

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ

© 2016 г. Ю.С. Нагорнов, Р.А. Пахомова*

Тольяттинский государственный университет, 445667, Тольятти Самарской области, ул. Белорусская, 14б;

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

E-mail: Nagornov.Yuri@gmail.com

Поступила в редакцию 13.11.15 г.

На основе биомеханической модели эритроцита и данных атомно-силовой микроскопии проведен расчет внутриклеточного давления эритроцитов. Получена зависимость внутриклеточного давления от морфологии модели эритроцита. Предложен способ оценки внутриклеточного давления эритроцитов на основе численного моделирования и данных атомно-силовой микроскопии скана эритроцитов, который предполагает сравнение экспериментальных данных с результатами численного расчета. Результаты расчетов применены к данным по атомно-силовой микроскопии эритроцитов экспериментальных животных – карликовых домашних свиней при механической желтухе разной степени тяжести и в норме. Показано, что с ростом степени заболевания и концентрации билирубина в крови происходит нарушение мембраны эритроцитов, в среднем увеличение их объема и существенное изменение внутриклеточного давления по отношению к показателю в норме, так с увеличением концентрации билирубина от 5 до 96 мкмоль/л происходит увеличение внутриклеточного давления с 0 до 2,2 кПа. Исследование поверхности мембраны эритроцитов с высоким разрешением атомно-силового микроскопа показало, что при повышении концентрации билирубина в крови происходит разрушение мембраны эритроцитов, которое проявляется в наличии нарушений и увеличении длины разрывов мембраны.

Ключевые слова: мембрана эритроцитов, внутриклеточное давление, атомно-силовая микроскопия.

Процессы регуляции ионного обмена и объема эритроцитов представляют собой важную фундаментальную задачу современной биохимии и биофизики [1–5]. В результате работы ионных каналов в клетке возникает асимметрия в распределении концентраций ионов внутри и вне клетки, что обеспечивает поддержание ее постоянного объема. Создаваемое обменными процессами осмотическое давление ΔP в клетке эритроцита вызывает деформацию оболочки. Возникающая из-за ионного взаимодействия механическая энергия липидного бислоя стремится принять минимальное значение и формирует морфологию эритроцита [1,2,6,7].

В работах [3,8] был выполнен численный расчет уравнений ионного обмена эритроцитов, который позволил учесть взаимодействие обменных процессов при изменении объема эритроцита. Модель показала хорошее согласие с экспериментальными данными при увеличении объема эритроцита после обработки эритроцитов амфотерицином В и вызванного этим уве-

личением проницаемости для ионов, а также при увеличении объема по причине уменьшения осмотичности среды. Кроме этого, было показано [3], что в регуляции объема эритроцита также принимает участие реактивное давление ΔP_r , которое является дополнительным к осмотическому давлению ΔP и возникает вследствие наличия упругих свойств мембраны.

В случае проведения измерений при помощи атомно-силового микроскопа наиболее часто параметры эритроцита определяются на мазке крови на стекле, где эритроциты расположены тонким слоем и находятся в воздушной среде. Как было показано в работах [9–14], на воздухе происходит выход водного раствора из эритроцита и, соответственно, уменьшение его объема в 6–10 раз. Поскольку при АСМ-измерениях в процессе высушивания образца с эритроцитами водная среда исчезает, возникает большой градиент ΔP и потеря его массы и объема. При этом форма эритроцита остается неизменной и определяется состоянием его мембраны [9–14], т.е. реактивным давлением ΔP_r .

Сокращение: АСМ – атомно-силовая микроскопия.

В настоящей работе ставится задача оценки величины реактивного давления ΔP_r мембраны на регуляцию объема эритроцита при проведении измерений методами АСМ на воздухе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные исследования методами АСМ проведены на карликовых домашних свиньях при механической желтухе. Это заболевание характеризуется тем, что при повышении класса заболевания в крови животных растет концентрация билирубина, который распространяется по организму и приводит к накоплению в печени и других органах [15].

Экспериментальные исследования проведены на четырех карликовых домашних свиньях одного пола массой $7,05 \pm 0,3$ кг. Всех животных содержали в виварии на стандартном полноценном питании со свободным доступом к пище и воде. У трех особей была создана модель обтурационного холестаза. Все исследования проводили в одно и то же время суток с 8 до 12 ч с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Соответственно, животных выводили из опыта декапитацией под эфирным наркозом.

Создание модели механической желтухи проводили по следующей методике. Животных выдерживали в условиях вивария в течение 10 дней. Моделирование механической желтухи проводили под общим обезболиванием (тиопенталовый наркоз). Животных фиксировали к экспериментальному столику в положении на спине, после подготовки и обработки операционного поля выполняли верхнесрединную лапаротомию. После ревизии брюшной полости и печени выделяли общий желчный проток в супрадуоденальном отделе и пересекали его. Вводили Т-образный дренаж (для более надежной фиксации дренажа в холедохе), свободный конец дренажа выводили на холку животного. Для создания механической желтухи конец последнего закрывали крышкой, для создания декомпрессии восстанавливали отток желчи [15]. При этом концентрация билирубина в крови животных составляла в норме 3–5 мкмоль/л, при механической желтухе класса А – 10,17 мкмоль/л, при механической желтухе класса В – 35,3 мкмоль/л, класса С – 96 мкмоль/л.

Концентрацию билирубина определяли биохимически методом Йендрашика–Грофа [16], основанном на реакции билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой, 3,5-дихлорфенилдиазонием или 2,4-дихлоранилином с об-

разованием окрашенного продукта (диазобилирубина). Интенсивность окраски раствора конечного продукта измеряли фотометрически. Определение активности гамма-глутамилтрансферазы определяли колориметрическим кинетическим методом (с периодом прединкубации) с использованием субстрата гамма-глутамил-3-карбоксо-4-нитроанилида.

Мазки крови исследовали на атомно-силовом микроскопе Integra Aura (NT-MDT, Россия). Сканирование поверхности образцов проводили в полуконтактном, а при измерении сил адгезии – в контактном режимах на воздухе. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) с жесткостью 7,2 нН/нм и резонансной частотой 190 кГц, при этом длина кантилевера составляла 125 мкм, ширина – 30 мкм, толщина – 2 мкм. В работе использовали программное обеспечение АСМ-микроскопа NOVA для получения изображений и программу Image Analysis для анализа изображений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При механической желтухе происходит разрушение клеток печени и изменения в иммунном ответе организма [15], что проявляется в повышении содержания фермента гамма-глутамилтранспептидазы, которое при норме до 32 ед./литр вырастает с повышением класса заболевания до 41; 103 и 350 ед./литр соответственно, что свидетельствует о цитолизе гепатоцитов и постепенном разрушении печени в целом.

Для анализа сканов использовали метод мазка крови, на котором выбирали только отдельные эритроциты, чтобы исключить механическое воздействие соседних клеток и искажение их морфологии. Число клеток для анализа варьировало в пределах 50–60 эритроцитов для каждого образца, при этом каждый исследуемый эритроцит был просканирован как минимум дважды: первый раз – клетка целиком, второй раз – мембрана клетки для анализа ее состояния. На АСМ-сканах эритроцитов видно, что с ростом степени заболевания происходит рост как количества, так и размеров нарушений в мембране (рис. 1). На рис. 2 показаны нормированные распределения числа разрушений в мембране эритроцитов по их размерам. Видно, что нарушения с размерами до 50 нм в основном встречаются в эритроцитах в норме, нарушения с размерами 50–100 нм преимущественно возникают в эритроцитах при механической желтухе класса А и В, а с размерами 100–200 нм – класса В и С. Распределения

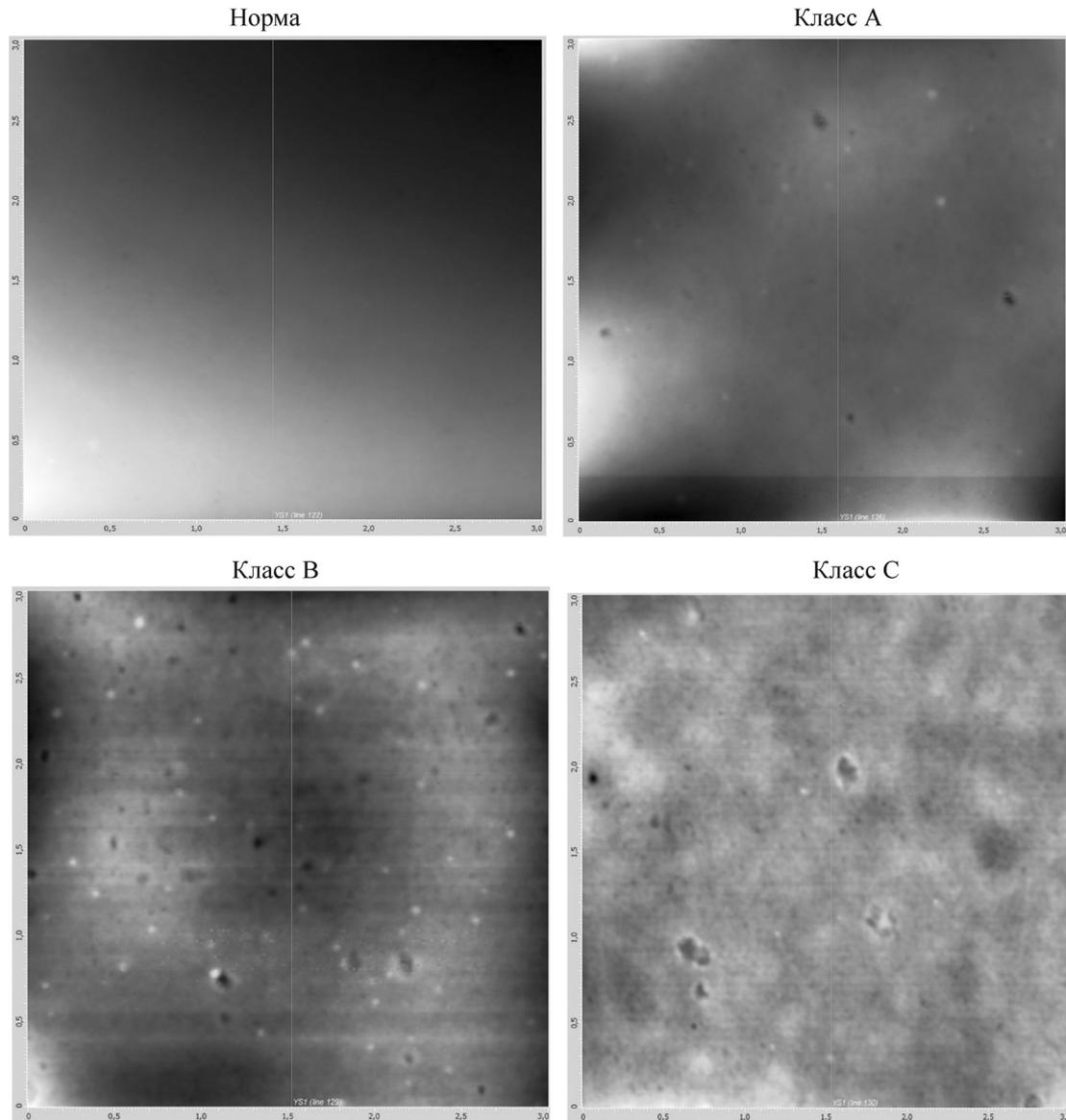


Рис. 1. Сканы поверхности мембраны эритроцита, полученные при помощи АСМ с размером изображений 3×3 мкм, для эритроцитов с различным уровнем механической желтухи и в норме.

нарушений в мембране по размерам показывают, что максимум для заболевания класса А (75–100 нм) находится правее, чем максимум для заболевания класса В (50–75 нм). С другой стороны, количество нарушений в мембране эритроцита при желтухе класса А в 3,5 раза меньше, чем при желтухе класса В (в среднем 9 разрывов мембраны на эритроцит против 2,4 при классе А). Кроме этого, распределение длин разрывов при классе А ограничено величиной 110 нм, а при классе В – 175 нм. На рис. 1 также хорошо видно, что количество нарушений в мембране при классе В существенно больше, чем при классе А.

На рис. 3 показаны вертикальные срезы трехмерного изображения морфологии эритроцита, полученные при помощи АСМ-микроскопии. Видно, что, во-первых, морфология изменяется так, что прогиб мембраны в центре уменьшается и происходит увеличение объема эритроцита; во-вторых, площадь под эритроцитом практически не изменяется, что подтверждается статистикой измерений площади под эритроцитами (табл. 1). На рис. 3 линейные размеры эритроцитов подобраны близкими, чтобы показать изменение прогиба мембраны. При этом срез мембраны эритроцита при механической желтухе класса В находится между срезами эритроцитов класса А и С, но не по-

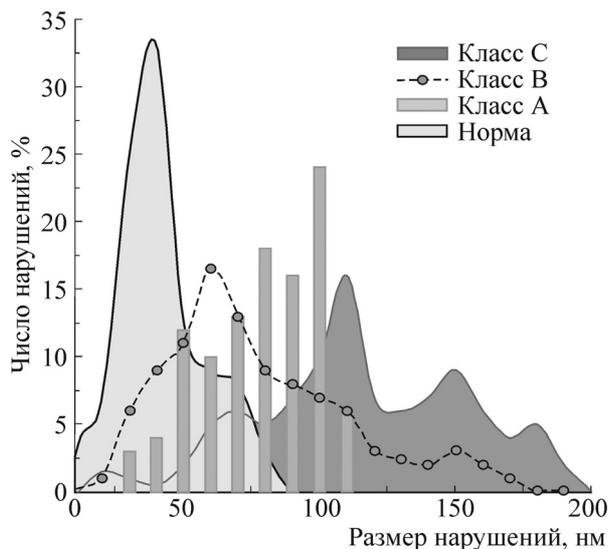


Рис. 2. Распределение нормированного числа нарушений в мембране по линейным размерам для мембран эритроцитов с различным уровнем механической желтухи и в норме.

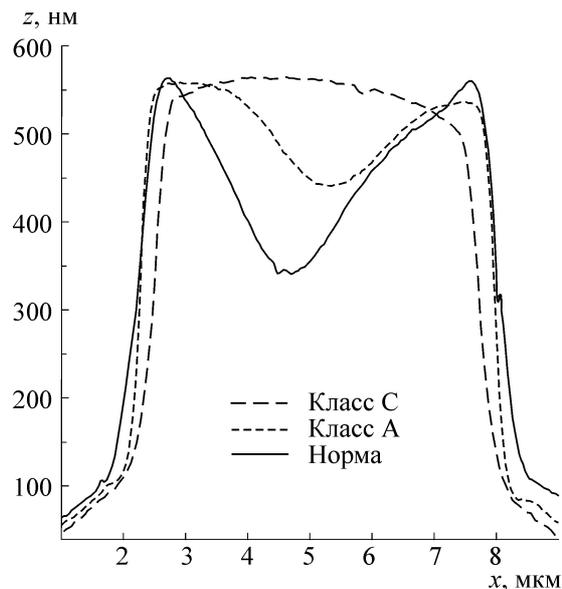


Рис. 3. Полученный при помощи АСМ поперечный срез трехмерного изображения морфологии эритроцита при разной степени механической желтухи и в норме.

казан на рисунке, поскольку создает множество пересечений с соседними графиками.

Из рис. 3 видно, что меняется не только величина прогиба мембраны, но и форма мембраны – уменьшается острровершинность края эритроцита, пропадает линейный участок между центром эритроцита и его краем, координаты максимума на срезе мембраны становятся размытыми и при механической желтухе класса С прогиб исчезает полностью, а поверхность мембраны становится выпуклой. Исследование шероховатости поверхности сканов с эритроцитами с использованием встроенного программного обеспечения Nova АСМ-микроскопа показало, что с ростом степени заболевания средняя шероховатость уменьшается с 40–44 до 26–30 нм, а дисперсия монотонно уменьшается со 112 до 84 нм². Для анализа шероховатости брали только область мембраны эритроцита так, чтобы края эритроцита не попадали в область анализа. Данные по шероховатости косвенно подтверждают уменьшение в среднем

островершинности мембран эритроцитов, хотя и зависят также и от других факторов, таких как скорость сканирования, радиус острия кантилевера, наличие шумов при сканировании и т.д. В процессе проведения измерений на АСМ-микроскопе все указанные факторы были выбраны одинаковыми, что не исключает их влияния на результаты измерений.

В табл. 1 приведены средние величины площади и объема эритроцита по измерениям на АСМ-микроскопе. Видно, что средняя площадь эритроцита практически не изменяется, в то время как объем эритроцитов существенно растет. На рис. 4 представлены гистограммы распределения эритроцитов по объему, который вычислялся как разница объема под фигурой эритроцита и объема под плоскостью, на которой лежит эритроцит. Для упрощения анализа данных гистограммы на рис. 4 представлены как функции сплайна по трем соседним точкам. Видно, что значения объемов в норме

Таблица 1. Экспериментальные данные атомно-силовой микроскопии эритроцитов при разной степени механической желтухи и в норме, а также результаты расчетов внутриклеточного давления

Степень механической желтухи	Площадь эритроцитов, мкм ²	Объем эритроцитов, мкм ³	Отношение объема к объему в норме	Внутриклеточное давление, кПа
Норма	25,0 ± 2,2	7,5 ± 2,0	1,00 ± 0,07	0
Класс А	24,7 ± 2,4	8,8 ± 1,3	1,07 ± 0,09	0,8
Класс В	25,4 ± 2,7	10,2 ± 1,9	1,15 ± 0,11	1,6
Класс С	26,7 ± 2,9	12,3 ± 2,6	1,22 ± 0,16	2,2

лежат в диапазоне 5–10 мкм³, что на порядок меньше показателя объема эритроцита в физиологическом растворе. Измерение методами АСМ проходили в воздушной среде, поэтому эритроцит терял до 70–80% массы и объема из-за потери воды.

При сравнении гистограмм распределения объемов эритроцитов для механической желтухи с различной степенью заболевания видно, что происходит увеличение среднего объема с ростом степени заболевания (рис. 4). При этом для класса С происходит также существенное увеличение полуширины распределения, что, вероятно, обусловлено разрушением мембраны эритроцитов (рис. 2). Интересно, что распределения объемов эритроцитов по размерам для разных степеней заболевания пересекаются в относительно небольшом участке 7–10 мкм³ (рис. 4), в то время как распределения площадей оснований эритроцитов лежат строго в одном диапазоне 19,5–33,0 мкм², а среднее значение немного изменяется только при механической желтухе класса С (табл. 1). Диаметр эритроцитов лежит в диапазоне 7,0–8,7 мкм как для эритроцитов в норме, так и в случае механической желтухи классов А, В и С с небольшим увеличением среднего значения диаметра для класс С.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для объяснения наблюдаемых явлений увеличения объема эритроцитов рассмотрим вопросы взаимосвязи объема с работой ионных насосов в мембране. Известно [3–6,8], что система ионных насосов и каналов в мембране клетки (Na⁺,K⁺-насос, Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы) обеспечивает заданный объем клетки и его стабилизацию. Перенос ионов осуществляется при помощи ферментов аденозинтрифосфатаз (класса гидролаз), катализирующих отщепление от аденозинтрифосфорной кислоты одного или двух остатков фосфорной кислоты. АТФаза белков плазматических мембран осуществляет АТФ-зависимый трансмембранный перенос Na⁺ и K⁺ ионов в клетках, что обеспечивает поддержание электрохимического и осмотического градиентов одновалентных ионов, необходимых для нормального функционирования клеток.

В результате работы ионных каналов в клетке возникает асимметрия в распределении концентраций ионов внутри и вне клетки, что обеспечивает поддержание ее постоянного объема. Создаваемое обменными процессами осмотическое давление в клетке эритроцита вызывает деформацию оболочки. При этом мор-

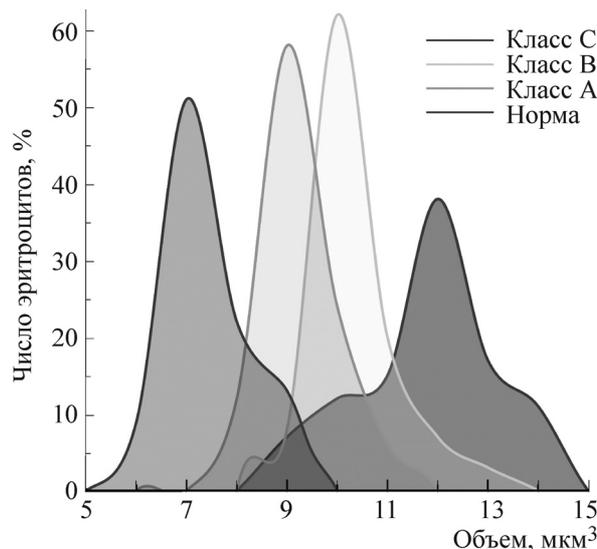


Рис. 4. Гистограммы распределения эритроцитов по величине их объема, вычисленного по данным АСМ мазков крови животных в норме, а также при заболевании механической желтухой класса А, В и С. Точки на рисунке соединены сплайн-линией.

фология эритроцита задается липидным бислоем [1,2,7], что определяется внутренними силами, возникающими вследствие построения слоя фосфолипидов неполярными концами внутрь слоя. Возникающая из-за ионного взаимодействия механическая энергия липидного бислоя стремится принять минимальное значение и формирует морфологию эритроцита [1,2].

Для расчета влияния ионных насосов на регуляцию объема эритроцита составляют систему уравнений [3–6,8], которая включает потоки ионов и поток воды. При этом известно [3,8], что основной вклад в регуляцию объема эритроцитов человека вносят катионы калия и натрия, а также анионы хлора и гидрокарбоната. Кинетика внутриклеточных концентраций калия и натрия описывается уравнениями, которые учитывают активный транспорт этих катионов Na⁺,K⁺-АТФазой и пассивный поток через мембрану по градиенту концентрации, задается следующей системой уравнений [3]:

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} \left(C_{K^+} \frac{V}{V_0} \right) = 2 \vartheta_{Na,K-ATP} + J_K, \\ \frac{d}{dt} \left(C_{Na^+} \frac{V}{V_0} \right) = -3 \vartheta_{Na,K-ATP} + J_{Na}, \end{cases} \quad (1)$$

где V и V_0 – текущее и физиологически нормальное значение объема эритроцита, C_{K^+} и C_{Na^+} – концентрации соответствующих ионов; $\vartheta_{Na,K-ATP}$ – скорость потребления ионов Na⁺ и K⁺ Na⁺,K⁺-АТФазой; J_K и J_{Na} обозначают пас-

сивные потоки калия и натрия через мембрану эритроцита, описываемые в приближении Гольдмана и зависящие от трансмембранной разности потенциалов и градиента концентраций внутри и вне клетки [3].

Кроме этого, учитывается условие электро-нейтральности внутриклеточного содержимого эритроцита, описываемого через концентрацию ионов Na^+ , K^+ , Cl^- и молекул большого радиуса (гемоглобин, интермедиаты гликолиза и т.д.) со средним зарядом $-0,7$ [3,8].

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left(\frac{V}{V_0} \right) &= J_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{SP_f}{V_0} \vartheta_{\text{H}_2\text{O}} \Delta C = \\ &= \frac{SP_f}{V_0} \vartheta_{\text{H}_2\text{O}} \frac{\Delta P - \Delta P_f}{RT}, \end{aligned} \quad (2)$$

где поток воды $J_{\text{H}_2\text{O}}$ пропорционален разности концентраций ΔC осмотически активных ионов внутри и снаружи мембраны эритроцита, которая выражается через осмотическое давление ΔP , реактивное давление мембраны ΔP_f и тепловой потенциал RT ; S – площадь мембраны; $\vartheta_{\text{H}_2\text{O}}$ – молярный объем воды; P_f – осмотическая проницаемость мембраны для воды.

В работах [3,8] был выполнен численный расчет уравнений (1) и (2) для учета упругого воздействия оболочки на обменные процессы и изменение объема эритроцита. Решение полученной системы уравнений учитывало взаимодействие всех процессов при вычислении изменения объема эритроцита и кинетики ионного обмена. В случае проведения измерений при помощи АСМ-микроскопа параметры эритроцита определяются на мазке крови на стекле в воздушной среде. Как было показано в работах [9–14,17,18], на воздухе происходит выход воды из эритроцита и, соответственно, уменьшение его объема в 4–10 раз. Поскольку при АСМ-измерениях в процессе высушивания образца с эритроцитами водная среда исчезает, возникает большой градиент ΔP , в соответствии с формулой (2) происходит выход воды из эритроцита и потеря его массы и объема. При этом форма эритроцита остается неизменной и определяется состоянием его мембраны [9–14,17,18] или реактивным давлением ΔP_f . Из формы уравнения (2) видно, что в зависимости от величины ΔP_f стационарное значение объема, установившегося после переходного процесса выхода раствора из эритроцита, будет меняться.

На воздухе форма эритроцита не меняется, однако его объем на 95–99% заполнен гемо-

глобином [10–12,19], в то время как в работах [3,8] при расчетах предполагалось, что максимальный процент содержания гемоглобина составляет 80%. В результате соотношение объем–давление в термодинамической системе, в которой происходит существенное влияние гемоглобина на мембрану эритроцита, будет меняться. В работе [3] был изучен процесс расширения эритроцита под действием внутреннего давления, которое менялось в широком диапазоне – от единиц паскалей до 5 кПа. Расширение до 40–60% по отношению к начальному объему происходило под действием небольшого давления до 2 Па за счет изменения формы, затем модель эритроцита приобретала форму шара и расширение происходило за счет растяжения мембраны, что требует на три порядка большего давления. При этом моделирование уменьшения объема из-за обезвоживания или под действием сил сжатия выполнено не было. И наконец, при экспериментальном исследовании методами АСМ происходит осаждение эритроцитов на поверхность, их адгезия и изменение формы под действием сил адгезии и тяжести, что также необходимо учитывать при моделировании.

С одной стороны, реактивное давление мембраны эритроцита ΔP_f будет зависеть от состояния мембраны, с другой стороны, морфология эритроцита будет зависеть от биомеханики его мембраны [1,2,7,13–20]. Таким образом, для решения обратной задачи определения внутриклеточного давления из данных АСМ необходимо сначала провести численный расчет, в котором задается начальное реактивное давление ΔP_f , и получить зависимости морфологии эритроцита от его величины на воздухе. Численный расчет зависимости морфологии эритроцита от внутриклеточного давления выполнен в работе [21]. Результаты расчетов приведены в табл. 2 и на рис. 5, из которого видно, что с ростом внешнего давления происходит небольшое расширение модели эритроцита и существенный прогиб в центре мембраны, что соответствует экспериментальным данным геометрии среза эритроцита по данным АСМ (рис. 3). Необходимо отметить, что при пропорциональном увеличении или уменьшении размеров модели эритроцита установившиеся значения давления внутри клетки не изменялись. Данный факт соответствует формулам (1) и (2), где используется отношение V/V_0 . По этой же причине результаты расчетов представлены в табл. 2 в виде зависимости отношения объемов V/V_0 от внутриклеточного давления.

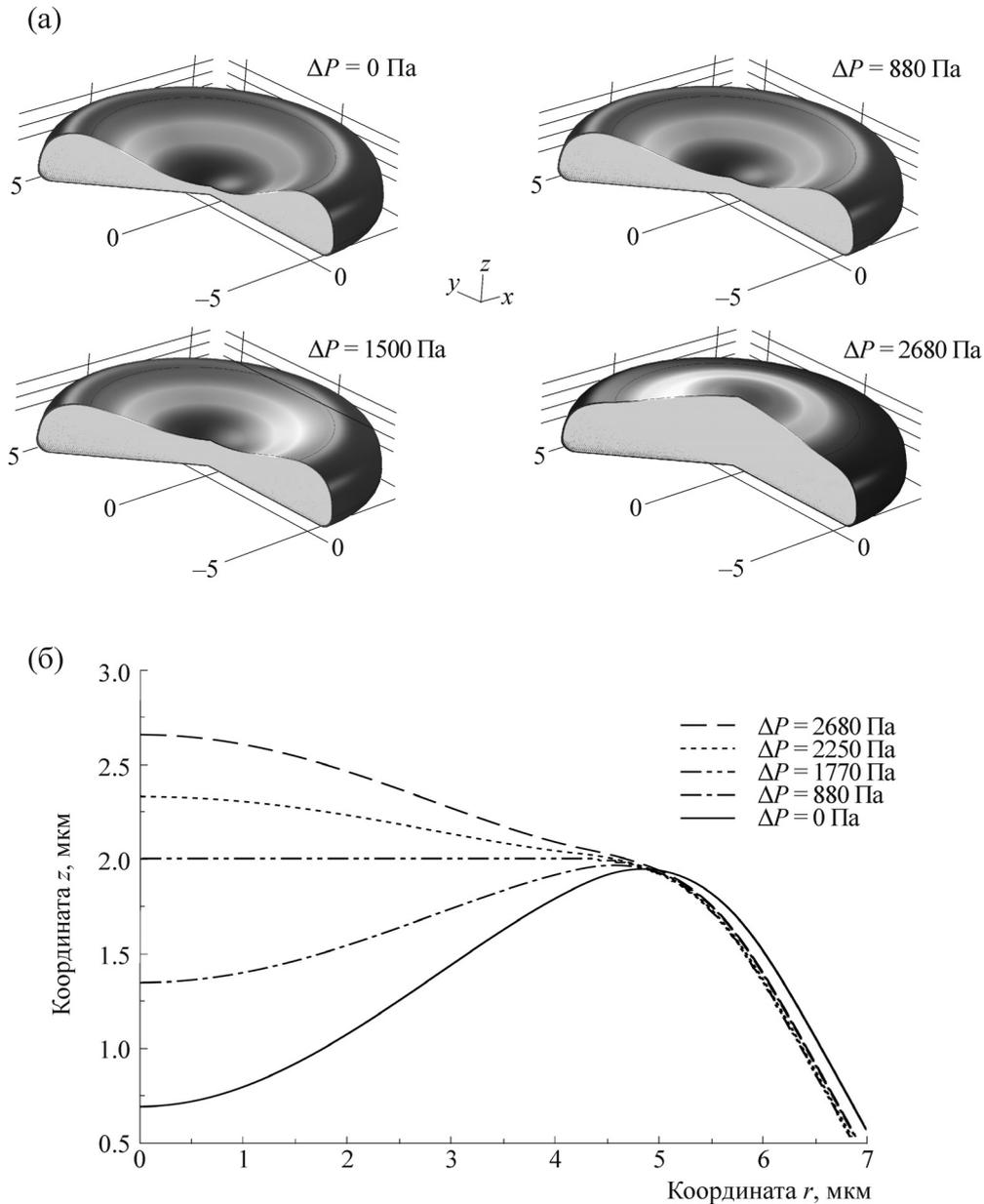


Рис. 5. Зависимость морфологии (сверху) и формы среза (снизу) модели эритроцита от внутриклеточного давления эритроцита. Давление указано на рисунке.

Проведенные расчеты позволяют для эритроцитов, находящихся на воздухе, построить взаимно однозначную зависимость внутриклеточного давления от соотношения объема эритроцита к объему в норме. Используя метод наименьших квадратов и аппроксимируя данные, приведенные в табл. 2, сплайном второго порядка, получаем следующую зависимость для внутриклеточного давления:

$$\Delta P_r [\text{кПа}] = 9,1 \left(\frac{V}{V_0} - 1 \right) + 1,054 \left(\frac{V}{V_0} - 1 \right)^2. \quad (3)$$

Полученная расчетная зависимость внутриклеточного давления от изменения объема позволяет провести расчет ΔP_r для эритроцитов, чья морфология измерена на АСМ-микроскопе. Применение формулы (3) к данным АСМ эритроцитов вызывает необходимость определения начального значения V_0 для каждого эритроцита в выборке на скане. Поскольку невозможно определить начальный объем эритроцита до изменения его морфологии, процесс нормировки естественно выполнить для эритроцитов того же биологического вида и возраста, что и эритроциты исследуемого объекта. При этом вна-

Таблица 2. Результаты численного расчета изменения объема эритроцита от внутриклеточного давления

Внутриклеточное давление эритроцита, Па	Отношение объема к объему в норме, V/V_0
0	1,000
440	1,048
880	1,096
1330	1,144
1770	1,192
2250	1,240
2680	1,288
3240	1,337
3660	1,386

чале необходимо провести измерения скана мазка в норме, получить распределение выборки эритроцитов по объему и площади. Далее при расчете внутриклеточного давления для каждого эритроцита в выборке с измененной морфологией необходимо проводить нормировку на площадь S , занимаемую эритроцитом на скане. В соответствии с расчетами (рис. 5) площадь эритроцита при изменении давления внутри клетки практически не изменяется, что позволяет привести каждый исследуемый эритроцит к его площади. В результате в формуле (3) вместо выражения V/V_0 было использовано выражение:

$$\frac{V}{V_0} = \frac{V/S}{V_0/S_0}, \quad (4)$$

при условии $S = S_0$.

Результаты расчетов внутриклеточного давления для эритроцитов при механической желтухе представлены в табл. 1, где видно, что происходит монотонное увеличение внутриклеточного давления с 0 для нормы до 2,2 кПа для класса С. Расчет по формулам (3) и (4) проводили для усредненных значений объемов, поэтому разброс вычисленных значений внутриклеточного давления в табл. 1 не показан.

Полученные расчетные и экспериментальные данные позволяют предположить, что рост внутриклеточного давления эритроцитов обусловлен постепенным разрушением мембраны эритроцитов, изменением работы ионных каналов под действием билирубина, а также изменением упругих свойств липидного бислоя из-за разрывов в мембране. Внутриклеточное давление эритроцитов может являться показа-

телем состояния мембраны клеток крови и клеток печени при механической желтухе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе проведено исследование мембраны эритроцитов карликовых домашних свиней, которое показало разрушение мембраны при механической желтухе с ростом концентрации билирубина в крови. На основе данных атомно-силовой микроскопии проведены измерения размеров эритроцитов в норме и при механической желтухе класса А, В и С. Показано, что с ростом воздействия билирубина на мембрану происходит изменение морфологии эритроцита, уменьшение центрального изгиба мембраны и, соответственно, увеличение объема эритроцита. Интересно, что при этом изменение площади оснований эритроцитов практически не происходит.

Была предложена модель расчета внутриклеточного давления эритроцитов, находящихся в воздушной атмосфере с содержанием гемоглобина в эритроците более 95%. На основании экспериментальных АСМ-данных и расчетных данных модели был проведен расчет внутриклеточного давления в эритроцитах при разной степени механической желтухи. Полученные результаты показали, что внутриклеточное давление повышается с ростом концентрации билирубина в крови и может являться показателем состояния мембраны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.574.21.0025, уникальный идентификатор соглашения – RFMEFI57414X0025).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Z. C. Tu and Z. C. Ou-Yang, *J. Comput. Theor. Nanosci.* **5**, 422 (2008).
2. N. Hiroyoshi, O. Masahiro, and Z. C. Ou-Yang, *Phys. Rev. E* **54** (3), 2816 (1996).
3. Н. В. Калягина, М. В. Мартынов и Ф. И. Атауллаханов, *Биол. мембраны* **30** (2), 115 (2013).
4. V. L. Lew and R. M. Bookchin, *J. Membr. Biol.* **92**, 57 (1986).
5. M. V. Martinov, V. M. Vitvitsky, and F. I. Ataulakhov, *Biophys. Chem.* **80** (3), 199 (1999).
6. И. Ивенс и Р. Скейлак, *Механика и термодинамика биологических мембран* (Мир, Москва, 1982).
7. Z. C. Ou-Yang and H. Wolfgang, *Phys. Rev. A* **39** (10), 5280 (1989).

8. Ф. И. Атауллаханов, Н. О. Корунова и И. С. Спиридонов, Биол. мембраны **26** (3), 163 (2009).
9. Е. С. Дрозд, С. А. Чижик и Е. Э. Константинова, Росс. журн. биомеханики **13** (4), 22 (2009).
10. R. Nowakowski and P. Luckham, Surface and Interface Analysis **33** (2), 118 (2002).
11. I. Dulinska and M. Targosz, J. Biochem. Biophys. Meth. **66** (1–3), 1 (2006).
12. Ю. Ю. Гущина, С. Н. Плескова и М. Б. Звонкова, Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, № 1, 48 (2005).
13. M. O'Reilly, L. McDonnell, and J. O'Mullane, Ultra-microscopy **86** (1–2), 107 (2001).
14. Yu. S. Nagornov, Appl. Cell Biol. **3** (1), 1 (2014).
15. Ю. С. Винник, Р. А. Пахомова, Е. В. Серова и др., Сибирский мед. журн. **27** (3), 116 (2012).
16. D. Watson, Clin. Chem. **7**, 603 (1961).
17. Ю. С. Нагорнов, Росс. журн. биомеханики **17** (3), 112 (2013).
18. Ю. С. Нагорнов и И. В. Жилиев, Математическая морфология. Электронный математ. и биомед. журн. **12** (1), (2013).
19. M. Asghari-Khiavi, B. R. Wood, A. Mechler, et al., Analyst **135**, 525 (2010).
20. Т. Р. Галимзянов, Р. Ю. Молотковский, Б. Б. Хейфец и С. А. Акимов, Письма в ЖЭТФ **96** (10), 756 (2012).
21. Ю. С. Нагорнов, Росс. журн. биомеханики. **19** (4), (2015).

Atomic Force Microscopy of the Membrane of Erythrocytes at Obstructive Jaundice

Yu.S. Nagornov* and R.A. Pahomova**

*Togliatti State University, ul. Belarusskaya 14b, Togliatti, Samara Region, 445667 Russia

**Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, ul. Partizana Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

On the basis of a biomechanical model of erythrocyte and data obtained using atomic force microscopy we calculated intracellular pressure of erythrocytes. The dependence of intracellular pressure on the morphology of erythrocyte was obtained. We have proposed a method of estimating intracellular pressure of erythrocytes based on numerical modeling and data obtained after imaging of red blood cells using atomic force microscopy, stipulating a comparison of the experimental data to the results of numerical calculation. The calculation results are applied to the data obtained using atomic force microscopy after imaging of erythrocytes in experimental animals – dwarf domestic pigs with different degrees of obstructive jaundice and normal. It has been shown that with the progress of the disease and the increased bilirubin level in the blood, erythrocyte membrane is affected: on the average an increase in erythrocyte volume and a significant intracellular pressure change. So, when bilirubin level rises from 5 to 96 $\mu\text{mol/L}$, intracellular pressure elevates from 0 to 2.2 kPa. The investigation of the images of the surface of the erythrocyte membrane using high resolution atomic force microscope showed that when bilirubin level increases in the blood, the disruption of the erythrocyte membrane occurs releasing in the presence of disturbances increasing membrane rupture duration.

Key words: erythrocyte membrane, intracellular pressure, atomic force microscopy