

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТОВ,  
ЗАМОРОЖЕННЫХ ПРИ -80°C ПОД ЗАЩИТОЙ 40%-ГО ГЛИЦЕРИНА.  
ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ СТРУКТУРЫ**

Гайдаш А.А.<sup>1</sup>, Лесничий В.В.<sup>1</sup>, Ващенко В.И.<sup>1</sup>, Левичев В.В.<sup>2</sup>, Ивченко Е.В.<sup>1</sup>,  
Вильянинов В.Н.<sup>1</sup>, Е. Н. Егорова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени  
С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации,*

*194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, дом 6, тел.(812) 495-72-71*

<sup>2</sup>*Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики  
и оптики, 197101, Санкт-Петербург, Кронверский пр., дом 49, тел.(812) 498-10-65*

Эл. почта: [vladimir-vaschenko@yandex.ru](mailto:vladimir-vaschenko@yandex.ru)

**Резюме:**

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучена структура эритроцитов, криоконсервированных под защитой 40%-го глицерина. Установлено, что данный способ замораживания оказывает неоднозначное воздействие на состояние эритроцитов в конечном эритроцитсодержащем компоненте. По данным АСМ-сканирования в эритроцитных взвесах выявляется, по меньшей мере, две субпопуляции клеток. Первая - это эритроциты, адсорбировавшие глицерин. Вторая - эритроциты с относительно свободной от глицерина поверхностью. Эритроциты, адсорбировавшие глицерин, подвергаются пикнотической трансформации, сжимаясь, преимущественно, по короткой оси и высоте дисков. В то же время эритроциты с относительно чистой поверхностью, наоборот, увеличиваются в объёме и их линейные размеры превышают контрольные значения. Глицерин адсорбируется в виде довольно крупных частиц, размеры которых достигают 1,5 мкм. Частицы группируются в характерные ветвящиеся структуры, которые располагаются не только на поверхности эритроцитов, но и на подложке. Часть эритроцитов адсорбирует и достаточно прочно удерживает глицерин на поверхности цитоплазматических мембран. Эритроциты, которые в ходе технологического отмывания успели освободиться от глицерина, открывают мембранные поры, что увеличивает скорость трансмембранного массообмена и способствует восстановлению их функций. Использование высоких концентраций глицерина для криоконсервирования требует оптимизации технологии отмывания для освобождения эритроцитных взвесей от остаточного глицерина.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, эритроциты, криоконсервирование, глицерин, вода, поры, цитоплазматические мембраны.

**ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF RED BLOOD CELLS,  
FREEZING FOR -80°C WITH USE 40 PERCENTAGE GLYCERINE.  
FEATURES OF CELLULAR STRUCTURE**

Gajdash A.A.<sup>1</sup>, Lesnichij Y.Y.<sup>1</sup>, Vashchenko V.I.<sup>1</sup>, Levichey Y.Y.<sup>2</sup>, Ivchenko E.Y.<sup>1</sup>, Vilyaninov V.N.<sup>1</sup>, E. N. Egorova<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Federal state of military educational institutions of higher education «Military Medical Academy named S. M. Kirov» Ministry of Defence Russian Federation (Military Medical Academy named S. M. Kirov) 194044, Russia, St. Petersburg, Ac. Lebedev Street, 6*

*<sup>2</sup>National research university information technologies, mechanics and optics, St.-Petersburg*

**Summary:**

The method of atomic force microscopy studies red blood cells (RBCs) of structure, subjected cryopreservation with use of high concentration of glycerine. It is established, that the given way of freezing has ambiguous influence on structure red blood cells in an end concentrates RBCs. According to atomic force microscopy (AFM-scanning) in red blood cells suspensions comes to light, at least, two subpopulations of cages. The first is red blood cells, adsorbing glycerine. The second – red blood cells with relative a free surface from glycerine.

