

**ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ ПРОБ КРОВИ  
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И СТРУКТУРЫ  
МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

Белоусова О.Д.<sup>1</sup>, Толмачев И.А.<sup>1</sup>, Гайдаш А.А.<sup>1</sup>,  
Левичев В.В.<sup>2</sup>, Жуков М.В.<sup>2</sup>, Белоусов И.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*ФГБОУ ВПО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, кафедра судебной медицины (Санкт-Петербург, Загородный пр., дом 47., тел 8-(812)-316-57-66, [7991866@gmail.com](mailto:7991866@gmail.com))*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский Национальный Исследовательский Университет Информационных технологий, механики и оптики, кафедра нанотехнологий и материаловедения (Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д.49., тел. 8-(812)- 498-10-65, [levichev\\_vadim@mail.ru](mailto:levichev_vadim@mail.ru))*

**Резюме**

В статье представлены результаты сравнительных исследований различных методов пробоподготовки крови крыс для проведения атомно-силовой микроскопии эритроцитов. Продемонстрированы результаты различных вариантов подготовки проб крови для выполнения прецизионных исследований, наиболее часто описываемые в литературе. Показано, что оптимальным, позволяющим исследовать не только размеры эритроцитов (диаметр, высоту и глубину центральной впадины диска), но и наноразмерные структуры мембраны (поры в мембране эритроцитов), является метод фиксации мазка крови высушиванием на воздухе.

**Ключевые слова:** мазок крови, подготовка пробы, размеры эритроцитов, атомно-силовая микроскопия, глутаровый альдегид, этиловый спирт.

**ESPECIALLY PREPARATION OF BLOOD SAMPLES  
FOR STUDY OF MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND STRUCTURE OF  
ERYTHROCYTE MEMBRANES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY**

Belousova O.D.<sup>1</sup>, Tolmachev I.A.<sup>1</sup>, Gaidash A.A.<sup>1</sup>,  
Levichev V.V.<sup>2</sup>, Gykov M.V.<sup>2</sup>, Belousov I.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Military medical academy of S.M. Kirov, St.-Petersburg, Department of Forensic  
Medicine*

<sup>2</sup>*Universitet information technologies, mechanics and optics, St.-Petersburg, Department  
of Materials Science and Nanotechnology*

**Summary**

The paper presents results comparative studies of different methods of sample preparation of rat blood for atomic force microscopy of red blood cells. Demonstrated the results of different variants sample preparation of blood of precision studies, the most often described in the literature. It is shown that the best facilitating the investigation of not only the size of red blood cells (diameter, height and depth of the central depression disc), but nanoscale membrane structure (pores in the membrane of red blood cells) is the method of fixing the smear of blood by drying in the air.

**Keywords:** blood smear, sample preparation, the size of red blood cells, atomic force microscopy, glutaraldehyde, ethanol.

**ВВЕДЕНИЕ**

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – один из мощных современных методов исследования морфологии и локальных свойств поверхности биологических объектов с высоким пространственным разрешением, позволяющий исследовать биологические объекты, не используя сложных методов фиксации. Однако способы подготовки образцов для исследования, безусловно, оказывают влияние на морфологические характеристики клетки.

Для судебно-медицинских экспертов наибольший интерес представляют единичные публикации, демонстрирующие эффективность АСМ как аналитического инструмента, применяемого в судебно-медицинской науке и практике [1,2].

Следует отметить, что эритроциты являются очень «деликатными» (мягкими) клетками, что весьма затрудняет их АСМ-изучение без предварительной фиксации [3]. Высушивание, замораживание или фиксация химическими агентами значительно улучшает качество АСМ-изображений эритроцитов и воспроизводимость результатов сканирования мембранной поверхности. Однако эти процедуры сказываются на структурных и механических свойствах клеток [4,5,6].

В доступных литературных источниках приводятся противоречивые данные о способах фиксации, концентрации фиксатора, длительности фиксации при подготовки проб крови для АСМ.

N. Kubo и соавт. (2003) для подготовки образцов отмывали эритроциты в физиологическом растворе с последующей фиксацией в 3% формальдегиде в течение 5 минут [7]. U.G. Hofmann и соавт. (1997) для проведения АСМ исследований подвергали эритроциты химической фиксации с помощью 1% глутарового альдегида, длительность фиксации авторами не указана. Далее эритроциты отмывали один раз в буферном растворе, затем дважды в дистиллированной воде, после чего помещали на предметное стекло и высушивали [5]. O. Nekele и соавт. (2008) использовали глутаровый альдегид той же концентрации, однако методика подготовки образцов отличалась. Мазок крови наносился на стекло, после чего фиксировался в глутаровом альдегиде, с последующим промыванием в растворе фосфатного буфера и повторной фиксации в глутаровом альдегиде в течение 1 минуты [8]. X.L. Ji и соавт. (2005) предлагают использовать для фиксации мазков крови 1% раствор формальдегида или 3% раствор глутарового альдегида [9]. Ряд авторов, для оценки структурных особенностей мембраны эритроцита (наноканалов, эрозий мембраны) наиболее приемлемым способом пробоподготовки, считают фиксацию мазка крови высушиванием на воздухе [1, 2, 10].

