

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА МОРФОЛОГИЮ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ДЕТЕЙ С ГЕМАТУРИЕЙ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

С.Н. Мамаева¹, Г.В. Максимов^{2,4}, С.Р. Антонов¹, В.А. Платонова¹, А.С. Гольдерова¹,
И.В. Кононова³, Я.А. Мунхалова¹, Н.А. Николаева¹, Т.М. Лебедева¹

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

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

³ Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск

⁴ “Национальный исследовательский технологический университет “МИСиС”,
Москва

С помощью электронной и оптической микроскопии исследованы изменения морфологии эритроцитов больных с гематурией в условиях постепенного и быстрого снижения температуры. Установлено, что при снижении температуры количество поврежденных эритроцитов у больных больше, чем в контроле. Выявлены различия в характере и скорости разрушений мембран эритроцитов в норме и при патологии. По мнению авторов, полученные результаты могут служить основой для формирования новых подходов в комплексной дифференциальной диагностике заболеваний почек у детей с гематурией.

Ключевые слова: эритроциты, оптическая и электронная микроскопия, гематурия, низкие температуры, разрушение морфологии

Введение

В настоящее время дифференциальная диагностика заболеваний почек у детей с синдромом гематурии разработана недостаточно [1–5]. Ранее нами были проведены исследования морфологии эритроцитов детей с гематурией методами растровой электронной и атомно-силовой микроскопии, а также исследование ИК-спектров образцов крови и моделирование электрических свойств эритроцитов в норме и патологии. В ходе проведенных исследований при патологии на поверхности эритроцитов были обнаружены наночастицы, схожие по размерам с вирусами, а также выявлены харак-

терные особенности дисморфии эритроцитов в зависимости от видов заболеваний почек [6–10].

В данной работе были исследованы эритроциты при заболеваниях почек у детей с макрогематурией наряду с исследованием эритроцитов крови другой возрастной группы с заболеваниями почек, а также проведено сравнение эритроцитов крови пациентов с раком шейки матки с целью формирования новых дополнительных подходов в комплексной дифференциальной диагностике этих заболеваний.

Для достижения цели в данной работе решается более узкая задача исследования осо-

бенностей изменения морфологии эритроцитов при постепенном охлаждении (ПО) и быстрой заморозке (БЗ) крови с помощью оптической и растровой электронной микроскопии.

Материал и методы

Объектами исследования при ПО служили образцы крови донора (женщина 21 года) и больной мезангиопролиферативным гломерулонефритом 22 лет, а при БЗ – образцы крови 4 детей с заболеваниями почек, проходящих лечение в Республиканской больнице №1 Республики Саха (Якутия) и контрольной группы, состоящей из трех добровольцев в норме 14, 17 и 39 лет, а также 4 пациентов с раком шейки матки Якутского республиканского онкологического диспансера. Такой состав исследуемых и контрольных групп был выбран для выявления разницы в динамике изменения морфологии в зависимости от температуры при патологии различных органов и возрастных групп.

Мазки крови, смешанной с антикоагулянтом ЭДТА, фиксировали на стеклянной подложке. Температуру образца крови уменьшали с помощью размещения пробирки в воду со льдом и хладогенами (аккумуляторы холода Camping World Iceblock и Ezetil Ice Akku), и регистрировали внутри пробирки термометром Multilogger Thermometr NH506RA. При определенных температурах кровь из пробирки наносилась на чистое, обезжиренное, сухое предметное стекло. Полученные мазки высушивались на воздухе.

При мгновенной (шоковой) заморозке (БЗ) мазки крови выдерживали в парах жидкого азота. Использовали кровь контрольной груп-

пы (14–17 лет) и детей с гематурией возрастной группы от 14 до 16 лет. В ходе пробоподготовки готовились мазки крови на стеклянной подложке, высохшие мазки крови выдерживали в сосуде с жидким азотом (при температуре -196°C), и сразу после выравнивания температуры объекта и охлаждающей жидкости (на что указывает остановка интенсивного кипения азота) извлекались из жидкого азота и выдерживались в камере под определенным углом при комнатной температуре $18\text{--}20^{\circ}\text{C}$.