Red blood cells, adsorbing glycerine are exposed piknosis to transformation, being compressed, mainly, on a short axis and height of disks. At the same time red blood cells with rather pure surface, on the contrary, increase in volume and their linear sizes exceed control values. Glycerine is adsorbed in the form of enough large particles which sizes reach 1,5 microns. Particles are grouped in characteristic branching structures which settle down not only on a surface red blood cells, but also on a substrate. The part red blood cells adsorbs and strongly enough keeps glycerine on a surface of cytoplasmatic membranes. Red blood cells which during technological washing up had time to be released from glycerine, open membranes a time that increases speed transmembranes massexchange, and promotes restoration of key functions cellular cage body. Red blood cells which during technological washing up had time to be released from glycerine, open membranes a porous, that increases speed exchange through membranes, but promotes development of an endocellular hypostasis. Thus, use of high concentration of glycerine for cryopreservation demands optimisation of technology washing of clearing suspensions of red blood cells from residual glycerine.

**Key words:** atomic force microscopy, red blood cells, cryopreservation, glycerine, water, a porous, cytoplasmatic membranes.

**Введение.** Последние десятилетия ознаменованы поиском новых технологий замораживания эритроцитосодержащих компонентов [1]. В технологическом цикле криоконсервирования эритроцитных взвесей под защитой криофилика глицерина этапы глицеринизации, замораживания и деглицеринизации являются наиболее критичными. Качество конечного продукта (гемокомпонента) зависит от факторов, которые действуя отдельно или совместно, могут вызвать нежелательные эффекты. В связи с этим возникает прогностическая и диагностическая неопределённость, обусловленная недостаточно изученным влиянием низких температур и глицерина на структуру эритроцитов. Вместе с тем, очевидно, что при замерзании вода, являющаяся главным структурообразующим фактором клеток, испытывает фазовые переходы, сопровождающиеся изменением физических и механических свойств. Эти изменения не могут не влиять на тонкую структуру, поверхностные и водообменные характеристики эритроцитов. В действующих в настоящее время документах, регламентирующих заготовку компонентов крови, не решён вопрос о минимально допустимом количестве глицерина, остающегося в большем или меньшем объёме эритроцитсодержащего компонента после разморозки и отмывки эритроцитных взвесей [2]. Не ясны и структурные последствия избыточной глицеринизации эритроцитов. Для исследования этих явлений на уровне клеточных органелл используются методы сканирующей зондовой микроскопии (АЗМ) и, прежде всего, атомно-силовой микроскопии (АСМ) [3]. АСМ визуализирует микрообъекты с высоким пространственным разрешением и позволяет проводить локальные микромеханические испытания [4,5].

**Цель исследования.** Изучить методом АСМ структуру эритроцитов, прошедших технологический цикл криоконсервирования с использованием высоких концентраций глицерина.

**Материал и методы исследования.** Для криоконсервирования использовалась эритроцитная масса с удалённым лейкотромбоцитарным слоем. Замораживание эритроцитов осуществлялось по стандартной программе при  $-80^{\circ}\text{C}$  в полимерных контейнерах с концентрацией глицерина 40% [6]. В замороженном состоянии эритроциты хранились в течение 2-х лет. Для исследования готовили мазки из эритроцитной взвеси,

нанесённые на покровные стекла и фиксированные на воздухе. Материал (мазки) был распределён в следующие группы: 1-я группа (контрольная) - мазки из донорской крови;

2-я группа - мазки из размороженной и отмытой эритроцитной взвеси (РОЭВ) (на эритроцитах определяются кристаллы глицерина); 3-я группа - мазки из РОЭВ (без кристаллов глицерина на эритроцитах). Каждая группа была составлена из 10 образцов, взятых из эритроцитсодержащих компонентов. Для приготовления образцов для сканирования использовали установку Vitrobot Mark IV. АСМ-сканирование выполняли в контактном режиме кремниевым кантилевером CSG10 на микроскопе Ntegra Aura нанолaborатории «NTEGRA Prima» (Россия). Морфометрию (диаметр и высоту дисков, глубину центральных ямок, диаметр, глубину, относительный объем и удельную площадь поверхности пор, долю сложных агрегатов, форм-фактор, шероховатость) АСМ-сканов эритроцитов выполняли с помощью модуля обработки изображений ПО Nova «NT-MDT». Результаты исследования обрабатывали на персональном компьютере, используя пакет прикладных программ ОМИС [7], различия оценивали по t критерию Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение.** По данным АСМ-сканирования в эритроцитных взвесьях выявляется, по меньшей мере, две субпопуляции клеток. Первая - это эритроциты, адсорбировавшие глицерин (рис.1).