**Целью настоящего исследования** явился выбор способа подготовки пробы крови, позволяющий исследовать не только размеры эритроцитов (диаметр, высоту и глубины центральной впадины диска эритроцита), а также наноразмерные структуры мембраны (поры в мембране эритроцитов) при помощи АСМ.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использовали эритроциты крови самцов белых беспородных крыс массой 0,2-0,36 кг (средняя масса составила  $0,248 \pm 0,06$  кг), выращенных и содержавшихся в

клинике экспериментальных животных Военно-медицинской Академии имени С.М. Кирова. Возраст крыс на момент проведения эксперимента составлял 3-4 мес. Забор крови осуществляли из сосудов хвоста.

На проведение исследований получено разрешение локального независимого комитета по вопросам этики при ВМедА имени С.М. Кирова (протокол № 125 от 22.05.2012 г.).

Было использовано два способа приготовления мазков и различные варианты их фиксации:

1) Стандартный способ, при котором мазки из цельной крови готовили на обезжиренных стеклянных подложках (покровных стеклах) и высушивали на воздухе при температуре 24°C в течение 10 мин. Часть мазков (45 мазков крови) тотчас после изготовления были фиксированы на стеклянной подложке или 96% этиловым спиртом (5 мазков) или раствором глутарового альдегида (Panreac, E.U.) (40 мазков) в различных концентрациях (от 0,5% до 2,5%) с различной экспозицией фиксатора (от 30 с до 90 мин). После фиксации раствором глутарового альдегида часть мазков была промыта в этиловом спирте в возрастающих концентрациях (от 30% до 80%), часть образцов промывали в растворе Хенкса (представляет собой раствор неорганических солей кальция и магния, а также глюкозы в очищенной воде), часть – в 0,9% растворе хлорида натрия. Мазки, промытые в растворе Хэнкса и 0,9% растворе хлорида натрия, затем были промыты в этиловом спирте в возрастающих концентрациях (от 30% до 80%). На завершающем этапе химической фиксации мазки крови высушивали на воздухе при температуре окружающего воздуха 24°C.

2) Иммерсионный способ, при котором цельную кровь в количестве 20 мкл помещали в емкости с 2 мл фиксирующей жидкости. В качестве основной фиксирующей жидкости был использован водный раствор глутарового альдегида в концентрациях от 0,5% до 2,5%. Учитывая, что в качестве объемной фазы, используемой в фиксирующих жидкостях для атомно-силовой микроскопии применяют раствор Хенкса и изотонический раствор хлорида натрия, нами изучено влияние каждого из этих компонентов на структурные характеристики эритроцитов. После экспозиции цельной крови в указанных растворах (от 30 с до 90 мин) готовили мазки и высушивали их на воздухе при 24°C в течение 10 мин.

Для исследования образцов использовали атомно-силовой микроскоп (АСМ) INTEGRA AURA («NT MDT», Россия). Сканирование поверхности образцов проводили в полуконтактном режиме на воздухе. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT) жесткостью 7,2 нН/нм, резонансной частотой 190 кГц. Длина кантилевера

составляла 125 мкм, ширина - 30 мкм, толщина - 2 мкм. Обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения «NOVA» для получения изображений и программы «Image Analysis» для анализа полученных результатов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При помощи атомно-силового микроскопа было получено 48 сканов образцов. Полученные изображения выборочно представлены на рисунках 1 – 10.

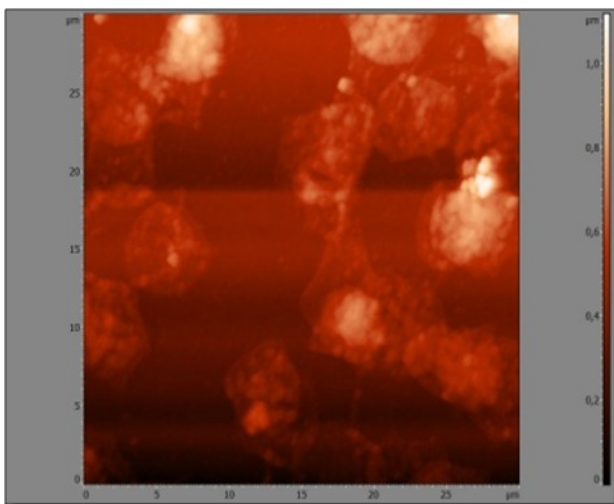


Рис. 1. «Тени» эритроцитов в мазке крови. Фиксации мазка крови в 0,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 15 минут, промывка в растворе Хенкса, проводка в спиртах. Размер изображения 30x30 мкм.