Морфологию эритроцитов мазков крови исследовали с помощью растрового электронного микроскопа JOEL JSM-7800F (РЭМ) с разрешением 1,2 нм при 1 кВ для рабочего отрезка 10 мм, оптических микроскопов Olympus BH-2 с высокой разрешающей способностью (900 линий на миллиметр) и Eclipse LV100 Nikon с разрешающей способностью 300 линий на мм. Изучение крови с помощью РЭМ проводили при ускоряющих напряжениях 1 и 2 кВ с подачей напряжения на исследуемый объект 8–10 В без проводящего покрытия [6–8].

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента сопоставляли морфологию эритроцитов больных и здоровых людей при разных температурах. На рис. 1 представлены изображения эритроцитов крови женщины из контрольной группы при температуре $18,4^{\circ}\text{C}$. Из 62 эритроцитов в поле зрения на РЭМ-изображении количество нормоцитов составляет 64 %, овалоцитов – 33 %, эхиноцитов – 2 %, акантоцитов – 1 %.

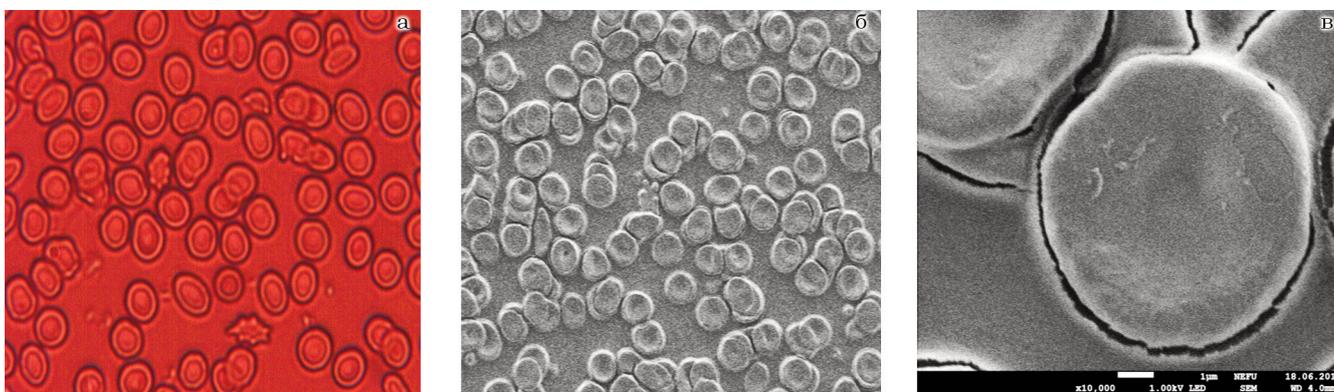


Рис. 1. Фотографии эритроцитов крови донора при $18,4^{\circ}\text{C}$: а) на оптическом микроскопе Olympus BH-2 при увеличении в 1 000 раз; б) на РЭМ при увеличении в 1 000 раз; в) на РЭМ при увеличении в 10 000 раз

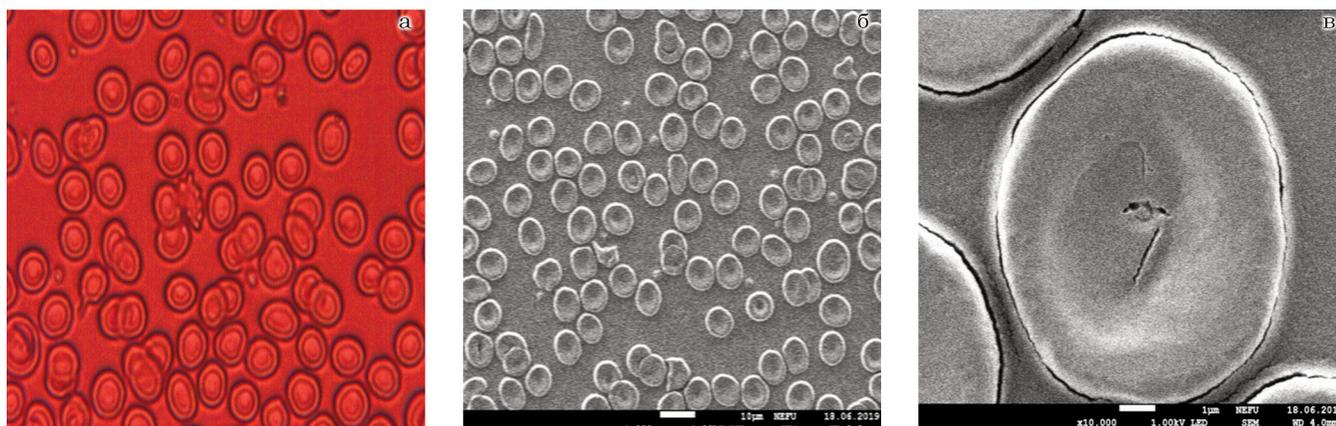


Рис. 2. Фотографии эритроцитов крови донора при $6,1^{\circ}\text{C}$: а) на оптическом микроскопе Olympus BH-2 при увеличении в 1 000 раз; б) на РЭМ при увеличении в 1 000 раз; в) на РЭМ при увеличении в 10 000 раз