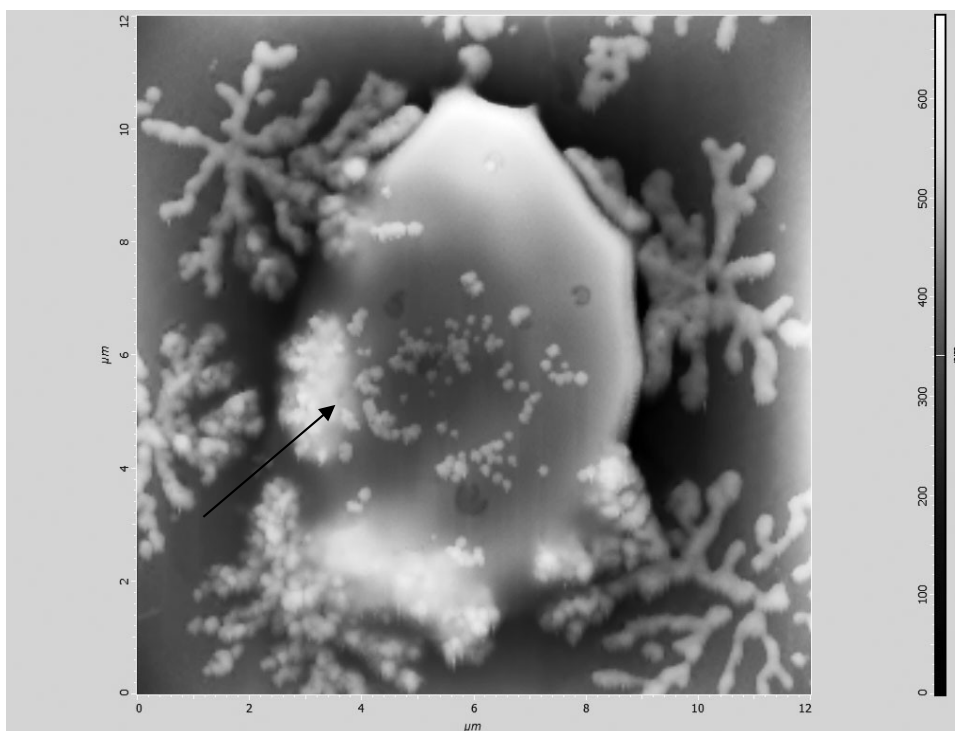


Рисунок 1. АСМ-скан эритроцита из эритроцитсодержащего компонента,

замороженного при  $-80^{\circ}\text{C}$  под защитой 40%-го глицерина.

Вертикальная и горизонтальная размерная шкала в мкм. Частицы глицерина (см. стрелку) адсорбированы на поверхности эритроцита.

Вторая субпопуляция – это эритроциты с относительно свободной от глицерина поверхностью. Эритроциты, адсорбировавшие глицерин, подверглись пикнотической трансформации, сжимаясь, преимущественно, по короткой оси и высоте дисков (рис.). В то же время эритроциты с относительно чистой поверхностью, наоборот, увеличились в объеме, и их линейные размеры превышают контрольные значения (табл.1).