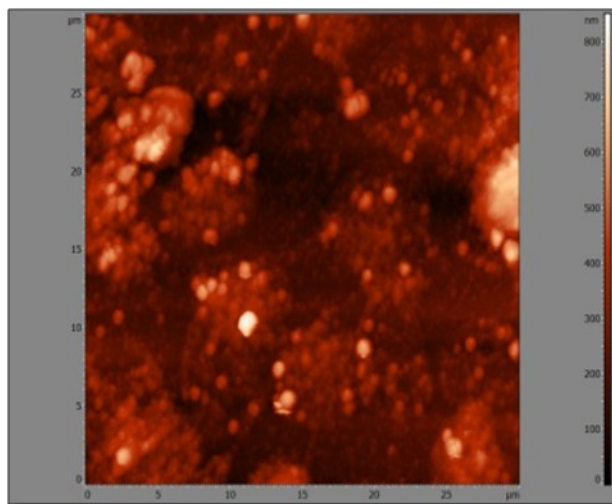


Рис. 2. «Тени» эритроцитов в мазке крови. Фиксации мазка крови в 1,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 1 час, промывка в растворе Хенкса, проводка в спиртах. Размер изображения 30x30 мкм.

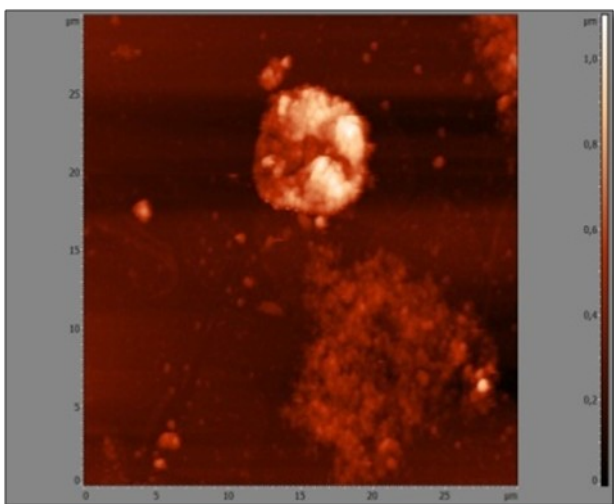


Рис. 3. Эритроцит в мазке крови. Фиксации мазка крови в 1,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 1 час, промывка в 0,9% растворе натрия хлорида, проводка в спиртах. Размер изображения 30x30 мкм.

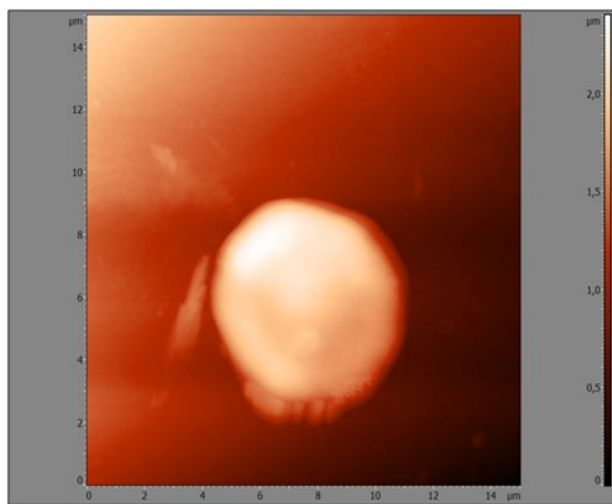


Рис. 4. Эритроцит в мазке крови. Фиксации мазка крови в 1,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 15 минут. Размер изображения 15x15 мкм.

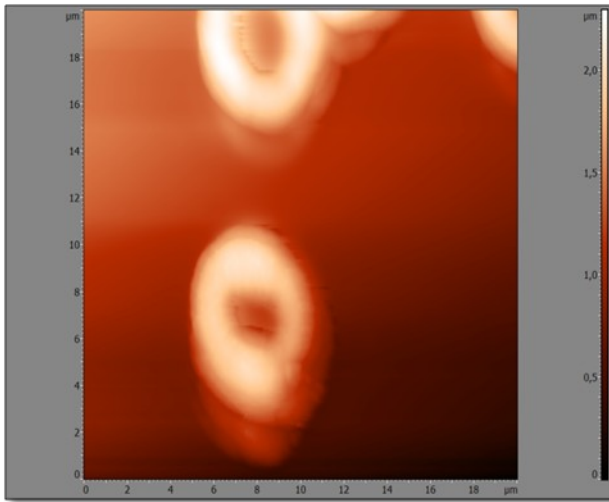


Рис. 5. Эритроциты в мазке крови. Фиксации мазка крови в 0,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 2 минуты, проводка в спиртах. Размер изображения 20x20 мкм.

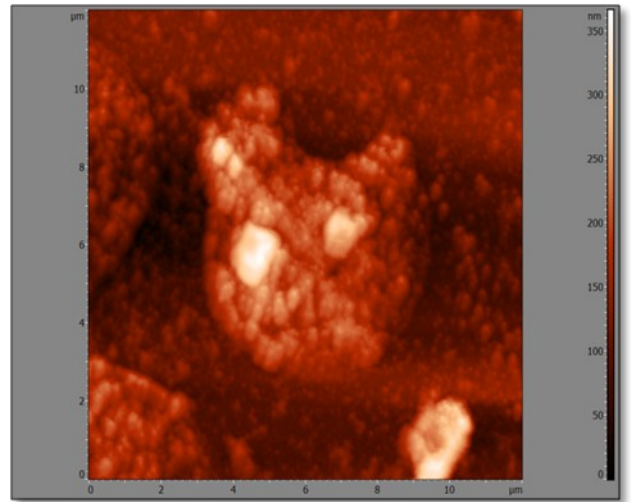


Рис. 6. «Тень» эритроцита в мазке крови. Фиксации мазка крови в 1,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 15 минут, промывка в растворе Хэнкса. Размер изображения 20x20 мкм.