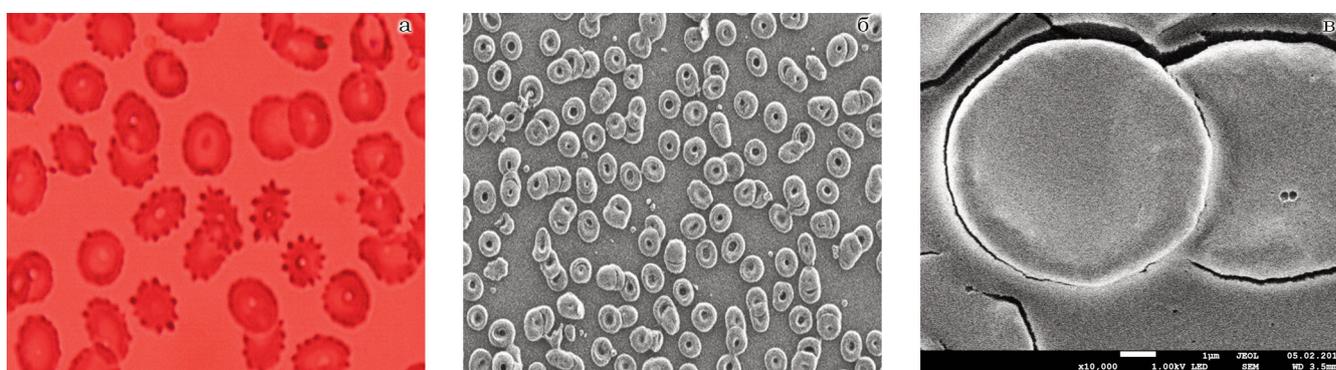


Рис. 3. Фотографии эритроцитов крови донора крови при $0,4^{\circ}\text{C}$: а) на оптическом микроскопе Olympus BH-2 при увеличении в 1 000 раз; б) на РЭМ при увеличении в 1 000 раз; в) на РЭМ при увеличении в 10 000 раз

При снижении температуры до $6,1^{\circ}\text{C}$ наблюдается увеличение количества дисморфных эритроцитов (рис. 2). Из 84 эритроцитов овалциты составляют 54 %, нормоциты – 43 %, акантоциты – 1 %, шизоциты – 1 %, пойкилоциты – 1 %.

При снижении температуры до $0,4^{\circ}\text{C}$ все эритроциты дисморфны (рис. 3). В поле зрения РЭМ-изображения из 41 эритроцита эхиноциты составляют – 64 %, клетки-мишени – 36 %.

В следующей серии экспериментов исследовали изменения морфологии крови больной мезангиопролиферативным гломерулонефритом (рис. 4). При температуре 19°C из 97 эритроцитов нормоциты составляют 73 %, овалциты – 16 %, сфероциты – 7 %, эхиноциты – 4 %. Кроме изменения формы наблюдаем образование так называемых монетных столбиков.

При 19°C на поверхности эритроцита больного пациента наблюдается глубокая впадина в виде продолговатой формы, размер которой составляет $4,78 \times 0,79$ мкм (рис. 4в). Также на поверхности эритроцита наблюдается вогнутость, представляющая собой углубление почти овальной формы, размер которого составляет $2,32 \times 1,68$ мкм (рис. 4г).

При температуре $11,7^{\circ}\text{C}$ (рис. 5а и б) меняется форма эритроцитов, исчезает вогнутость. К тому же из 109 эритроцитов наблюдается выраженный пойкилоцитоз (вариабельность эритроцитов по форме) – 76 %. Встречается анизоцитоз эритроцитов (вариабельность эритроцитов по размеру) и присутствие сфероцитов – 24 %.

При достижении температуры 5°C выявлены эритроциты различных форм (рис. 5в и г). Из 128 эритроцитов 34 % составляют акан-

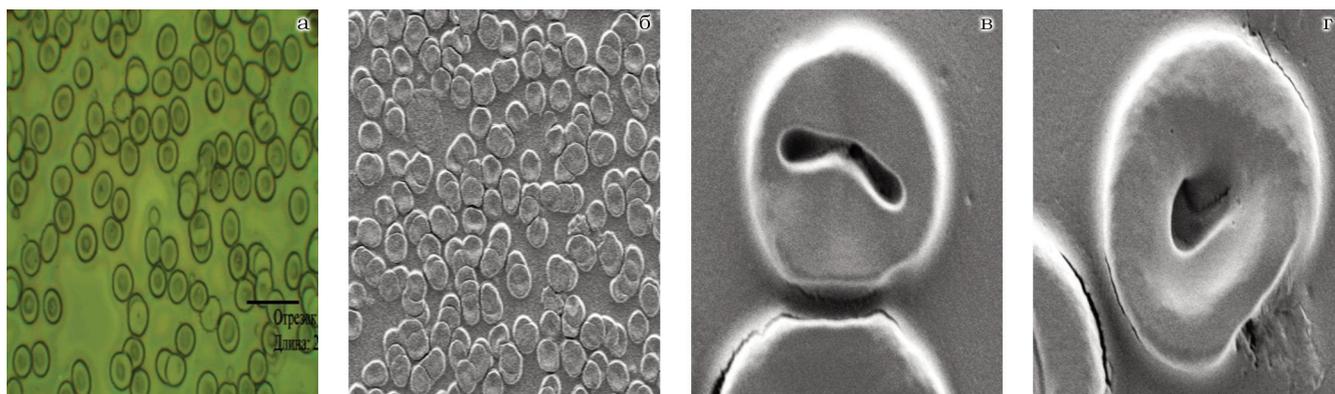


Рис. 4. Фотографии эритроцитов крови больной мезангиопролиферативным гломерулонефритом при 19°C: а) на оптическом микроскопе Eclipse LV100 Nikon при увеличении в 1 000 раз; б) на РЭМ при увеличении в 1 000 раз; в-г) на РЭМ при увеличении в 10 000 раз

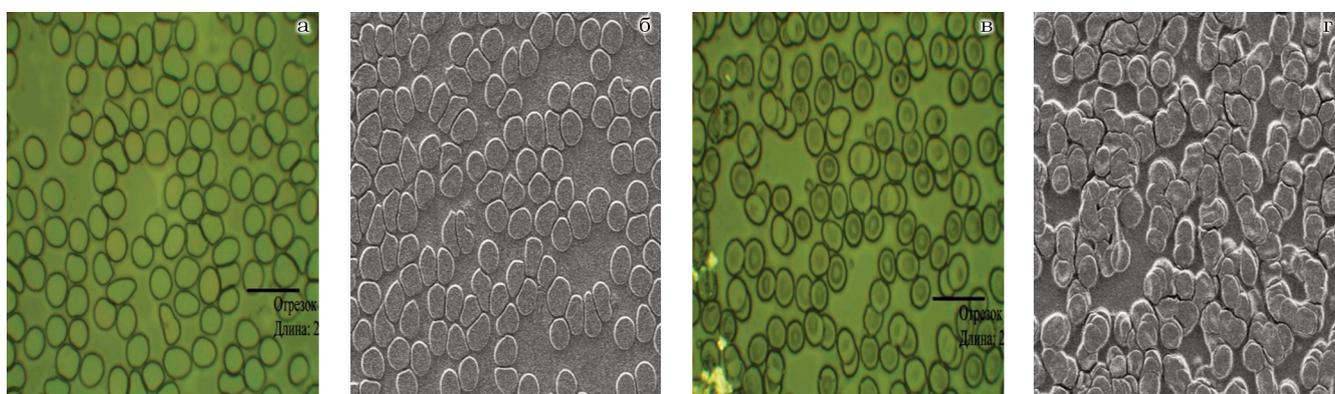


Рис. 5. Фотографии эритроцитов крови больной мезангиопролиферативным гломерулонефритом при 11,7°C: а) на оптическом микроскопе Eclipse LV100 Nikon при увеличении в 1 000 раз; б) на РЭМ при увеличении в 1 000 раз. Фотографии эритроцитов крови больного мезангиопролиферативным гломерулонефритом при 5°C: в) на оптическом микроскопе Eclipse LV100 Nikon при увеличении в 1 000 раз; г) на РЭМ при увеличении в 1 000 раз