Таблица 1

Морфометрические показатели и значения адгезивных сил эритроцитов, подвергнутых криоконсервированию ( $M \pm m$ )

Параметры	Субпопуляции исследуемых клеток		
	Группа №1 (n=10)	Группа №2 (n=10)	Группа №3 (n=10)
	(эритроциты крови - контроль)	(эритроциты с глицерином)	(эритроциты без глицерина)
Диаметр дисков, мкм	$7,4 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,1^1$
Высота дисков, $\times 10^{-3}$ мкм	$483,0 \pm 20,1$	$517,1 \pm 24,0^1$	$551,5 \pm 26,3^1$
Глубина центральных ямок, $\times 10^{-3}$ мкм	$234,5 \pm 15,6$	$509,9 \pm 23,9^1$	$556,7 \pm 27,0^1$
Форм-фактор, отн. ед.	$0,82 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,01$
Диаметр пор, $\times 10^{-3}$ мкм	$208,9 \pm 11,2$	$102,2 \pm 5,1$	$132,1 \pm 7,8^{1,2}$
Глубина пор, $\times 10^{-3}$ мкм	$110,1 \pm 8,1$	$31,3 \pm 1,8$	$57,7 \pm 3,6^{1,2}$
Удельная площадь поверхности пор, мкм <sup>2</sup>	$29,9 \pm 0,7$	$49,3 \pm 1,4^1$	$65,2 \pm 1,7^{1,2}$
Относительный объем пор, %	$10,6 \pm 0,5$	$14,8 \pm 0,4$	$15,2 \pm 0,6^1$
<sup>3</sup> Шероховатость, $\times 10^{-3}$ мкм	$11,8 \pm 0,5$	$10,5 \pm 0,5^1$	$11,4 \pm 0,5$
<sup>4</sup> Адгезионные силы, нН	$46,4 \pm 1,1$	$40,8 \pm 1,8^1$	$40,3 \pm 1,1^1$

Примечание:

<sup>1</sup> - различия значимы при  $p < 0,05$  относительно контрольной группы;

<sup>2</sup> - различия значимы при  $p < 0,05$  относительно 2-й группы;

<sup>3</sup> - средняя арифметическая шероховатости [8];

<sup>4</sup> - на поверхности кристаллов глицерина.

## RU

Глицерин адсорбируется в виде довольно крупных частиц, размеры которых достигли 1,5 мкм. Частицы группируются в характерные ветвящиеся структуры, которые располагаются не только на поверхности эритроцитов, но и на подложке (рис. 1).

Указанные морфологические особенности свидетельствуют о том, что в ходе высыхания мазков остаточный глицерин затвердевает и кристаллизуется. При затвердевании глицерин обхватывает и обжимает эритроциты тем больше, чем больше он адсорбировался и/или прочнее связался с поверхностью клеток. Если же эритроциты в ходе технологической процедуры отмыwania успели освободиться от глицерина, то, соответственно, сжиматься они будут в меньшей степени.

Таким образом, метод АСМ можно использовать для визуализации остаточного глицерина и изучения структурных последствий его локализации на эритроцитах. Снимки показывают, что сжатие эритроцитов происходит неравномерно. Клетки вытягиваются, принимают форму «висячей» капли (рис.2).