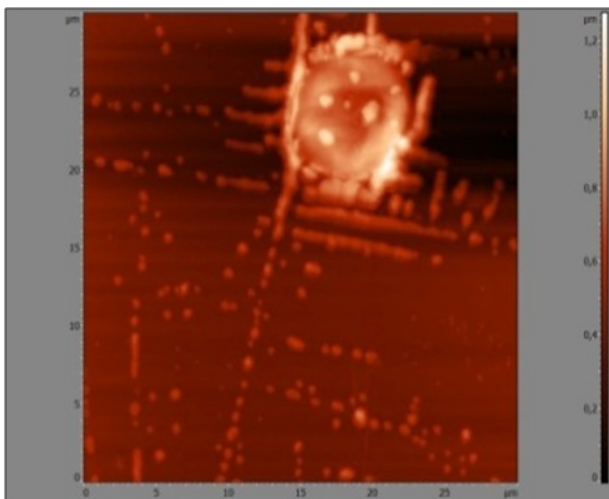


Рис. 7. Эритроцит в мазке крови. Иммерсионный способ фиксации крови в 1,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 15 минут. Размер изображения 30x30 мкм.

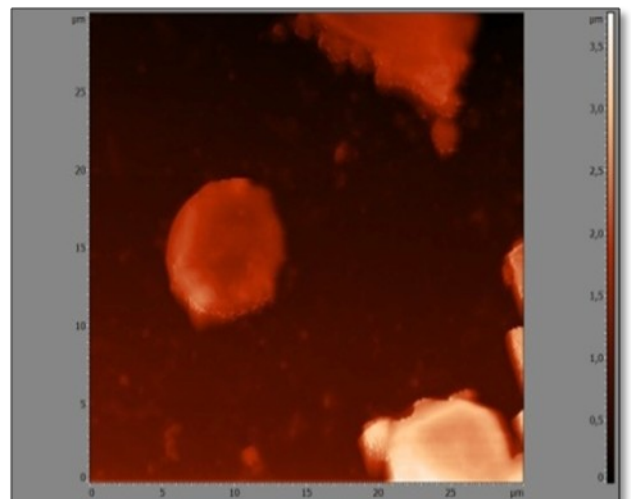


Рис. 8. Эритроциты в мазке крови. Иммерсионный способ фиксации крови в 1,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 1 час. Размер изображения 30x30 мкм.

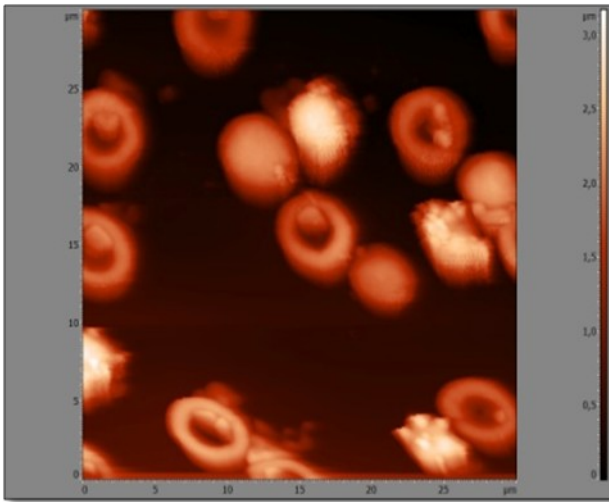


Рис. 9. Эритроциты в мазке крови. Иммерсионный способ фиксации крови в растворе Хэнкса, экспозиция 15 минут. Размер изображения 30х30 мкм.

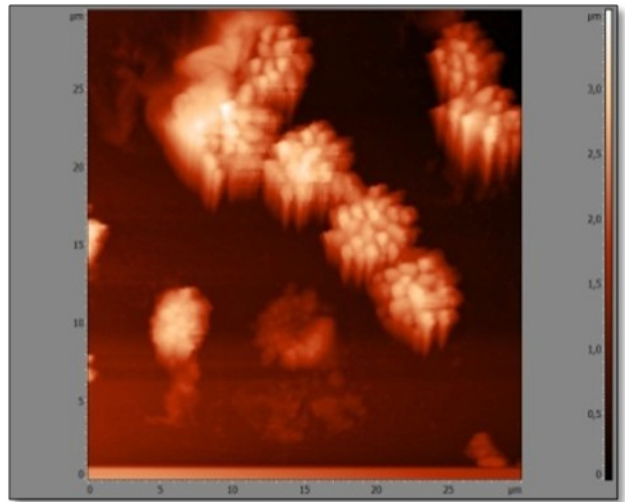


Рис. 10. Эритроциты в мазке крови. Иммерсионный способ фиксации крови в 0,9% растворе натрия хлорида, экспозиция 15 минут. Размер изображения 30х30 мкм.

