сахарным диабетом больше по значению, чем у доноров. Воздействие светодиодным излучением красного диапазона на лимфоциты крови *in vitro* приводит к изменениям вязко-эластических свойств цитоплазматической мембраны. Различия в показателях модуля изотермического сжатия как у доноров, так и больных сахарным диабетом отражает изменения пространственной организации молекулярной структуры цитоплазматической мембраны лимфоцитов крови, происходящие под влиянием красного светодиодного излучения.

Ключевые слова: лимфоциты крови человека, атомно-силовая микроскопия, светодиодное излучение

THE INVESTIGATION OF VISCOELASTIC PROPERTIES OF THE CYTOPLASMIC MEMBRANE OF HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES BY ATOMIC-FORCE MICROSCOPY

¹Stolbovskaya O.V., ¹Khayrullin R.M., ¹Kulikova T.K., ²Snezhkina A.V., ²Sadritdinova A.F.

¹Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: ov_stolbovskaya@mail.ru;

²Institute of molecular biology named after V.A. Engelhardt of the RAS,

Moscow, e-mail: lefiger@rambler.ru

The visco-elastic properties of the plasma membrane of fixed blood lymphocytes from healthy donors and patients with diabetes mellitus by atomic force microscopy was analysed. Visco-elastic properties of the cell membrane was assessed by Young's modulus. Differences of Young's modulus of lymphocytes in healthy donors blood vary by age. Young's modulus of blood lymphocytes of patients with diabetes more in value than in donors. Exposure to radiation from the red LED range on blood lymphocytes *in vitro* leads to changes in visco-elastic properties of the plasma membrane. Differences in isothermal compression module, like donors and patients with diabetes reflects the changes of the spatial organization of the molecular structure of the cytoplasmic membrane of blood lymphocytes, occurring under the influence of red LED light.

Keywords: human blood lymphocytes, atomic force microscopy, light-diode radiation

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) как один из современных методов клеточной биологии дает возможность при высоком разрешении молекулярной визуализации клеточных мембран изучить нано-механические свойства мембран, определяющие течение физиологических и патологических процессов в клетке [4, 7, 8, 9, 10]. Важное клиническое значение имеет реакция клеток на различные физические воздействия, одним из которых является светодиодное (некогерентное) излучение красного диапазона (СДИКД). Оно обладает идентичным низкоинтенсивному лазерному излучению биологическим действием на различные клеточные и тканевые структуры, что определяет успех его применения при коррекции функциональных нарушений [1, 3]. Выраженные биологические эффекты красного светодиодного некогерентного излучения требуют

теоретического обоснования и раскрытия механизмов его действия на молекулярном и клеточном уровнях. Одним из наиболее общих интегральных показателей структурно-функционального состояния мембран на молекулярном уровне являются вязко-эластические свойства, отражающие способности клеток к обратимым деформациям и адгезии в норме и патологии [5, 6, 7].

Цель настоящего исследования – изучение воздействия светодиодного излучения красного диапазона на вязко-эластические свойства цитоплазматической мембраны лимфоцитов здоровых доноров и больных сахарным диабетом *in vitro* методом атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали лимфоциты крови человека, которые являлись моделью для оценки

глубины повреждения мембран на молекулярном уровне при сахарном диабете [5]. Лимфоциты крови здоровых доноров и больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) и инсулиннезависимым сахарным диабетом (ИНСД) выделяли в градиенте плотности фиколла-верографина. Первую группу обследованных составили больные ИЗСД (20–35 лет); вторую группу – пациенты с ИНСД (49–71 год). Возраст здоровых доноров в I контрольной группе составлял от 20 до 35 лет, а во II – от 49 до 60 лет. В каждой исследуемой группе были взяты пробы крови. Диагноз сахарного диабета ставился на основании клинико-лабораторного обследования в отделении эндокринологии ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница № 1». На все виды исследований были получены разрешения этической комиссии Ульяновского госуниверситета. Исследования проводились с соблюдением прав и свобод, определенных законодательством РФ, этическими нормами и принципами в соответствии с Декларацией Хельсинки (1964) со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на человеке, а также международным руководством для биомедицинских исследований с вовлечением человека (International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects) Совета международных организаций медицинских наук (CIOMS). Все первичные результаты исследований были обезличены в соответствии требованиями п. 3 ст. 6 действующего Федерального закона РФ 152-ФЗ «О персональных данных». Вязко-эластические свойства клеточной мембраны лимфоцитов оценивали с помощью модуля Юнга, характеризующего способность клетки к деформациям, возникающим при взаимодействии мембраны с вершиной зонда АСМ. Для расчета модуля Юнга (MPa) использовали модель Герца [3]. Для исследования поверхности лимфоцитов использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver P47-PRO (ЦНТИМ). Использовались неконтактные кремниевые зонды серии NSG10 (NT-MDT) с жесткостью 5,5 н/м, резонансной частотой приблизительно 150 кГц, радиусом закругления 10 нм, высота зонда 10–20 мкм. Проводили сканирование 50 клеток из каждой исследуемой группы в контактном режиме в воздушной среде. Отмытые физиологической средой лимфоциты облучали некогерентным светодиодным излучением красного диапазона (СДИКД) *in vitro*, готовили тонкие мазки на стекле,