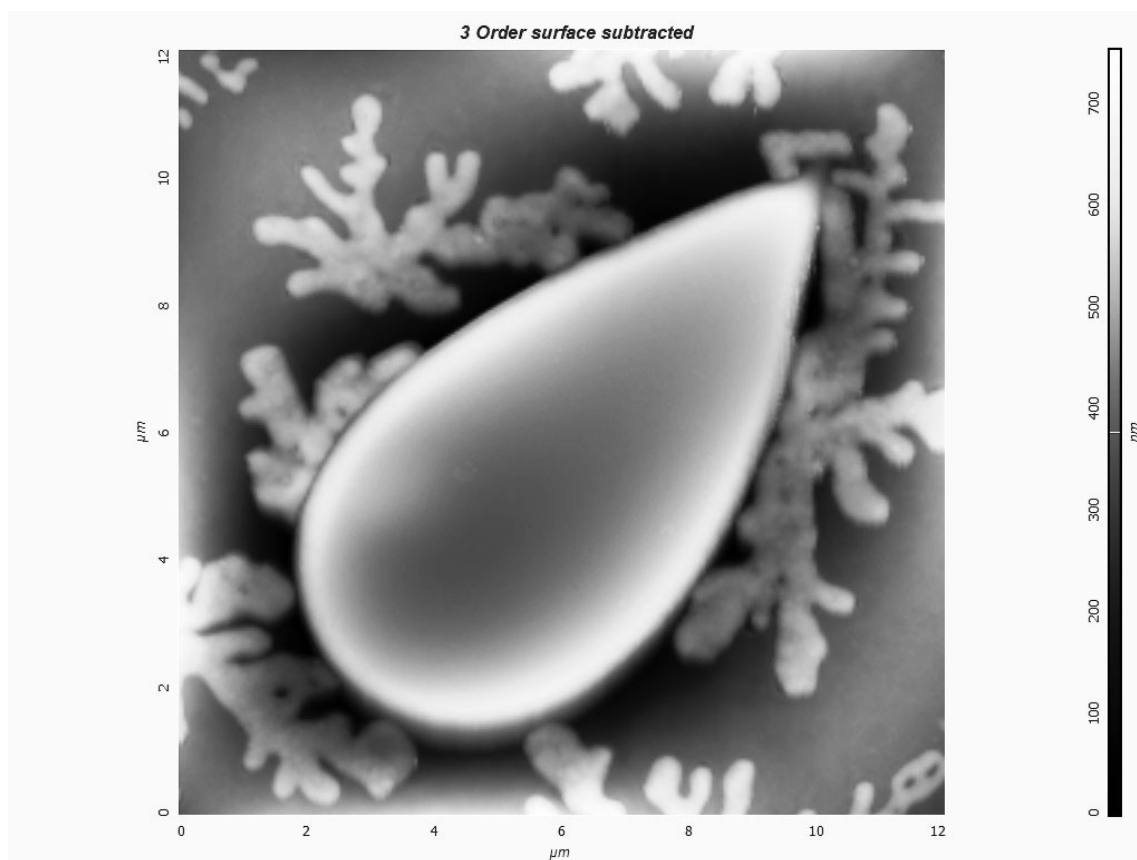


Рисунок 2. АСМ-скан эритроцита из эритроцитсодержащего компонента,

приготовленного из замороженных с глицерином при  $-80^{\circ}\text{C}$  эритроцитов.

Вертикальная и горизонтальная размерная шкала в мкм. На снимке хорошо выражена каплевидная форма эритроцита, свободного от частиц глицерина.

WWW.MEDLINE.RU

Некоторые эритроциты покрыты бесструктурной плёнкой, которая придаёт клеткам на АСМ-сканах мутноватый вид.

В декриоконсервированных эритроцитах центральная область клетки монотонно поднимается, что означает уменьшение глубины ямок. Это значит, что вследствие замораживания цитоскелет подвергается пластической деформации и спектриновые нити утрачивают способность к обратимому разворачиванию. В выпуклой части поверхности эритроцитов выявляются эрозии в виде полиморфных дефектов диаметром 1-1,5 мкм, дно которых заполнено детритом. Края эрозий рваные, приподняты, вывернуты, что может являться признаком выброса клеточного материала под давлением изнутри (рис.3).