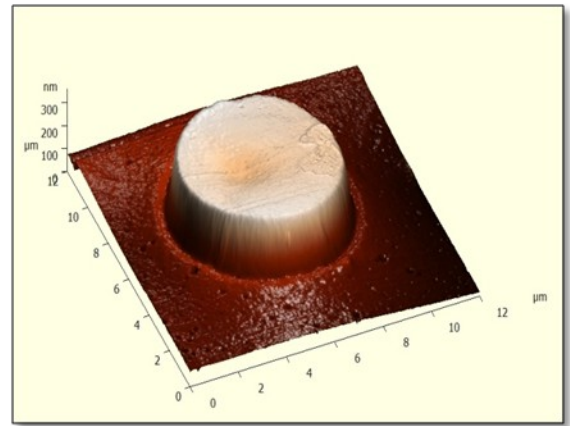
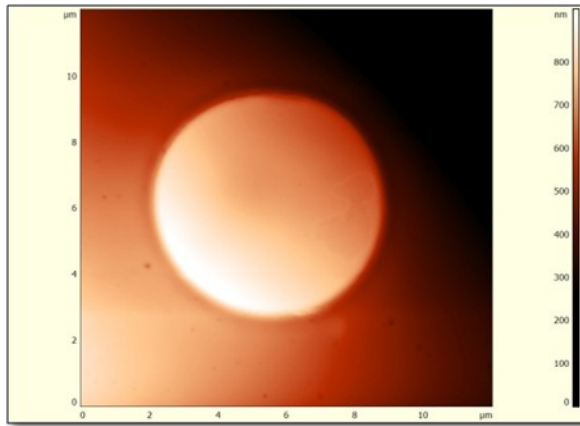
Анализ полученных изображений показал, что применение в качестве фиксатора раствора глутарового альдегида, проводка (промывка) в растворах солей (растворе Хенкса или растворе натрия хлорида) с последующей проводкой в этиловом спирте приводит к полному или частичному разрушению клеток (рис. 1, 2, 3, 6) и получению изображений, не удовлетворяющих цели настоящего исследования. При этом фиксация мазка крови в 0,5% растворе глутарового альдегида с последующей проводкой в этиловом спирте, по сравнению фиксацией проб в растворах глутарового альдегида более 0,5%, позволила получить изображения эритроцитов приемлемого для цели исследования качества (рис. 5).

Использование солевых растворов сопровождается появлением артефактов, объяснить которые можно преципитацией кристаллов солей на клетках и подложках исследуемых образцов (рис. 9, 10).

Длительная фиксация (экспозиция более 15 минут) в растворе глутарового альдегида также приводит появлению артефактов и выраженной деформации эритроцитов (рис. 4, 7, 8).

Наилучшие изображения эритроцитов при АСМ были получены из мазков крови, фиксированных высушиванием на воздухе (рис. 11, а, б), мазков крови, фиксированных в 96% этиловом спирте с экспозицией 2 мин (рис. 12, а, б) и мазков крови, фиксированных в 0,5% растворе глутарового альдегида с экспозицией 30 с и последующей проводкой в этиловом спирте в возрастающей концентрации (рис. 13, а, б).

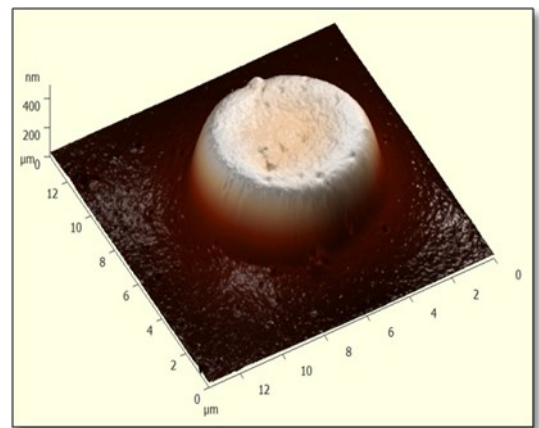
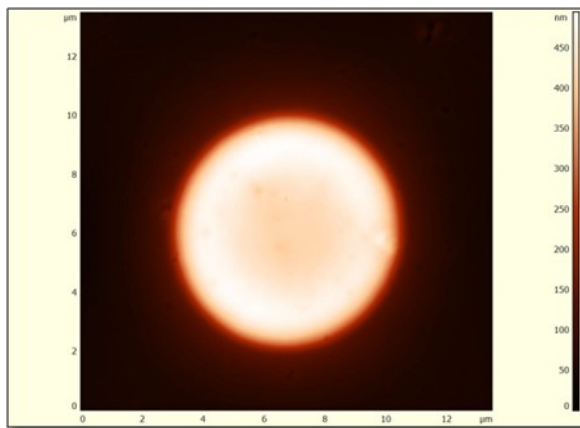