затем фиксировали метанолом в течение 5 минут. В качестве источника СДИКД использовали прибор типа «карандаш». Излучающим устройством являлись светоизлучающие диоды ($n = 5$), представляющие собой арсенид-галлий-алюминиевые кристаллы красного цвета свечения (длина волны 620–680 нм). Источник характеризуется следующими параметрами: средняя мощность излучения – 2,5 мВт; импульсная мощность излучения – 5 мВт; частота повторения импульса – 50 Гц; длительность импульса – 5 мс. Время экспозиции лимфоцитов составляло 2, 5 и 10 мин соответственно, доза облучения – 1,69; 4,23; 8,46 Дж/см² [3]. Полученные экспериментальные данные анализировали в программе Nova, Matlab. Статистическую обработку данных проводили с использованием лицензионной компьютерной программы «Statistica 6.0» StatSoft Inc. (США) непараметрическими критериями статистики по правилам, рекомендованным международным комитетом редакторов биомедицинских журналов (ICMJE). Достоверность различий оценивали на основе U-критерия Манна-Уитни, за достоверность принимали различия на уровне значимости 95% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ результатов атомно-силовой спектроскопии упругих деформаций лимфоцитов периферической крови позволил выявить, что клеточная мембрана лимфоцитов доноров II контрольной возрастной группы по сравнению с I контрольной группой характеризуется более высокими значениями модуля Юнга. Модули Юнга лимфоцитов при ИЗСД и ИНСД превышают показатели модуля контрольных групп соответственно на 89 и 67% ($p < 0,05$) (табл. 1, 2). Различия в показателях модуля упругости лимфоцитов при сахарном диабете, возможно, связаны с патологическими процессами, нарушающими молекулярную структуру клеточной мембраны, и эти изменения характеризуются снижением вязко-эластических свойств, повышением жесткости и увеличением адгезивности мембраны.

Таблица 1

Показатели модуля Юнга (MPa), характеризующие вязко-эластические свойства цитоплазматической мембраны эритроцитов здоровых доноров и больных ИЗСД при воздействии различных доз облучения СДИКД

№ п/п	Доза облучения (Дж/см ²)	Лимфоциты здоровых доноров		Лимфоциты больных ИЗСД	
		Область цитолеммы над ядром	Адгезивная часть цитоплазмы	Область цитолеммы над ядром	Адгезивная часть цитоплазмы
1	Интактные	0,0003 ± 0,00003	0,0004 ± 0,00003	0,0029 ± 0,0005	0,0094 ± 0,0039»
2	1,69 Дж/см ²	0,0083 ± 0,0029*	0,0141 ± 0,0031*	0,0009 ± 0,0001*»	0,0047 ± 0,0017»
3	4,23 Дж/см ²	0,0009 ± 0,00007*^	0,0039 ± 0,0012*^	0,0024 ± 0,0003^»	0,0009 ± 0,0012^»
4	8,46 Дж/см ²	0,0018 ± 0,0002*^»	0,0005 ± 0,0002^»	0,0171 ± 0,0096^»	0,0009 ± 0,0001^»

Примечания: * – достоверные отличия опытной группы от группы без облучения $p < 0,05$; ^ – достоверные отличия в пределах опытной группы в отношении дозы облучения 1,69 Дж/см² $p < 0,05$; » – достоверные отличия в пределах опытной группы в отношении дозы облучения 4,23 Дж/см² $p < 0,05$; « – достоверные отличия между ядерной частью клетки и областью адгезивной цитолеммы лимфоцитов в пределах группы $p < 0,05$.

