

БИОЛОГИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНА

УДК 612.111.22.-53.086

Бондарь Татьяна Петровна, Мельченко Евгений Александрович**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ
ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ЗВЕНА
ЭРИТРОНА У ДЕТЕЙ**

Использование сканирующего зондового микроскопа позволяет получать сведения о поверхности клетки, ее геометрических показателях, подмембранных структур, что значительно дополняет методы исследования изменений эритроцитов.

Ключевые слова: сканирующая зондовая микроскопия, поверхность мембраны эритроцита, дети, возрастные группы.

Bondar Tatyana Petrovna, Melchenko Evgeniy Aleksandrovich**THE USE OF SCANNING PROBE MICROSCOPY FOR THE ASSESSMENT
OF CHILDREN'S PERIPHERAL LEVEL ERYTHRON**

Using a scanning probe microscope can obtain information on the cell surface, its geometry, have submembrane structures, which greatly complements the methods change erythrocyte.

Key words: scanning probe microscopy, the surface of the erythrocyte membrane, children ages.

Сканирующая зондовая микроскопия является новым методом изучения формы и структуры клеток. Преимуществом сканирующей зондовой микроскопии можно считать получение информации о микро- и наноархитектонике поверхности клетки, а также структур подмембранных слоев, включая цитоскелет (Swihart A. H., Mikrut J. M., