

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ДЕТЕЙ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОЧЕК С СИНДРОМОМ ГЕМАТУРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

С.Н. Мамаева¹, Г.В. Максимов², С.Р. Антонов¹, Я.А. Мунхалова¹,
А.А. Дьяконов¹, П.В. Винокуров¹

¹ Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск

² Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

С помощью методов растровой электронной микроскопии (РЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследовали морфологию эритроцитов больных с почечными заболеваниями с гематурией. Предложена методика исследования клеток и наночастиц с применением РЭМ без напыления проводящих покрытий, которая позволила исследовать динамику морфологии эритроцитов крови на примере гломерулонефрита в зависимости от лечения при одновременном исследовании образцов крови методом АСМ. Предложено методику исследований с РЭМ и АСМ использовать для системной дифференциальной диагностики видов гематурии у детей.

Ключевые слова: эритроциты, гематурия, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия

Введение

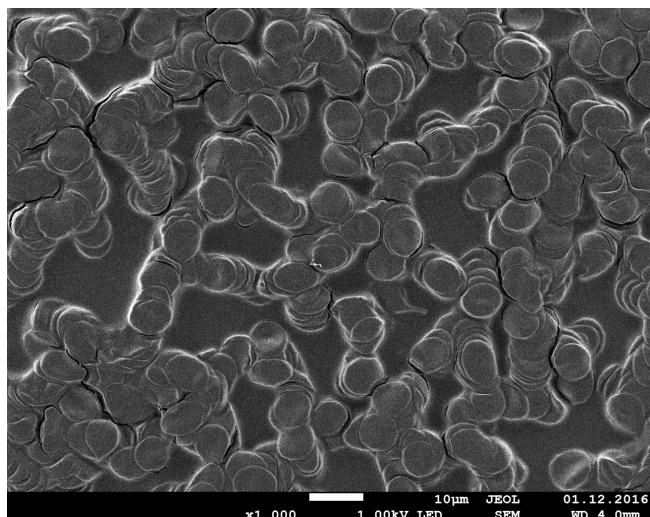
В настоящее время все большее внимание исследователей привлекает проблема диагностики редких заболеваний. В связи с этим возникает необходимость разработки новых методов диагностики с применением современных наукоемких технологий. Примерами таких исследований являются изучение IgA-нефропатии гломерулонефрита у детей с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) и атомно-силового микроскопа (АСМ).

Материал и методы

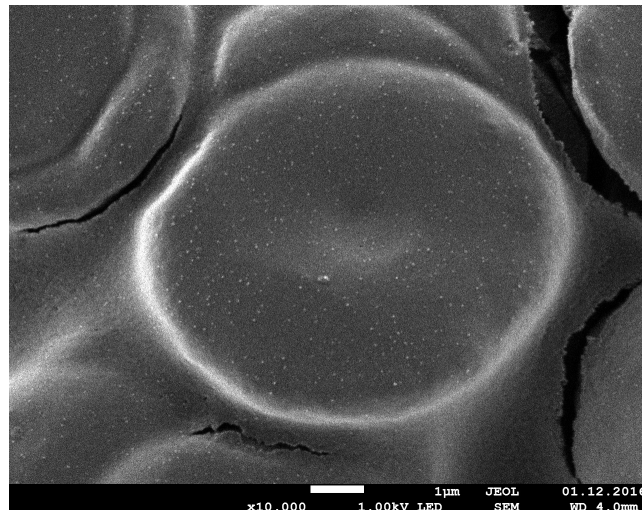
Объектами исследования были неокрашенные сухие мазки венозной крови детей, по-

ступивших в Республиканскую больницу № 1 Национального центра медицины г. Якутска с симптомами макрогематурии. Исследования образцов проводили на РЭМ JSM-7800F фирмы JEOL с термополевым эмиссионным катодом Шоттки и супергибридной объективной линзой, с использованием нижнего детектора вторичных электронов при напряжении от 0,1 до 30 кВ. Применение такого режима измерений позволило впервые провести исследования поверхности эритроцитов без повреждения с выявлением наноструктур на них без напыления проводящих покрытий.