а

б

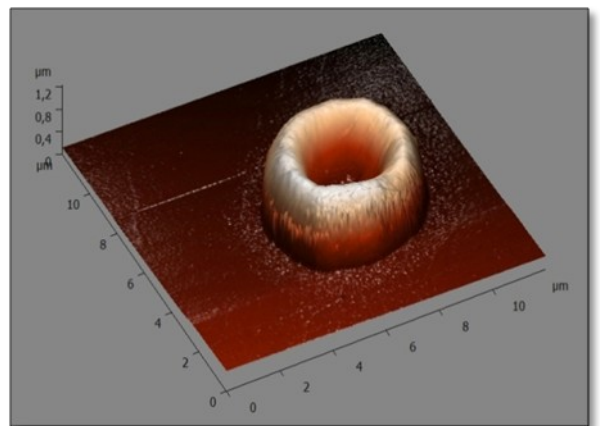
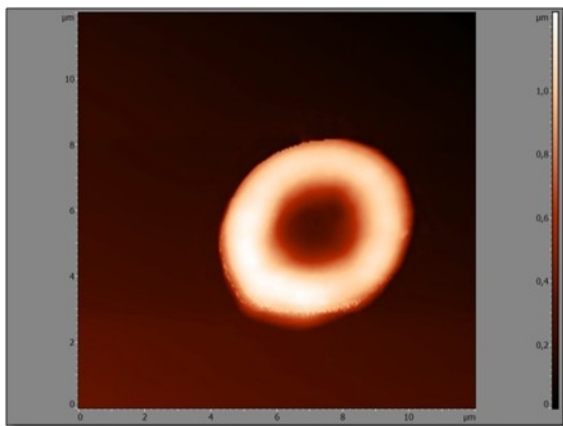
Рис. 11. Изображения эритроцита в мазке крови крысы в формате 2D (а) и «3D» (б). Фиксация мазка крови высушиванием на воздухе. Размер изображений 12x12 мкм.



а

б

Рис. 12. Изображения эритроцита в мазке крови крысы в формате 2D (а) и «3D» (б). Фиксация мазка крови в 96% этиловом спирте с экспозицией 2 мин. Размер изображений 14x14 мкм.



а

б

Рис. 13. Изображения эритроцита в мазке крови крысы в формате 2D (а) и «3D» (б). Фиксация мазка крови в 0,5% растворе глутарового альдегида с экспозицией 30 с и последующей проводкой в этиловом спирте в возрастающей концентрации. Размер изображений 12x12 мкм.



Известно, что высушивание и фиксация химическими агентами улучшает качество АСМ-изображений эритроцитов, при этом значительно сказываясь на структурных и механических свойствах клеток [4, 11].

Для того чтобы оценить, в какой мере каждый из трех отобранных способов фиксации образцов оказывает влияние на морфологические характеристики клетки, было проведено сравнение значений средних величин диаметра эритроцитов. Для этих целей было выполнено сканирование 30-ти эритроцитов, по 10 клеток для каждого способа пробоподготовки. Для контроля использованы литературные данные о размерах эритроцитов крыс [12], по результатам атомно-силовой микроскопии клеток во влажной камере. Сравнительный анализ значений средних величин диаметра эритроцитов представлен в таблице.

Таблица

**Средние величины диаметра эритроцитов  
при различных способах фиксации, ( $\bar{X} \pm m_x$ )**

Показатель	Контрольная группа	Способы фиксации образцов для исследования		
		на воздухе (n=10)	в этиловом спирте (n=10)	в растворе глутарового альдегида (n=10)
		1	2	3
Диаметр, нм	6,35±0,65 <sup>3</sup>	7,82±0,59	8,24±0,48 <sup>1</sup>	5,22±0,52

Примечание:  $\bar{X}$  – среднее значение;  $m_x$  – стандартное отклонение; надстрочными знаками указаны достоверные различия в группах сравнения ( $p \leq 0,05$ ).

Статистический анализ с использованием критерия t Стьюдента для малых выборок выявил, что средние величины диаметра эритроцитов, фиксированных в 96% этиловом спирте с экспозицией 2 мин достоверно больше, величины среднего значения данного показателя в группе контроля ( $p < 0,05$ ). Средние величины диаметра эритроцитов, фиксированных в 0,5% растворе глутарового альдегида с экспозицией 30 с и последующей проводкой в этиловом спирте в возрастающей концентрации достоверно не различается с величиной среднего значения данного показателя в группе контроля. Средние величины диаметра эритроцитов, фиксированных высушиванием на воздухе и эритроцитов контрольной группы также достоверно не различались ( $p > 0,05$ ).

Действие альдегидов сводится к образованию связей между молекулами клеточных мембран и мембран органелл в прочную единую сеть за счет «сшивания», в основном, клеточных белков [13]. При данном методе фиксации клетка не расплывается по подложке и значения ее макроморфометрических параметров максимально приближены к таковым нативных эритроцитов (высота клетки, глубина центральной впадины диска). Однако при получении изображений большей разрешающей способности отмечается сглаженность рельефа поверхности мембраны клетки (рис. 14). Таким образом, оценить мембранные наноструктуры при данном способе фиксации не представляется возможным.