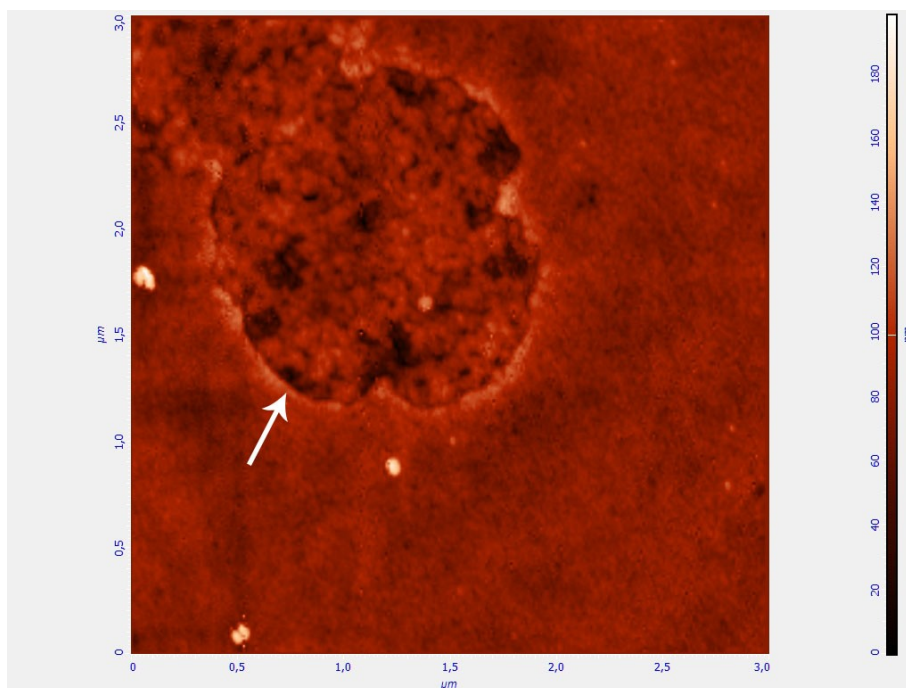


Рисунок 3. АСМ-скан эритроцита (красный светофильтр) из эритроцитсодержащего компонента, приготовленного из замороженных при  $-80^{\circ}\text{C}$  эритроцитов под защитой 40%-го глицерина.

Вертикальная и горизонтальная размерная шкала в мкм. Эрозия на поверхности эритроцита (обозначена стрелкой).

Можно отметить также, что качественные характеристики гемокомпонента после завершения всех этапов технологического цикла криоконсервирования соответствуют Техрегламенту (табл. 2).

Таблица 2

Контроль качества эритроцитной взвеси после завершения технологических этапов приготовления эритроцитсодержащего компонента ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Стандарты качества гемокомпонента	После добавления (1:0,5) взвешивающего раствора
Объем, мл	$202,1 \pm 8,9$
Гематокрит, л/л	$0,66 \pm 0,01$
Содержание общего гемоглобина, г/л	$184,8 \pm 4,8$
Содержание общего гемоглобина, г/доза	$37,7 \pm 3,5$
Концентрация свободного гемоглобина, г/л	$0,19 \pm 0,01$
Содержание свободного гемоглобина, г/доза	$0,04 \pm 0,01$
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	$0,025 \pm 0,05$
Осмолярность, мОсм/л	$326,0 \pm 5,2$
Стерильность	стерильно

Таким образом, различия в клеточных субпопуляциях по связыванию клеточной поверхности эритроцитов с глицерином можно обосновать более высокой осмолярностью среды и наличием в ней большего количества глицерина.

После подсчета цитоплазматических пор на АСМ-сканах нами установлено, что в криоконсервированных эритроцитах диаметры и глубина пор меньше, а показатели относительного объема и удельной площади поверхностей пор достоверно выше, чем в контроле (табл.1). Указанное соотношение параметров свидетельствует о том, что поры становятся мельче, но увеличивается их количество. В итоге мембраны становятся более похожими на сито (большое количество пор). Однако, имеются и различия в структуре пористых образований исследованных субпопуляций криоконсервированных эритроцитов.

Так в эритроцитах с поверхностью свободной от глицерина поры более крупные, чем в эритроцитах, адсорбировавших глицерин. Не менее важны форма и рельеф стенок пор. В эритроцитах со свободной от глицерина поверхностью поры аппроксимируются к усеченным конусам с гладким рельефом стенок. Сглаживание рельефа обусловлено общим уменьшением складчатости эритроцитарных стенок (показатель шероховатости



ниже, чем в контроле, табл.1). Расправлению мембран могут способствовать упругие силы давления, обусловленные присутствием внутри клеток остатков глицерина. Но этому же способствуют и силы поверхностного натяжения.