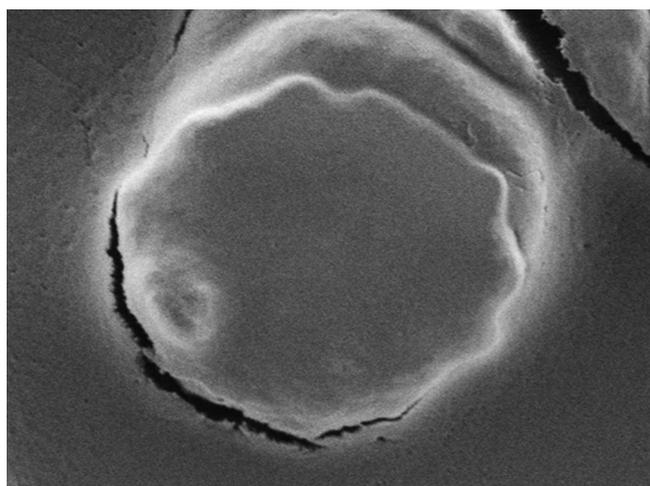


Рис. 6. Фотография эритроцита крови больной мезангиопролиферативным гломерулонефритом при 5°C, полученная с помощью РЭМ при увеличении в 10 000 раз

тоциты, клетки-мишени – 27%, дискоциты – 18%, овалциты – 11 %, сфероциты – 10 %. На изображениях присутствуют монетные столбики. При этом выявлены существенные изменения в морфологии клетки, наблюдается уплощенный эритроцит, т.е. исчезает вогнутость и обретает дегенеративно – измененную форму (рис. 6).

В следующей серии экспериментов исследовали изменения морфологии эритроцитов у больных детей с гематурией и контрольной группы в модельных условиях “заморозки–разморозки” крови. Исследуемую венозную кровь в виде мазков замораживали методом шоковой заморозки с использованием жидкого азота.

После проведения цикла “заморозки–разморозки” были изучены мазки крови с помощью электронного микроскопа. В результате исследования для контрольной группы измене-

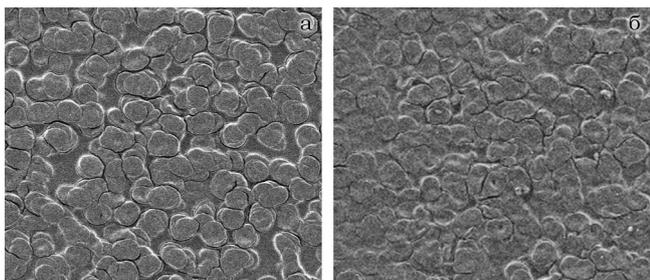


Рис. 7. РЭМ-снимки мазков крови контрольной группы до и после БЗ при увеличении в 1 000 раз

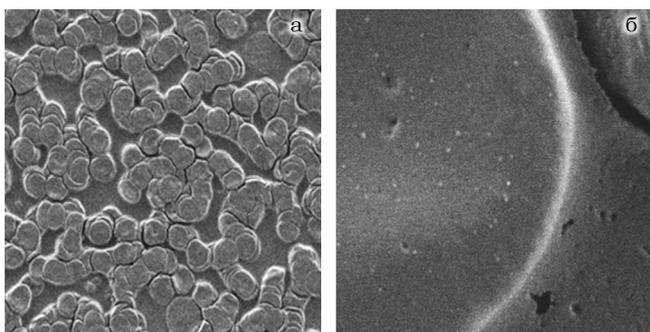


Рис. 8. РЭМ-изображения эритроцитов мазков крови детей с гематурией до БЗ: а) при увеличении в 1 000 раз; б) при увеличении в 20 000 раз

ния морфологии эритроцитов не выявлены. Полученные снимки представлены на рис. 7.

На рис. 8 представлены изображения эритроцитов детей с гематурией до заморозки.

Видно, что до заморозки повреждения морфологии эритроцитов не наблюдаются (рис. 8).

При увеличении в 20 000 раз до заморозки на поверхности эритроцитов больных гематурией наблюдаются наноразмерные частицы (рис. 8б).

Однако у больных детей с гематурией при цикле “заморозка–разморозка” происходят повреждения мембраны эритроцита в виде глубоких разрезов. Полученные результаты представлены на рисунках (рис. 9). При исследовании эритроцитов с помощью оптического микроскопа также были обнаружены изменения мембраны эритроцита (рис. 9а).

