

21. Новикова О.А., Сергеев В.П. Модификация поверхности армирующих волокон в композиционных материалах. – К.: Наукова думка. – 1989.-218с.
22. Суберляк О.В., Баштанник П.І. Технологія переробки полімерних та композиційних матеріалів. – Львів.: Растр-7.-2007.- С.302-305
23. Соколов Б.Д., Смирнов Е.П., Марнов Г.П. и др. Исследование влияния окисления поверхности углеродных волокон на физико-механические свойства углепластиков // Журн. прикл.химии. – 1980.-№1.- С.103-108.
24. Pat.3816598 USA IC COIB 31/07/ Surface treatment of grafite fibers/A/L/ Cunningham.- Pube/11.06.84
25. Favre I.P., Perrin I. Carbon fibre adhesion to organic matrices // J.Mater.Sci. – 1982/-7,№10.-P.1113-1118
26. Миронов Н.А. Айзинсон И.Л., Беляев В.А. и др. Технология производства наполненных термопластов // Сборник докладов II ВНТК «Высоконаполненные композиционные полимерные материалы, развитие их производства и применение в народном хозяйстве». – М. – 1985. – 4.1- С.35-40
27. Барамбойм Н.К., Клейман А.М. Истратова Е.П. и др. Технологические аспекты трибохимических явлений // Сборник докладов II ВНТК «Высоконаполненные композиционные полимерные материалы, развитие их производства и применение в народном хозяйстве». – М.-1985.-ч.2 – С.105-10

УДК 577.359:57.087:576.08

АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОП КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Н. Ю. Гетманенко
Аспирант*

Е. Н. Галайченко
Кандидат технических наук, научный сотрудник*

Н. Н. Рожицкий
Доктор физико-математических наук, профессор*
*Харьковский национальный университет
радиоэлектроники
пр. Ленина, 14, г. Харьков, 61166
Контактный тел.: 702-13-64
E-mail: rzh@kture.kharkov.ua

Наведена порівняльна характеристика методів дослідження морфології еритроцитів. Описаний принцип роботи атомно-силового мікроскопа. Наведені результати дослідження еритроцитів при різних методах фіксації за допомогою атомно-силового мікроскопу

Ключові слова: атомно-силовий мікроскоп (АСМ), еритроцити, сканування

Приведена сравнительная характеристика методов исследования морфологии эритроцитов. Описана методика проведения исследования с помощью атомно-силового микроскопа. Приведены результаты исследования эритроцитов при различных способах фиксации с помощью атомно-силовой микроскопии

Ключевые слова: атомно-силовой микроскоп (АСМ), эритроциты, сканирование

This article represents comparative methods investigation surface erythrocyte and principle of operation AFM. The results of AFM investigation of erythrocyte using different immobilization methods are presented

Key words: atomic-force microscope, erythrocyte, scanning

1. Введение

Эритроциты составляют основную массу форменных элементов крови. Важнейшая функция эритроцитов состоит в переносе кислорода от органов дыхания к клеткам организма т.е. участие в тканевом дыхании.

На основе тканевого дыхания, или биологического окисления, осуществляются энергетические процессы в организме. Переносчиком кислорода является гемоглобин, находящийся в эритроцитах.

Эритроциты участвуют в доставке питательных веществ к клеткам и тканям организма, выполняя пи-

тательную функцию. Защитная функция эритроцитов осуществляется за счет их способности связывать токсины и переносить на своей поверхности антитела.

Клиническое исследование эритроцитов является весьма важным для постановки диагноза и выявления различных патологий, протекающих в организме. Разработка качественно новых методов клинической диагностики морфологии эритроцитов является важнейшей задачей.

2. Анализ методов исследования эритроцитов

В настоящее время существует ряд традиционных, унифицированных методик исследования как морфологии самих эритроцитов, так и их поверхности. В таблице 1 приведен сравнительный анализ используемых методов исследования структуры эритроцитов.