Глицерин, как высокоосмолярное вещество, нарушает структуру воды, молекулы которой расходуются на образование клатратных решёток, окружающих молекулы углеводорода. Это и есть один из механизмов связывания воды глицерином. Поверхность глицеринизированных эритроцитов гидрофобна, так как показатель адгезивных сил меньше, чем в контроле (табл.1). Как известно, в пористых структурах с гидрофобными стенками скорость гидродинамических потоков значительно выше, чем в наноканалах с гидрофильными стенками [9]. Таким образом, в эритроцитах, прошедших технологический цикл криоконсервирования, создаются физические и структурные предпосылки для высокой скорости трансмембранных гидродинамических потоков и они будут менее турбулированными, так как вода проникает в клетки по более крупным и гладкостенным каналам. Повышенная гидрофобность приводит к уменьшению склонности к агрегированию эритроцитов. Об этом свидетельствует снижение процента сложных агрегатов в мазках из эритроцитных взвесей (табл.1).

В целом, анализируя взаимодействие мембран с глицерином, компоненты структуры эритроцитов и состояние воды в них можно предположить, что механизм деградации и разрушения эритроцитов при криоконсервировании схож с пироптозом [10,11], в терминальной стадии которого открываются мембранные поры и из гибнущих клеток деградированные компоненты как бы «выбрасываются».

#### **Выводы.**

1. Замораживание эритроцитов при  $-80^{\circ}\text{C}$  с использованием высоких концентраций глицерина оказывает неоднозначное воздействие на структуру клеток в конечном эритроцитсодержащем компоненте.

2. Эритроциты, которые адсорбируют и достаточно прочно удерживают глицерин на поверхности цитоплазматических мембран, подвергаются пикнотической трансформации и разрушаются.

3. Эритроциты, которые в ходе технологического отмывания успели освободиться от глицерина, открывают мембранные поры, что увеличивает скорость трансмембранного массообмена и способствует нормализации их физиологических функций.

**Литература.**

1. Ващенко В.И., Вильянинов В.Н. История развития и перспективы совершенствования криоконсервирования эритроцитсодержащих компонентов крови // Гематол. и трансфузиол. – 2010. – Т.55. – №4. – С. 31-36.
2. Технический регламент О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии. – Утвержден Постановлением правительства РФ от 26.01.2010 г. №29. – М., 2010. – 34 с.
3. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии / В.Л. Миронов. - М.: Техносфера, 2004. – 144 с.
4. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Забиняков Н.А., Сладкова Е.А. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силовой микроскопии // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2010. – Т.150. – №8. – С. 238-240.
5. Ebner A., Schillers H., Hinterdorfer P. Normal and pathological erythrocytes studied by atomic force microscopy // Methods Mol Biol. – 2011. – Vol.736. – P.223-241.
6. Вильянинов В.Н., Ващенко В.И., Куркова М.В. и др. Консервирование эритроцитов человека при умеренно низкой температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  в полимерных контейнерах ОАО «СИНТЕЗ» // Вестн. службы крови России. – 2011. – № 1. – С. 17 -22.
7. Генкин А.А. Новая информационная технология анализа медицинских данных (программный комплекс ОМИС) / А.А. Генкин.– СПб.: Политехника, 1999. – 191 с.
8. ГОСТ ISO 4287:1997 Геометрические характеристики изделий (GPS). Структура поверхности. Профильный метод. Термины, определения и параметры структуры. – М.: Госстандарт России, 1997. – 32 с.
9. Li T.-D., Gao J., Szoszkiewicz R. et al. Structured and viscous water in subnanometer gaps // Phys. Rev. – 2007. – Vol. 75. – P. 115-415.
10. Susan L.F., Cookson B.T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells // Infect. and Immunity. – 2005. – Vol.73. – N4. – P.1907–1916.
11. Kepp O., Galluzzi L., Zitvoge L., Kroemer G. Pyroptosis – a cell death modality of its kind? // Eur. J. Immunol. – 2010. – Vol.40. – P.595-653.