При исследовании морфологии эритроцитов с помощью электронного микроскопа ($\times 1000$) были выявлены повреждения мембраны, а при большем увеличении ($\times 10\ 000$ и $\times 20\ 000$) установлено, что повреждения мембраны эритроцита имеет форму глубоких разрезов с примерным размером $0,2 \times 3,2$ мкм в центре эритроцита. Известно, что основная проблема замораживания клеток крови заключается в кристаллизации внутриклеточной воды [9, 10]. Вероятно, кристаллы с острыми краями разрезают мембраны и содержимое клеток, необратимо повреждая их. При обработке эритроцитов жидким азотом в их тонком слое замораживание клеток происходит без формирования кристаллов. Возможно, поэтому характер повреждения имеет форму разреза, а не раскрытой рваной формы. Отметим, что при увеличении ($\times 10\ 000$ и $\times 20\ 000$) на поверхности эритроцитов не выявлено наноразмерных объектов, которые наблюдались до заморозки.

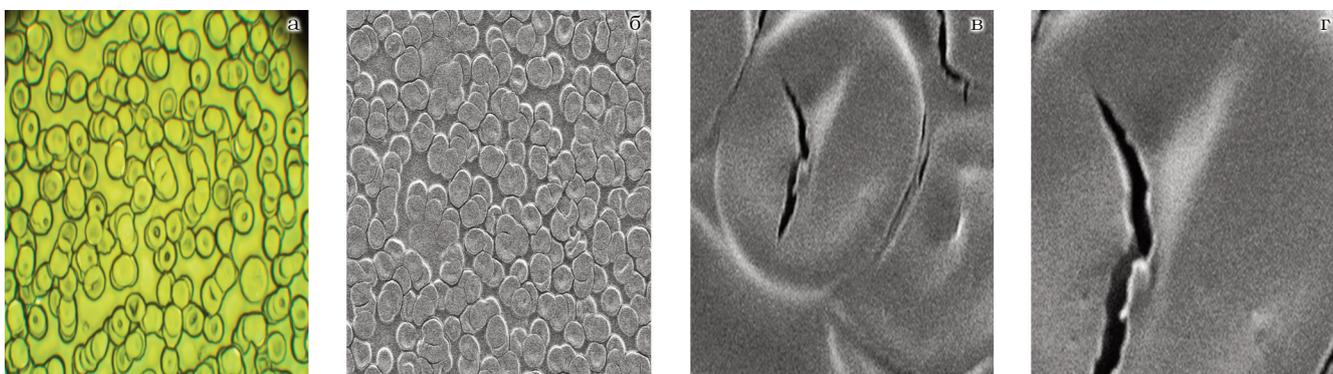


Рис. 9. Изображения эритроцитов мазка крови ребенка с гематурией, полученных после БЗ с помощью: а) оптического микроскопа Eclipse LV100 Nikon при увеличении в 1 000 раз; б) РЭМ при увеличении в 1 000 раз; в) РЭМ при увеличении в 10 000 раз; г) РЭМ при увеличении в 20 000 раз

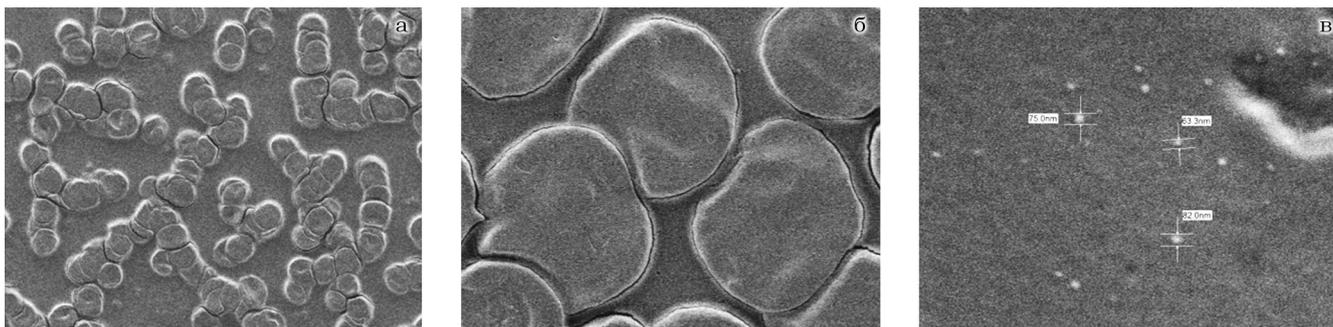


Рис. 10. РЭМ-изображения эритроцитов крови больных с РШМ до заморозки при увеличении: а) в 1 000 раз; б) в 5 500 раз; в) в 40 000 раз