С помощью АСМ – сканирующего зондового микроскопа Solver Next фирмы NT-MDT проводили сканирование в полу-контактном режиме со следующими характеристиками ра-



а



б

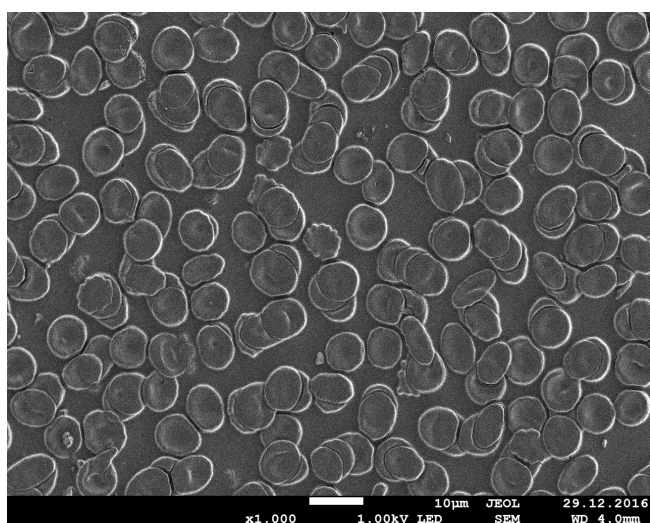
Рис. 1. РЭМ-изображения эритроцитов крови больных гломерулонефритом до лечения: а – “монетные столбики” эритроцитов при увеличении $\times 1000$ раз; б – частицы нанометрового размера на поверхности эритроцита при увеличении $\times 10000$ раз

боты АСМ: размеры области сканирования 50×50 мкм (512 точек), 5×5 мкм (512 точек); скорость сканирования 0,5 Гц, 0,25 Гц, значения которых были выбраны из-за неоднородностей рельефа. При всех измерениях использовали кантилевер NSG 10 с радиусом кривизны не больше 10 нм. АСМ-изображение регистрировали при помощи программного обеспечения Nova и ImageAnalysis фирмы NT-

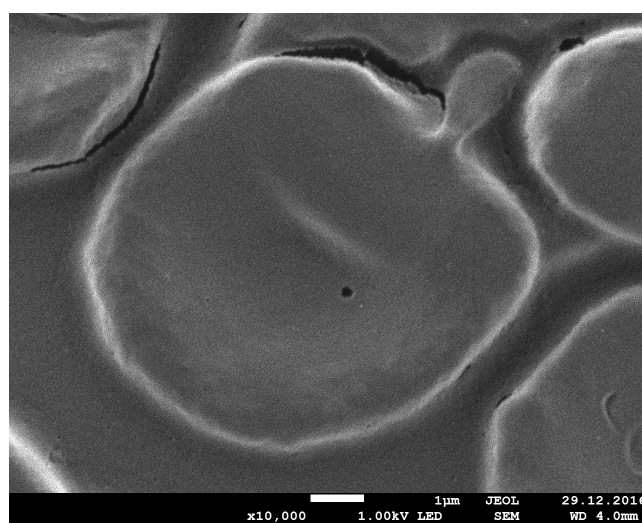
МДТ. Для оценки неровностей рельефа эритроцитов и толщины использована линейка S1.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования были получены изображения эритроцитов в мазках крови пациентов с гломерулонефритом до и после лечения в течение месяца (рис. 1 и 2). Установлено, что до лечения в крови больных



а



б

Рис. 2. РЭМ-изображения образца крови в случае гломерулонефрита: а – эритроциты при увеличении $\times 1000$ раз; б – эритроцит с “наростом” с нанометровыми структурами на поверхности при увеличении $\times 10000$

наблюдаются большое количество сцепленных эритроцитов, так называемых “монетных столбиков” (рис. 1а), а также большое количество наноразмерных структур (НС) в среднем до 850 частиц на поверхности эритроцита, в то время как в плазме крови НС наблюдаются в незначительном количестве (рис. 1б). После курса лечения наблюдается существенное уменьшение “монетных столбиков” (рис. 2а) и заметное сокращение количества НС на поверхности эритроцитов до 100 единиц на поверхности одного эритроцита (рис. 2б).

Установлено (рис. 3, 4), что на поверхности клетки локализованы в большом количестве НС размером 45–50 нм и в меньшем количестве НС размером 100–300 нм, имеющие, по мнению авторов, органическое происхождение и являющиеся диэлектриками. Частицы данных размеров в существенно меньшем количестве присутствуют также и на подложке. Важно, что НС с размером частиц 45–50 нм сравнимы с размерами вируса папилломы человека (Papillomavirus) 50–55 нм, лишенных внешней оболочки и капсиды которых имеют сходные размеры [1]. Этим же размерам соответствуют размеры вирусов гепатита С, имеющих суперкапсиды. Более крупные частицы размером от 100–300 нм соответствуют размерам вириона герпеса.