Таблица 1

	Метод	Реактивы	Время	Разрешающая способность
Оптическая микроскопия	Окрашивание по Паппенгейму	Раствор эозин-метиленового синего по Маю-Грюнвальду, раствор азур-эозина по Нохту, фиксатор (метиловый спирт, этиловый спирт)	от 20 мин до 40 мин	200-350 нм
Электронная микроскопия	Оттенивание металлами	Платина, палладий, уран	до 5 мин	1-1.5 нм
	Негативное контрастирование	Молибденовокислый аммоний, уранилацетат, фосфорновольфрамовая кислота	до 5 мин	1-1.5 нм
Атомно-силовая микроскопия		Фиксатор (метиловый спирт, этиловый спирт, хлороформ)	от 5 мин до 15 мин	1 нм

Как видно из приведенного анализа, использование атомно-силового микроскопа (АСМ), как инструмента исследования форменных элементов крови, по ряду параметров превосходит классические методики.

Целью данной работы является разработка методики подготовки образцов для исследования с помощью АСМ, а также разработка технологии сканирования поверхности эритроцитов и получения топографии их поверхности при различных методах фиксации традиционно используемых в клинической практике.

АСМ был изобретен в 1986 году Гердом Биннигом и Кристофом Гербером. АСМ представляет собой сканирующую зондовую микроскопию высокого разрешения. В основе его работы лежит физическое явление, называемое силами Ван-дер-Ваальса. Под действием сил Ван-дер-Ваальса, возникающими между иглой и поверхностью исследуемого образца, происходит изгиб кантилевера. Изгиб вызывает смещение луча лазера, которое фиксируется фотоприемником. Нами использован для исследования АСМ NT-206 («Микротестмашин»), в нем сканирующая игла является неподвижной. Подвод и отвод пьезосканера осуществляется механизмом верхнего перемещения пьезосканера. Горизонтальное перемещение образца в процессе сканирования происходит посредством пьезокерамического сканера.

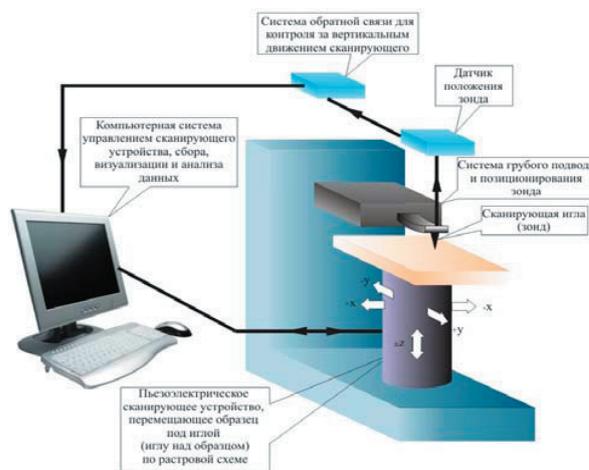


Рис. 1. Общая схема сканирующей зондовой микроскопии

3. Материалы и методы

В качестве объекта исследования были взяты эритроциты человека. Забор крови проводился с утра натощак. Нанесение пробы крови на подложку для исследования АСМ было выполнено широко применяемым в клинической практике методом – методом мазка. Капля крови наносилась с помощью покрывного стекла тонким слоем на предметное стекло. После приготовления образцов, они подвергались различным способам фиксации: фиксация в 96% этиловом спирте, в хлороформе, а также использовалась частичная дегидратация эритроцитов высушиванием на воздухе без применения дополнительных химических фиксаторов.