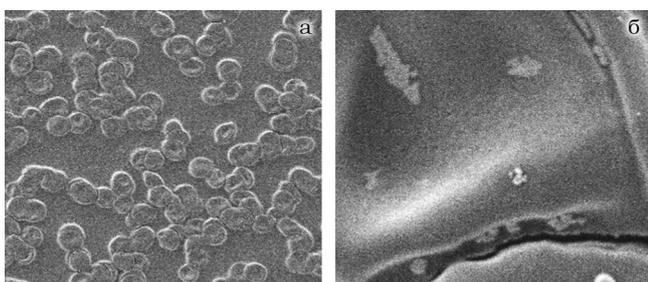


Рис. 11. РЭМ-изображения эритроцитов крови и поверхности эритроцита больных с РШМ после цикла заморозки-разморозки при увеличении соответственно: а) в 1 000 раз; б) в 20 000 раз

В следующей серии экспериментов исследовали морфологию эритроцитов крови больных с раком шейки матки (РШМ) в условиях цикла “заморозка–разморозка” (рис. 10, 11). Полученные РЭМ изображения эритроцитов больных с РШМ до заморозки не выявили изменений мембраны ($\times 1000$), в то время как в случае заболеваний с гематурией на поверхности 2–5 эритроцитов в поле зрения при увеличении в 1000 раз наблюдаются разрезы (трещины). Также такие разрезы на поверхности эритроцитов отсутствуют и у контрольной группы. У всех пациентов с РШМ до БЗ изначально на поверхности эритроцитов обнаружены нанообъекты с размерами от 30 до 135 нм (рис. 11). Установлено, что после проведения цикла “заморозка–разморозка” морфология эритроцитов не изменилась.

При более высоком увеличении обнаружено, что на поверхности клетки появились хлопьевидные образования, линейные размеры которых сильно варьируют: от 0,3 до 1,6 микрон. Отметим что число наноразмерных структур на поверхности клетки, которые были

обнаружены до цикла, существенно снизилось. В одном из образцов крови нанообъекты вообще не обнаружены, но на поверхности плазмы видны хлопьевидные образования (рис. 11б).

Итак, в ходе проведенного исследования ПО было показано, что изменение морфологии эритроцитов происходит в несколько этапов в зависимости от температурного режима их обработки. В начале наблюдаются изменения нормоцитов, а затем возникают изменения в мембране клетки. Кроме того, в венозной крови здорового человека при снижении температуры выраженные патологические формы эритроцитов не наблюдаются по сравнению с существенным изменением морфологии эритроцитов больного человека.

В процессе цикла “БЗ” проявляются отличия в эритроцитах в норме и патологии и в зависимости от заболевания: наблюдаются повреждения поверхности эритроцитов у больных с гематурией и образования неизвестной природы на поверхности эритроцитов пациентов с РШМ, в то время как отсутствуют изменения поверхности эритроцитов у контрольной группы.

На основе полученных данных, по мнению авторов, можно сделать предположение, что повреждению и нарушению поверхности в большей степени подвергаются эритроциты крови больных, при чем характер этих повреждений зависит, по всей видимости, от вида заболевания. Возможно, что на основе дальнейших исследований с большим количеством образцов и экспериментов, можно будет предположить, что повреждения и изменения рельефов эритроцитов определенного характера в условиях представленных экспериментов могут послужить в качестве дополнительных па-

раметров в дифференциальной диагностике заболеваний.

В результате изучения особенностей морфологии эритроцитов при постепенном охлаждении и при шоковой заморозке жидким азотом, на РЭМ и оптических микроскопах, мы установили, что РЭМ позволяет получить дополнительно больше информации о наличии наночастиц, рельефе поверхности и формах эритроцитов. В частности, установлено, что нанобъекты, выявленные на поверхности эритроцитов до заморозки, являются инородными частицами, закреплёнными на поверхности эритроцитов.

При проведении экспериментов обоих видов эритроциты больных с определенным диагнозом, которые выглядели визуально нормальными при нормальных температурных условиях, подвергаются более существенным изменениям, чем эритроциты крови контрольной группы. Использование РЭМ позволило установить, что повреждения эритроцитов при разных патологиях в условиях шоковой заморозки, а именно при РШМ и заболеваниях почек с гематурией, существенно отличаются. Вероятно, исследование крови больных в данных температурных условиях позволяет получить дополнительную информацию для разработки дифференциальной диагностики различных заболеваний и прояснения их этимологии.

Список литературы

1. Папаян А.В., Соловьев А.А., Стяжкина И.С. IgA нефропатия (болезнь Берже у детей). Лекция. – СПб.: издание ГПИМА, 2001. 34 с.
2. Feehally J., Cameron J.S. IgA Nephropathy: Progress Before and Since Berger // *Amer. J. Kidney Diseases*. 2011. Vol. 58. № 2. P. 310–319.
3. Hall Y.N., Fuentes E.F., Chertow G.M., Olson J.L. Race/ethnicity and disease severity in IgA nephropathy // *BMC Nephrol*. 2004. Vol. 5. P. 10.
4. Мунхалова Я.А., Захарова Н.М., Горохова А.В. Особенности гломерулонефрита ассоциированного с герпес-вирусной инфекцией // Сб. тр. IV Конгресса “Экология и здоровье человека на Севере”. Якутск, 2013 г.
5. Под ред. проф. Н.В. Савиной. – Киров: МЦНИП. 2013. С. 405–409.
5. Горохова А.В., Мунхалова Я.А. Результаты морфологического исследования биоптатов почек у детей с хроническими нефропатиями в РС (Я) // Сб. научн. тр. III съезда педиатров Дальневосточного федерального округа, II съезда детских врачей РС (Я) “Современные проблемы педиатрии” Якутск, 3–4 апреля, 2014 г. Под ред. проф. Н.В. Савиной. – Киров: МЦНИП. 2014. С. 116–122.
6. 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.
7. Мамаева С.Н., Максимов Г.В., Мунхалова Я.А. и соавт. Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии // *Вестник Мордовского университета*. 2016. Т. 26. № 3. С. 381–390.
8. Мамаева С.Н., Максимов Г.В., Мунхалова Я.А. и соавт. Исследование эритроцитов крови с заболеваниями почек с синдромом гематурии с использованием растровой электронной и атомно-силовой микроскопии // *Мед. физика*. 2017. № 1(73), С. 58–62.
9. Мамаева С.Н., Максимов Г.В., Антонов С.Р. и соавт. Моделирование динамики движения эритроцитов крови под воздействием внешнего электрического поля // *Мед. физика*. 2017. № 3(75), С. 69–76.
10. Мамаева С.Н., Максимов Г.В., Мунхалова Я.А. и соавт. Исследование крови детей с синдромом гематурии методом ИК-спектроскопии // *Мед. физика*. 2018. № 3(79). С. 31–35.
11. Meryman H.T. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury // In: *The Frozen Cell*. – London: Churchill, 1970. Vol. 51. P. 10–67.
12. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // *Cryobiology*. 1997, Vol. 8. P. 489–500.

STUDY OF THE MORPHOLOGY OF BLOOD ERYTHROCYTES OF CHILDREN WITH HEMATURIA UNDER THE INFLUENCE OF LOW AND ULTRA TEMPERATURES BY METHODS OF OPTICAL AND ELECTRON MICROSCOPY

S.N. Mamaeva¹, G.V. Maximov^{2,4}, C.P. Antonov¹, V.A. Platonova¹, A.S. Golderova¹,

I.V. Kononova³, Ya.A. Munkhalova¹, N.A. Nikolaeva¹, T.M. Lebedeva¹

¹ M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

² M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Yakutsk Scientific Center for Complex Medical Problems, Yakutsk, Russia

⁴ National Research Technological University "MISiS", Moscow, Russia

Using electron and optical microscopy, the morphology of the erythrocytes of patients with hematuria was studied under model conditions of gradual cooling and shock freezing – thawing of blood. It was established that under the influence of temperature on the blood, the number of damaged red blood cells, depending on the temperature, is greater in patients than in the control group. In addition, there is a difference in the nature and rate of destruction of the membranes of red blood cells in normal and pathological conditions. It is possible that the study and identification of the characteristics of the parameters of these changes in norm and pathology can serve as the basis for the formation of new additional approaches in the complex differential diagnosis of kidney diseases in children with hematuria.

Key words: RBC, optical and electron microscopy, hematuria, low temperature, morphological destruction

E-mail: sargylana_mamaeva@mail.ru