Анализ РЭМ-изображений показал, что за время лечения в течение месяца количество эритроцитов на поверхности эритроцитов и на подложке изменяется: если в образцах крови в момент поступления пациента в клинику большое количество светящихся объектов на поверхности самих эритроцитов и незначительное их количество на плазме крови, то в конце терапии существенно изменилось соотношение количеств нанообъектов на поверхности эритроцитов и подложке таким образом, что количество наноструктурных частиц стало меньше на поверхности эритроцитов и больше на поверхности плазмы с общим сокращением количества частиц на них (рис. 5).

Также обнаружено, что при гломерулонефрите наблюдаются в достаточно большом количестве (примерно 40–45 % эритроцитов) дисморфных эритроцитов – эллиптоциты (овалоциты) – эритроциты овальной формы (составляют примерно 30 % из общей массы эритроцитов), которые в норме составляют менее 1 % всех клеток, а также присутствуют эхиноциты (составляют примерно 15 % из общей массы эритроцитов) и в меньшем количе-

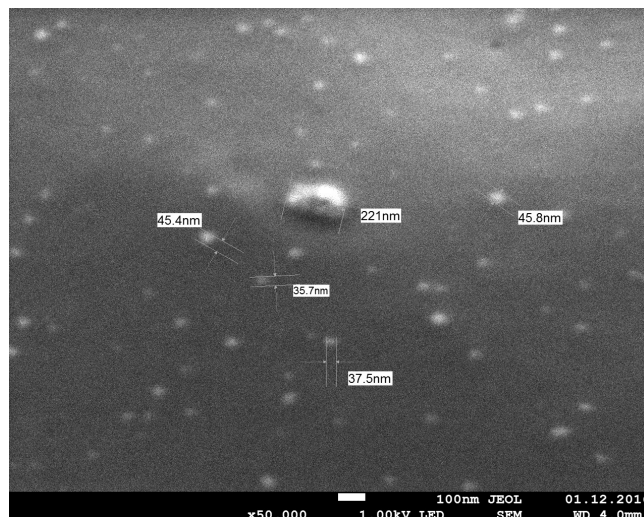


Рис. 3. РЭМ-изображение нанометровых частиц на поверхности эритроцита образца крови в случае гломерулонефрита при увеличении $\times 50000$ раз с указанием их размеров

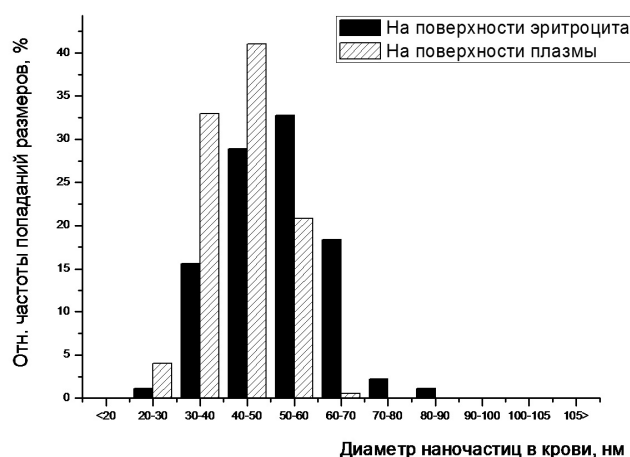


Рис. 4. Распределение линейных размеров нанометровых частиц на поверхности эритроцита

стве встречаются эритроциты с наростами и полутени (рис. 6).

С помощью АСМ установлено наличие нанометровых структур на поверхности эритроцитов с линейными размерами, соответствующими размерам НС, полученным с помощью РЭМ. Поперечные размеры НС соответствуют размерам вирусов.

Итак, методом РЭМ в работах [2–4] и в настоящем исследовании, а также методом АСМ установлено, что на поверхности эритроцитов