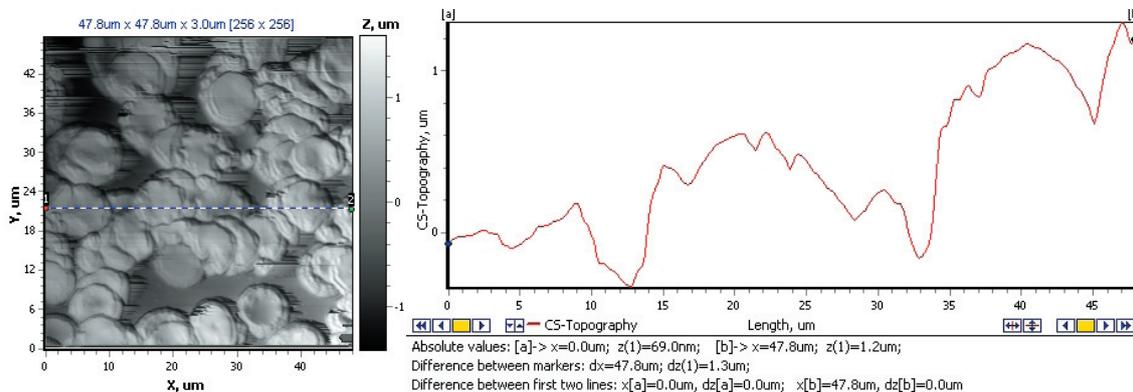
Исследования проводились на АСМ NT-206. Зондирование образцов осуществляли в однопроводном режиме, контактным методом. Использовали балку В кантилеверов CSC38 производства Mikromasch.

Фиксация хлороформом.

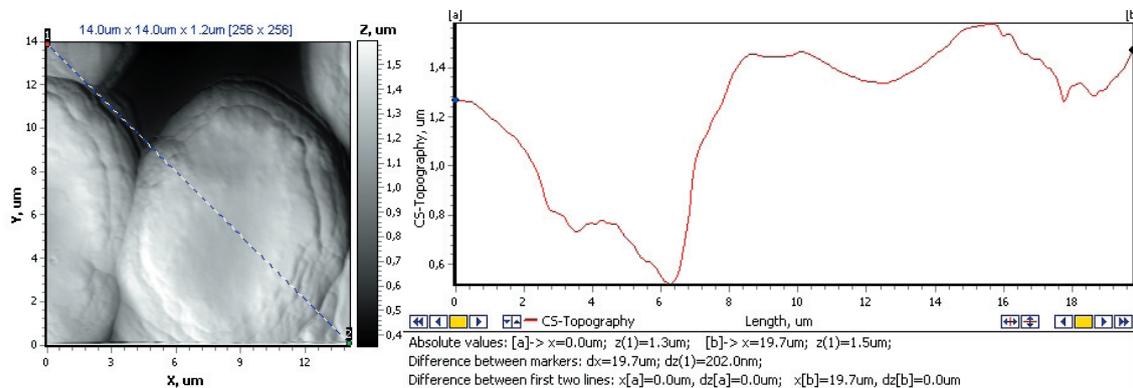
В кювету содержащую хлороформ, помещался мазок крови и выдерживался 10 минут. Затем мазок высушивался на воздухе в течении 5 минут. Полученную пробу размещали в АСМ для сканирования. Результат сканирование представлен на рисунке.

Фиксация частичной дегидратацией.

Подготовленный мазок крови высушивался на воздухе в течении 60 минут. Затем полученную пробу размещали в АСМ для сканирования.

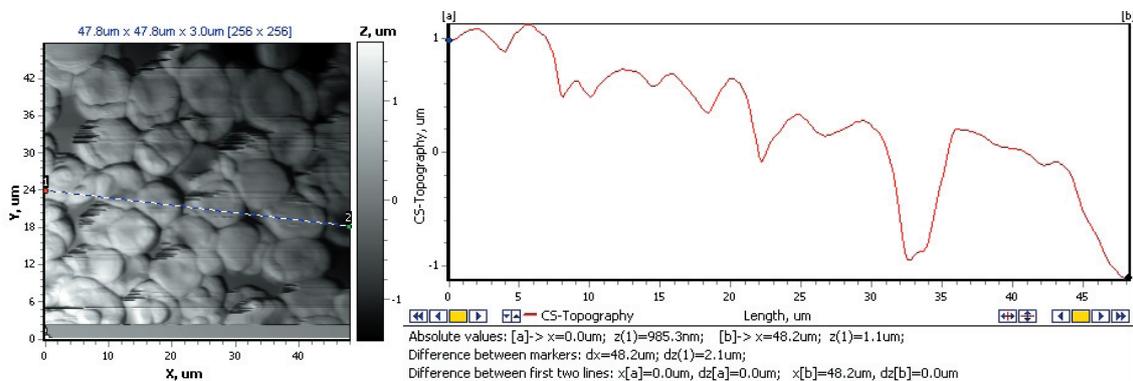


(a)

