

Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфофункционального состояния тромбоцитов пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности

Л.В. Кухаренко¹, С.А. Чижик², Е.С. Дрозд², М.В. Гольцев¹, Н.Н. Мороз-Водолажская³

¹*Белорусский государственный медицинский университет, 220116, Минск, Беларусь
KukharenoLV@bsmu.by*

²*Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, 220072, Минск, Беларусь*

³*Республиканский научно-практический центр спорта, 220007, Минск, Беларусь*

В работе методом АСМ определялись морфометрические характеристики тромбоцитов и тромбоцитарных агрегатов, а также локальные вязко-упругие характеристики мембраны кровяных пластинок (локальный модуль упругости, адгезия, жесткость) пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности.

Application of atomic force microscopy to evaluate the morphofunctional state of platelets in patients with end-stage heart failure

L.V. Kukhareno¹, S.A. Chizhik², E.S. Drozd², M.V. Goltsev¹, N.N. Maroz-Vadalazhskaya³

¹*Belorussian State Medical University, 220116, Minsk, Belarus
KukharenoLV@bsmu.by*

²*A.V. Luikov heat and mass transfer institute of the National academy of sciences of Belarus, 220072, Minsk, Belarus*

³*Republican Scientific Center of Sports, 220007, Minsk, Belarus*

In the study, the morphometric characteristics of platelets and platelet aggregates, as well as local viscoelastic characteristics of platelet membrane (local modulus of elasticity, adhesion, stiffness) of patients with end-stage heart failure were investigated by atomic force microscopy.

Изучение морфофункциональных особенностей тромбоцитов с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяет выявить ранние этапы их внутрисосудистой активации, охарактеризовать гемостазиологический статус пациентов, а также контролировать применение фармакологических средств, влияющих на их функции.

Цель данной работы состояла в использовании АСМ для оценки внутрисосудистой активации тромбоцитов, а так же для определения локальных вязко-упругих характеристик мембраны 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 протамином.

Исследование упругих свойств тромбоцитов осуществлялось при помощи специализированного экспериментального комплекса, состоящего 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). 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 кантилеров ($k=29-57$ Н/м, Nanosensors GmbH). Наряду с топографией поверхности поточно определялись локальная жесткость и адгезия тромбоцитов методом Pulse Force Modulation с использованием стандартных кремниевых кантилеров 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.

Циркулирующие в кровотоке тромбоциты при отсутствии патологических активирующих факторов интактны, практически не взаимодействуют друг с другом, с другими клетками крови и эндотелием сосудов и имеют дисковидную или овальную форму. С помощью АСМ показано, что тромбоциты пациентов на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина имели дисковидную форму с диаметром 1,8 – 2,5 мкм и высотой 400 - 550 нм (Рисунок 1).

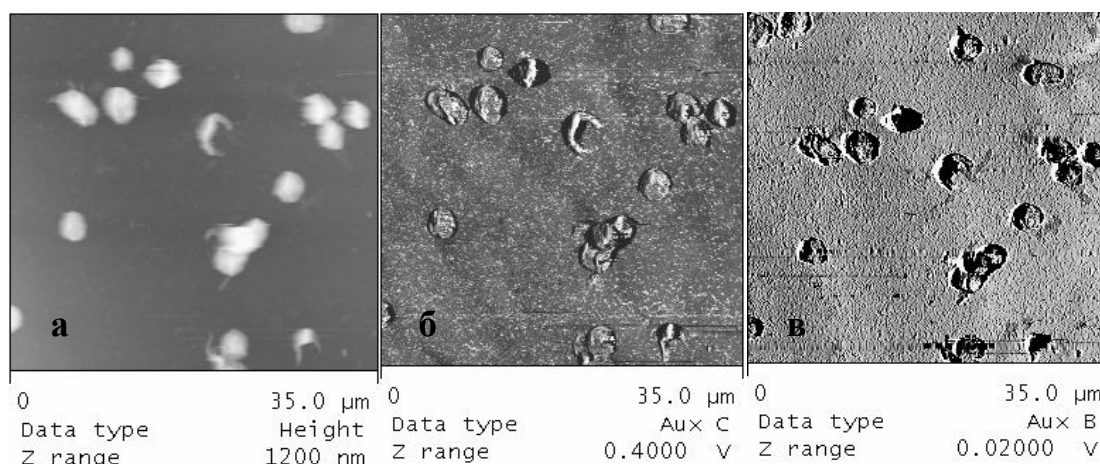


Рисунок 1. АСМ-изображения тромбоцитов пациента с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности на этапе интраоперационного исследования до введения гепарина: а - топография; б - контраст адгезионных сил; в - контраст упругих сил.

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. Визуализировано 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.

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).