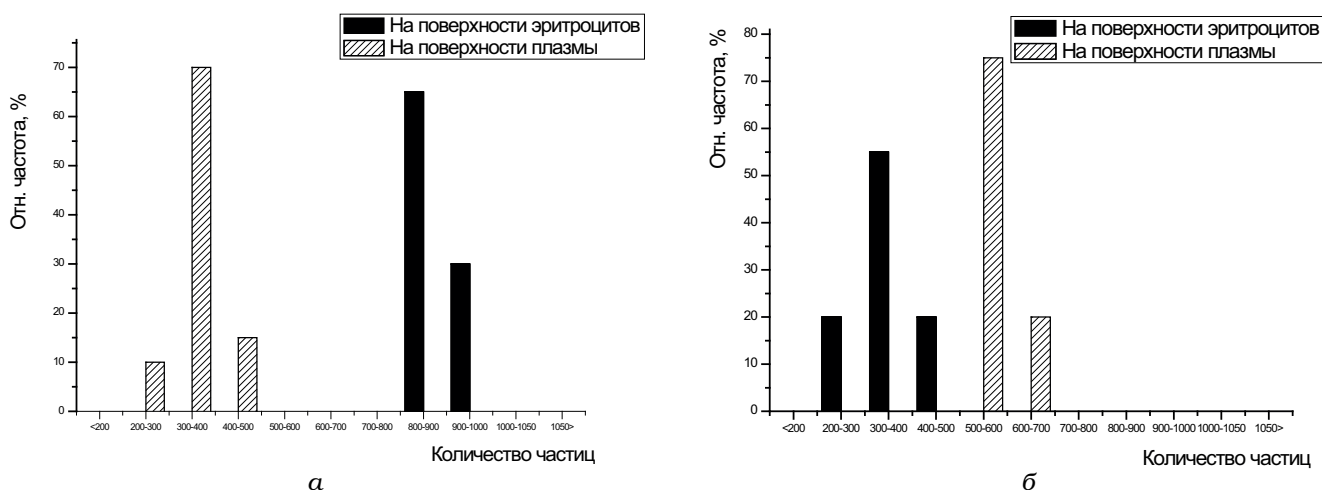


Рис. 5. Распределение количества частиц на поверхности эритроцита и поверхности плазмы: а – в момент поступления пациента в стационар; б – после проведения терапии в течение месяца

при Iga-нефропатии и в случае гломерулонефрита без подтверждения Iga присутствуют нанометровые объекты, размеры которых варьируют от 45–55 нм и до 200–300 нм и, вероятно, близки к размерам известных вирусов.

Известно, что эритроциты имеют отрицательный поверхностный заряд, способствующий, видимо, их кулоновскому отталкиванию благодаря наличию на их поверхности сиало-

вых кислот. Некоторые виды вирусов, например так называемые оболочечные вирусы, имеют дополнительные липидные оболочки (суперкапсиды) с мембранными белками поверх капсидов, представляющие собой одинаковые белковые субъединицы (ВИЧ, вирус герпеса, вирус гепатита С) с поверхностным зарядом, зависящим от рН среды. Известно, что суммарный заряд белка при рН выше изоэлектрической точки является положительным, и, наоборот, при рН выше изоэлектрической точки общий заряд белка — положительный [1].

Кроме того, у большинства вирусов гликопротеиды формируют “шипы” на поверхности вирусной частицы, длина которых достигает 7–10 нм. Шипы представляют собой морфологические субъединицы, построенные из нескольких молекул одного и того же белка. Возможно, благодаря поверхностному заряду, формирующимся на поверхности шипов, происходит прикрепление вирусных частиц к поверхности эритроцитов при определенных величинах рН.

Возможно, фиксация определенных вирусных частиц к эритроцитам крови и их транспортировка является одной из причин возникновения гематурии при определенных заболеваниях почки. В процессе функционирования почек происходит вывод из организма дисморфных эритроцитов с прикрепленными к ним НС, предположительно вирусами [2–4].

Согласно полученным результатам, при Iga-нефропатии гломерулонефрита на поверхности эритроцита наблюдаются нанометровые

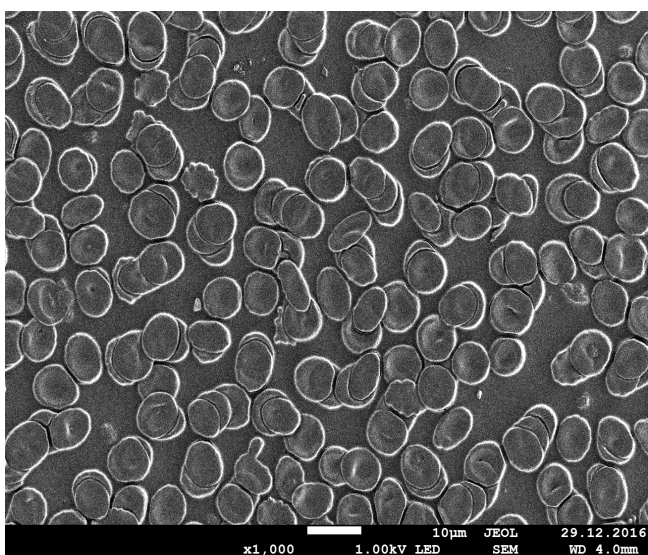


Рис. 6. РЭМ-изображение эритроцитов в случае гломерулонефрита при увеличении $\times 1000$: наблюдаются эллиптоциты, эхиноциты, эритроциты с наростами и полутени овалоцитов

частицы, размер которых соответствует размерам определенных вирусов. Вероятно, эритроциты могут быть одним из механизмов переноса вируса в почечную систему, что запускает патологический процесс в почке.