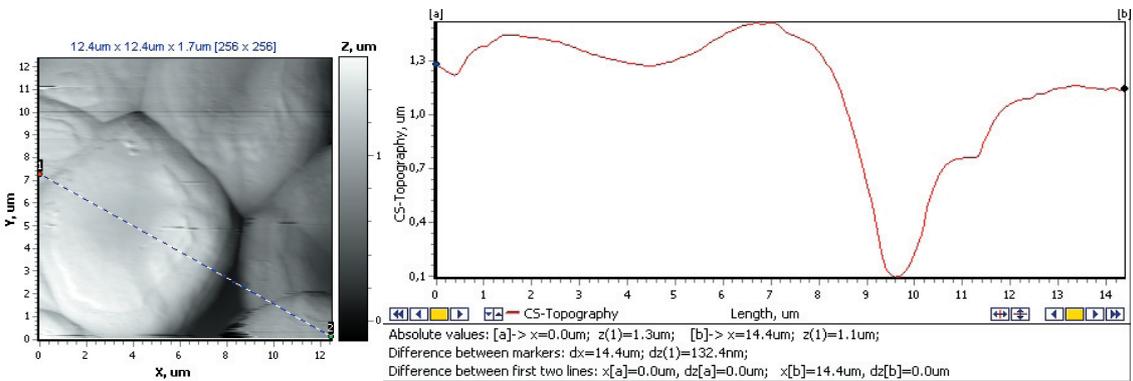


(б)

Рис. 2. Эритроциты крови человека. Фиксация частичной дегидротацией. Размер поля сканирования : (а) 47,8 мкм * 47,8 мкм; (б) 14 мкм*14 мкм

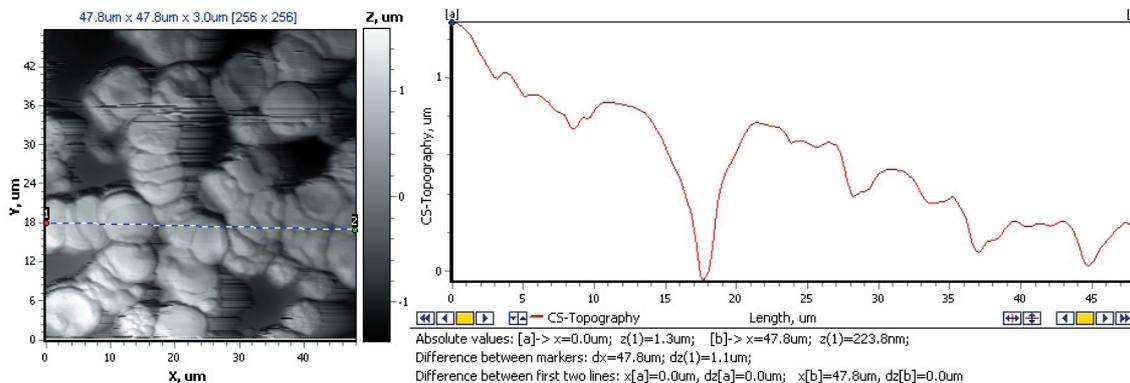


(a)