Таблица 2

Показатели модуля Юнга (MPa), характеризующие вязко-эластические свойства цитоплазматической мембраны эритроцитов здоровых доноров и больных ИНСД при воздействии различных доз облучения СДИКД

№ п/п	Доза облучения (Дж/см ²)	Лимфоциты здоровых доноров		Лимфоциты больных ИНСД	
		Область цитолеммы над ядром	Адгезивная часть цитоплазмы	Область цитолеммы над ядром	Адгезивная часть цитоплазмы
1	Интактные	0,0055 ± 0,0051	0,0074 ± 0,0068	0,0157 ± 0,0645	0,0117 ± 0,0032»
2	1,69 Дж/см ²	0,0003 ± 0,0006*	0,0011 ± 0,0031*»	0,0027 ± 0,0017	0,0096 ± 0,0035 «
3	4,23 Дж/см ²	0,0008 ± 0,0035*	0,0007 ± 0,0036*	0,0041 ± 0,002	0,0029 ± 0,001*^
4	8,46 Дж/ см ²	0,0034 ± 0,0028*	0,002 ± 0,0011*	0,0043 ± 0,0001	0,0078 ± 0,0029»

Пр и м е ч а н и я : * – достоверные отличия опытной группы от группы без облучения $p < 0,05$;
 ^ – достоверные отличия в пределах опытной группы в отношении дозы облучения $1,69 \text{ Дж/см}^2 p < 0,05$;
 ~ – достоверные отличия в пределах опытной группы в отношении дозы облучения $4,23 \text{ Дж/см}^2 p < 0,05$;
 « – достоверные отличия между ядерной частью клетки и областью адгезивной цитолеммы лимфоцитов в пределах группы $p < 0,05$.

В условиях прямого воздействия СДИКД на лимфоциты доноров в дозах 1,69 и 8,46 Дж/см² происходит изменение показателей модуля Юнга клеточной мембраны лимфоцитов, которое не носит закономерного характера (табл. 1, 2). Реакция клеточной мембраны лимфоцитов II контрольной группы на действие СДИКД проявляется в снижении модуля Юнга, и при дозе воздействия 8,46 Дж/см² его значение соответствует контрольному показателю (табл. 2). В условиях воздействия СДИКД на лимфоциты крови больных ИЗСД в дозах 1,69 Дж/см², модуль Юнга клеточной мембраны в области ядра снижается на 70% ($p < 0,05$), а при дозе 8,46 Дж/см² – повышается на 83%. В адгезивной части мембраны в зависимости от дозы воздействия модуль Юнга снижается на 50, 90, 90% соответственно, но не достигает показателей контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 1). В цитоплазматической мембране лимфоцитов крови больных ИНСД при облучении СДИКД в дозах 1,69; 4,23; 8,46 Дж/см² модуль Юнга снижается, причем это снижение имеет дозозависимый характер, и его значения сравнимы с модулем Юнга мембраны лимфоцитов контрольной группы (табл. 2).

Закключение

Таким образом, результаты наших исследований показали, что АСМ дает возможность оценить воздействие СДИКД на молекулярную структуру цитоплазматической мембраны лимфоцитов крови доноров и больных сахарным диабетом. Исследование цитоплазматической мембраны лимфоцитов позволило выявить, что у доноров II возрастной группы модуль Юнга значи-

тельно больше, чем у доноров I группы. Модули упругости мембран лимфоцитов больных ИЗСД и ИНСД превышают показатели модулей соответствующих контрольных групп. Показатели модуля Юнга лимфоцитов крови больных ИНСД выше по сравнению с ИЗСД. Более высокие значения модуля упругости старшей возрастной группы и больных ИНСД позволяют предположить, что происходит изменение механических свойств мембраны: снижение вязко-эластических свойств, повышение жесткости, которое сопровождается повышением адгезивности мембраны лимфоцитов и изменением функциональной активности. Воздействие СДИКД в условиях *in vitro* на лимфоциты ИНСД носит преимущественно дозозависимый характер в отличие от ИЗСД. Различия в показателях модуля Юнга цитоплазматической мембраны лимфоцитов отражают изменения пространственной организации молекулярной структуры цитоплазматической мембраны, происходящие под влиянием красного светодиодного излучения, а также показывает возможность ее коррекции в норме и патологии.