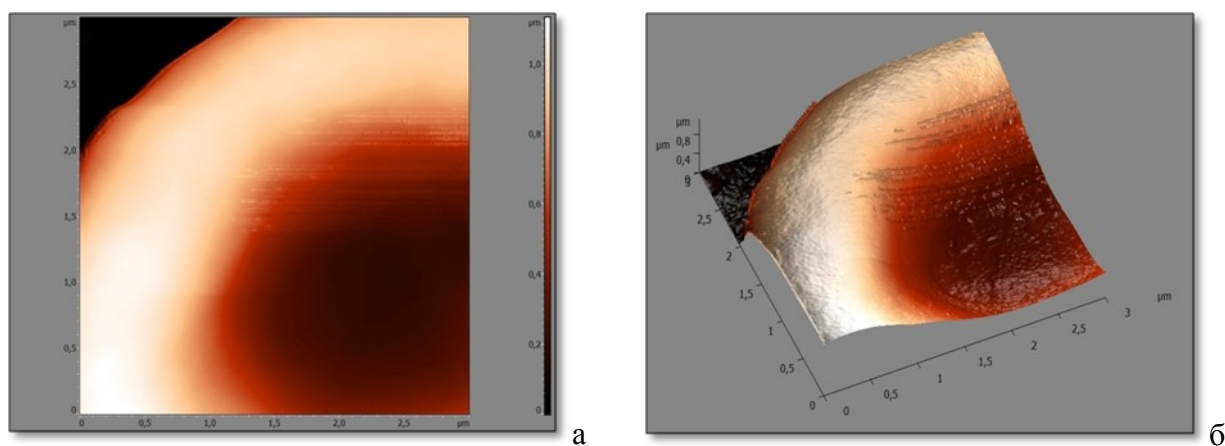


Рис. 14. Изображения фрагмента мембраны эритроцита в мазке крови крысы в формате 2D (а) и «3D» (б). Фиксация мазка крови в 0,5% растворе глутарового альдегида, экспозиция 30 с, последующая проводка в этиловом спирте в возрастающей концентрации. Размер изображений 3х3 мкм.

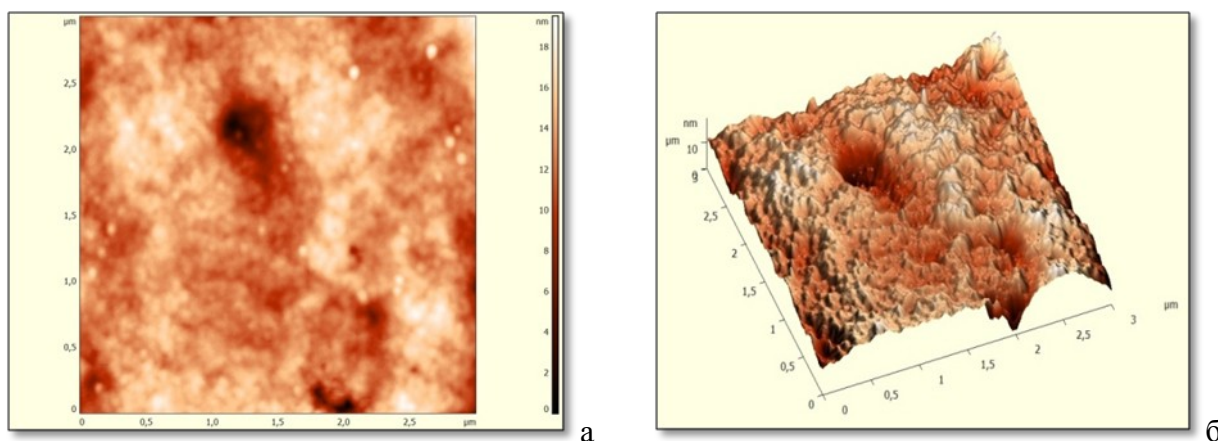


Рис. 15. Изображения фрагмента мембраны эритроцита в мазке крови крысы в формате 2D (а) и «3D» (б). Фиксация мазка крови в 96% этиловом спирте, экспозиция 2 минуты. Размер изображений 3х3 мкм.

Фиксация в 96% растворе этилового спирта с экспозицией 2 минуты также характеризуется дегидратацией эритроцита. Распластывание клетки по поверхности подложки, по-видимому, свидетельствует о том, что при данном способе пробоподготовки в большей степени осуществляется фиксация поверхностных мембранных белков, не затрагивая внутренние структуры и цитоскелет. Это, безусловно, изменяет морфологические параметры клетки, однако топография поверхности мембран становится более доступной для визуализации (рис. 15).

При фиксации мазков крови высушиванием на воздухе получена схожая морфологическая картина, однако распасть клетки по поверхности подложки и изменение значений диаметра клетки были менее выражены. Можно предположить, что при высушивании на воздухе процессы дегидратации и связывания белков происходят более равномерно как в поверхностных, так и во внутренних структурах клетки. Средние величины диаметра эритроцитов, фиксированных высушиванием на воздухе достоверно не отличались от контрольных значений (см. таб.). При этом неоднородность поверхности мембран эритроцитов была выражена более четко и позволила визуализировать мембранные наноструктуры (рис. 16).