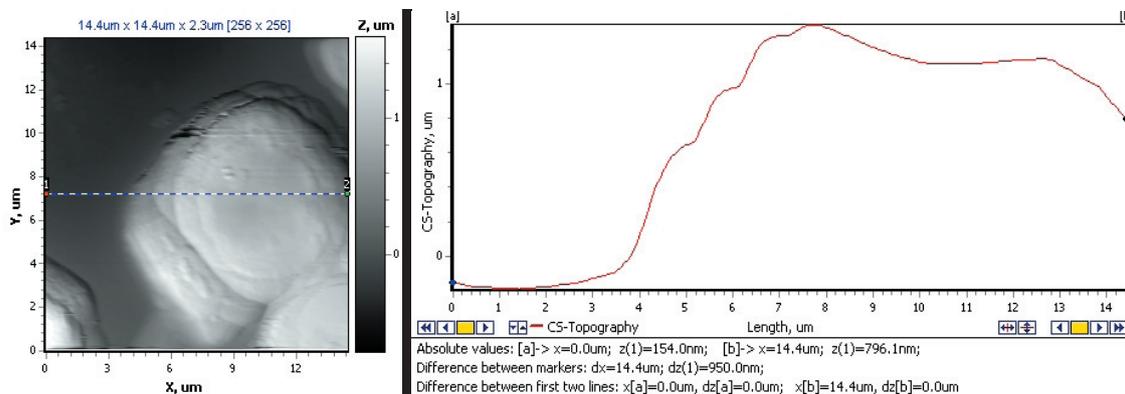


(б)

Рис. 3. Эритроциты крови человека. Фиксация в хлороформе. Размер поля сканирования: (а) 47,8 мкм * 47,8 мкм; (б) 12,4 мкм*12,4 мкм



(а)



(б)

Рис. 4. Эритроциты крови человека. Фиксация в 96% этиловом спирте. Размер поля сканирования: (а) 47,8 мкм * 47,8 мкм; (б) 14,4 мкм*14,4 мкм

Из приведенных результатов исследования, можно сделать вывод о существенных отличия в морфологии поверхности эритроцитов, в зависимости от метода фиксации. В клинической практике исследование эритроцитов сводится к определению их морфометрических характеристик и не дает информации о поверхности эритроцитов, что оправдывает равноправное использование методов фиксации, которые практически не оказывают деструкции на общее строение эритроцитов. Однако данные изменения структуры являются критическими при изучении влияния внешних факторов на поверхность эритроцитов, так как последние могут оказывать незначительное воздействие на форменные элементы крови, при этом сохраняя общую структуру эритроцитов.

Изучение морфологии поверхности эритроцитов является важной практической задачей. Применение АСМ позволит изучить влияние различных заболеваний на структуру форменных элементов крови, полученные данные могут быть использованы для ранней диагностики заболеваний и терапии. Также весьма перспективной областью исследования является изучение влияний фармацевтических препаратов.

В данной работе были исследованы методики фиксации эритроцитов и их влияние на структуру поверхности. С помощью АСМ было установлено, что наименьшую деструкцию поверхности эритроцитов оказывает фиксация в хлороформе, из чего следует, что данный метод фиксации является наиболее адекватным для АСМ анализа форменных элементов крови.

Литература

1. Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови / М.З. Федорова, Н.А. Павлов, Е.В. Зубарева [и др.] // Биофизика. – 2008. - № 53. – С. 1014-1018.
2. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / [В. В. Меньшиков, Л. Н. Дефекторская, Р. П. Золотницкая и др.]; под ред. В. В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987, – 368 с.
3. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию: учебник для вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. / Ченцов Ю.С. – м.: икц «академкнига», 2004. – 495 с.
4. АСМ-исследование клеток сердечно-сосудистой системы и крови. Проблемы и надежды : материалы 4-го Белорусского семинара по сканирующей зондовой микроскопии. Сборник докладов. - Гомель, 2000 г. - с. 44-47
5. 'Holes' on erythrocyte membrane and its roughness contour imaged by atomic force microscopy and lateral force microscopy/ T. Guha, K. Bhattacharyya, R. Bhar [at all]// Current science. – 2002. – T.2, №2 - С. 693-694.