Список литературы

1. Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Фототерапия. – М.: Медицина, 2001. – 389 с.
2. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа / Д.В. Лебедев, А.П. Чуکلанов, А.А. Бухараев, О.С. Дружинина // Письма в ЖТФ. – 2009. – Т.35, № 8. – С. 54–61.
3. Лаврушина Е.Е., Столбовская О.В., Топурия Г.М. Применение светодиодного излучения для коррекции процессов регенерации кожи. – Ульяновск: Изд-во Ульян. гос. с.х. акад., 2008. – 128.

4. Лагутина А.А., Белявский А.А., Белявский С.А. Состояние клеточных мембран при сахарном диабете и его изменение под воздействием гипербарического кислорода // *Анестезиология и реаниматология*. – 2004. – № 3. – С. 57–58.

5. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Муравьев А.В. Цитоархитектоника лимфоцитов здоровых доноров в условиях активации и блокады β -адренорецепторов // *Ярославский педагогический вестник*. – 2011. – Т. III № 3. – С. 104–109.

6. Deng Z., Lulevich V., Liu F.-t., Liu G.-y. Applications of Atomic Force Microscopy in Biophysical of Cells // *J. Phys. Chem. B*. – 2011. – Vol. 114. № 18. – P. 5971–5982.

7. Francis L.W., Lewis P.D., Wright C.J., Conlan R.S. Atomic force microscopy comes of age // *Biol.Cell*. – 2010. – Vol. 102, № 2. – P. 133–143.

8. Hekele J., Goesselsberger C.G., Gebeshuber I.C. Nanodiagnosics performed on human red blood cells with atomic force microscopy // *Material Science and technology*. – 2008. – Vol. 24, № 9. – P. 1162–1165.

9. Skorkina M.Yu., Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. Evaluation of Morphometric Parametrs of Native Blood Cells by Atomic Force Microscopy.- *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 150, № 2. – P. 273–275.

10. Wu Y., Lu H., Cai J., He X., Hu Yi., Zhao H., Wang X. Membrane Surface Nanostructures and Adhesion Property of T Lymphocytes Exploited by AFM// *Nanoscale Res Lett* (2009) 4: 942-947. DOI 10.1007/s11671-009-9340-8.

References

1. Karandashov V.I., Petuhov E.B., Zrodnikov V.S., Fototerapija [Phototherapy]. Moscow: Medicina, 2001, 389 p.

2. Lebedev D.V. Chuklanov A.P., Buharaev A.A., Druzhinina O.S, Pis'ma v ZhTF, 2009, T.35, no. 8, pp. 54–61.

3. Lavrushina E.E., Stolbovskaya O.V., Topuriya G.M. Primenenie svetodiodnogo izlucheniya dlja korrekcii processov regeneracii kozhi [Application of red LED light-emitting diode radiation for correction of processes of regeneration of skin]. Ul'janovsk: Izd-vo Ul'jan. gos. s.h. akad., 2008, 128 p.

4. Lagutina A.A., Beljavskij A.A., Beljavskij S.A. Anesteziology i reanimatologija, 2004, no. 3, pp. 57–58.

5. Skorkina M.Ju., Fedorova M.Z., Murav'ev A.V. Jaroslavskij pedagogicheskij vestnik, 2011, Vol. 3 no. 3, pp. 104–109.

6. Deng Z., Lulevich V., Liu F.-t., Liu G.-y. Applications of Atomic Force Microscopy in Biophysical of Cells // *J. Phys. Chem. B*. 2011. Vol. 114. № 18. pp. 5971–5982.

7. Francis L.W., Lewis P.D., Wright C.J., Conlan R.S. Atomic force microscopy comes of age // *Biol.Cell*. 2010. Vol. 102. no. 2. pp. 133–143.

8. Hekele J., Goesselsberger C.G., Gebeshuber I.C. Nanodiagnosics performed on human red blood cells with atomic force microscopy // *Material Science and technology*. 2008. Vol. 24. no. 9. pp. 1162–1165.

9. Skorkina M.Yu., Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. Evaluation of Morphometric Parametrs of Native Blood Cells by Atomic Force Microscopy.- *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010. Vol. 150, no. 2, P. 273–275.

10. Wu Y., Lu H., Cai J., He X., Hu Yi., Zhao H., Wang X. Membrane Surface Nanostructures and Adhesion Property of T Lymphocytes Exploited by AFM// *Nanoscale Res Lett* (2009) 4: 942-947. DOI 10.1007/s11671-009-9340-8.

Рецензенты:

Музурова Л.В., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека, ГОУ ВПО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского», г. Саратов;

Чарышкин А.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 12.03.2013.