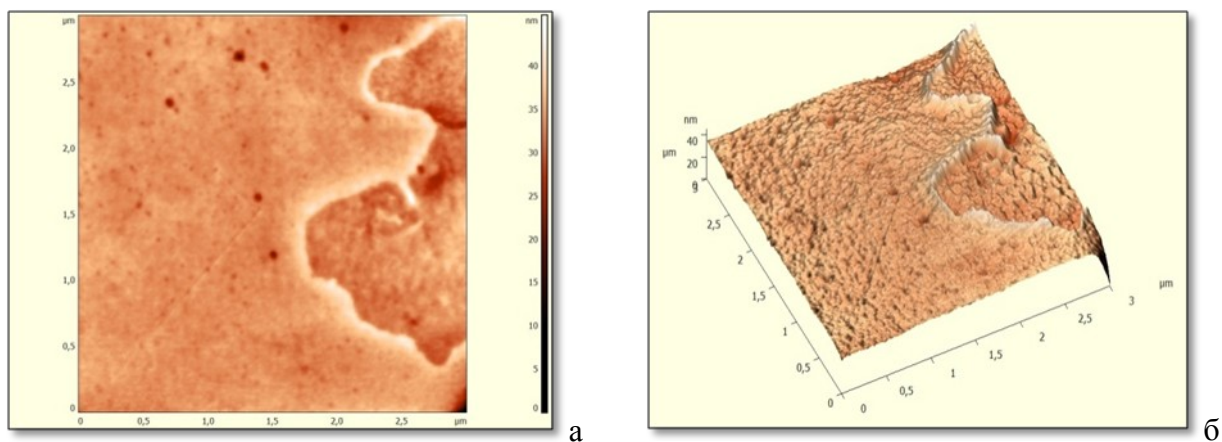


Рис. 16. Изображения фрагмента мембраны эритроцита в мазке крови крысы в формате 2D (а) и «3D» (б). Фиксация мазка крови высушиванием на воздухе. Размер изображений 3x3 мкм.

## ВЫВОД

Таким образом, для комплексной оценки морфологических параметров эритроцитов (диаметра, высоты и глубины центральной впадины), а также наноструктур мембраны наиболее подходящим способом подготовки пробы крови для АСМ является фиксация мазка крови высушиванием на воздухе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. [Chen Y.](#), [Cai J.](#) Membrane deformation of unfixed erythrocytes in air with time lapse investigated by tapping mode atomic force microscopy // [Micron](#). - 2005. - Vol. 37(4). - P.339-346.
2. [Strasser S.](#), [Zink A.](#), [Kada G.](#), [Hinterdorfer P.](#), [Peschel O.](#), [Heckl W.M.](#), [Nerlich A.G.](#), [Thalhammer S.](#) Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy // [Forensic Sci Int](#). - 2007. - Vol. 170(1). - P.8-14.
3. Mozhanova A. A., Nurgazizov N. I., Bukharaev A. A. Local elastic properties of biological materials studied by SFM // Proc. of the SPM-2003. – 2003, March 2–5. - Nizhni Novgorod. - P.266–267.
4. Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y., Komizu H., Kuzumi A. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy // *Biophysical J.* - 1998. - Vol.74. – P.2171–2183.
5. Hofmann U. G., Rotsch C., Parak W. J., Radmacher M. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope // *J. of Structural Biology*. – 1997. - Vol. 119. – P.84–91.
6. Shroff S. G., Saner D. R., Lal R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy // *American J. of Physiology (Cell Physiology 38)*. – 1995. - Vol. 269. - P.286–292.
7. Kubo N., Hirota R., Okada T., Ohara T., Kawano M., Itoh K. Structural Analysis Using Atomic Force Microscopy of the Surface of Red Blood Cells to Detect Anti-Red Blood Cell Autoantibody // *Laboratory Hematology*. – 2003. - Vol.9. – P.47-49.
8. Hekele O., Goesselsberger C.G., Gebeshuber I.C. Nanodiagnostics performed on human red blood cells with atomic force microscopy // *Materials Science and Technology*. – 2008. - Vol. 24(9). - P.1162-1165.
9. Ji X.-L., Ma Y.-M., Yin T., Shen M.-S., Xu X., Guan W. Application of atomic force microscopy in blood research // *World J. Gastroenterol*. – 2005. - Vol.11(10). – P.1709-1711.
10. Shroff S. G., Saner D. R., Lal R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy // *American J. of Physiology (Cell Physiology 38)*. – 1995. - Vol.269. - P.286–292.
11. [Liu F.](#), [Burgess J.](#), [Mizukami H.](#), [Ostafin A.](#) Sample preparation and imaging of erythrocyte cytoskeleton with the atomic force microscopy // [Cell. Biochem. Biophys](#). – 2003. - Vol.38(3). – P.251-270.
12. Симонов В.В., Канев И.П., Федорова М.З., Везенцев А.И., Надеждин С.В., Симон Е.В. Оценка влияния наночастиц маггемита ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) и лепидокрокита ( $\gamma\text{-FeOOH}$ )

на клетки крови крыс после однократного интрагастрального введения // Научные ведомости. Серия Естественные науки. 2010. - № 9(80). – Вып. 11. – С.94-98.

13. Савченко С. В., Степанищев И. В., Кузнецов Е. В. Эффективность использования метода фиксации при заборе органов и тканей для электронного микроскопического исследования [Электронный ресурс] // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. – Электронный судебно-медицинский журнал. – Новосибирск. – 2009. – Доступ: <http://journal.forens-lit.ru/node/156>.