В случае гломерулонефрита мы исследовали это явление в динамике: в ходе терапии уменьшается количество транспортируемых наночастиц на поверхности эритроцитов, а в плазме крови их количество увеличивается, при этом в среднем увеличивается их линейный размер. В РЭМ-изображениях наблюдаются также преобладание тех или иных форм эритроцитов в зависимости от вида заболевания, их количественное соотношение в общей массе эритроцитов.

Обнаруженные в ходе исследования изменения формы эритроцитов, вероятно, обусловлены изменением поверхностного заряда эритроцитов вследствие прикрепления к ним достаточно большого количества вирусных частиц противоположного знака. Наличие при патологии большого числа связанных эритроцитов ("монетных столбиков"), которое снижается при терапии, также можно объяснить влиянием электростатического поля эритроцита с отрицательно заряженной поверхностью и уменьшением кулоновского отталкивания, приводящее к образованию конгломератов эритроцитов.

В дальнейшем для проведения комплексной диагностики заболевания необходимо определить общий заряд поверхности эритроцита с учетом заряда прикрепленных вирусных частиц в зависимости от вида заболевания и определить взаимосвязи предполагаемых значений зарядов с формами измененных эритроцитов. Кроме того, сходство результатов, полученных в исследованиях [2–4] при подтвержденном случае Iga-нефропатии методом биопсии почки и в настоящем исследовании в случае гломерулонефрита без проведения биопсии, можно оценить как то, что данный вид гломерулонефрита может быть рассмотрен как Iga-гломерулонефрит.

Заключение

Итак, в экспериментальных исследованиях морфологии эритроцитов крови с применением высокотехнологичного традиционного

физического оборудования доказано, что при различных видах заболеваний с синдромом гематурии, в том числе при сложно диагностируемом и редко встречающемся виде гематурии – при Iga-нефропатии, так называемой болезни Берже, – наблюдается наличие различных дисморфных эритроцитов, имеющих преобладающее количество наночастиц с разными линейными размерами, имеющие тенденцию изменять их количество в зависимости от времени проведения терапии. В дальнейшем данные методы исследования могут быть внедрены в клиническую практику для диагностики и мониторинга лечения различных видов заболеваний. Применение традиционного физического оборудования в медицинских исследованиях способствует расширению границ его применимости, которое является одной из целей медицинской физики. При этом появляется возможность представления рекомендаций по улучшению качества работы оборудования и технологических усовершенствований производителям оборудования, или технической адаптации этого оборудования для применения его в области медицины.

Список литературы

1. Ковалев Н.А., Красочко П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека. – Минск: Беларус. наука. 2012. 426 с.
2. Максимов Г.В., Мамаева С.Н., Антонов С.Р. и соавт. Измерение морфологии эритроцитов методом электронной микроскопии для диагностики гематурии // Метрология. Приложение к журналу Измерительная техника. 2016. № 1. С. 47–52.
3. Maksimov G.V., Mamaeva S.N., Antonov S.R. et al. Measuring Erythrocyte Morphology by Electron Microscopy to Diagnose Hematuria // Measurement Techniques. 2016. Vol. 59. № 3. P. 327–330.
4. Мамаева С.Н., Мунхалова Я.А., Кононова И.В. и соавт. Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии // Вестник Мордовского унив. 2016. Т. 26. № 3. С. 381–390.

**INVESTIGATION OF BLOOD ERYTHROCYTES IN CHILDREN'S RENAL DISEASE
WITH HEMATURIA BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY
AND ATOMIC FORCE MICROSCOPY**

S.N. Mamaeva¹, G.V. Maximov², C.R. Antonov¹, Ya.A. Munkhalova¹, A.A. Djakonov¹, P.V. Vinokurov

¹ Ammosov Nord-Ost Federal University, Yakutsk, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The morphology of erythrocytes for patients using the methods of scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) was investigated. The original results using the methodology of the study of cells and nanoparticles with the use of SEM without spraying conductive coatings are obtained. The proposed method made it possible to explore by means of the SEM the dynamics of the morphology of red blood cells, for example, glomerulonephritis, depending on the treatment with simultaneous analysis of blood samples by AFM. The method SEM with AFM may be use for differential diagnosis of types of hematuria in children.

Key words: *red blood cells, hematuria, electron microscopy, atomic force microscopy*

E-mail: sargylana_mamaeva@mail.ru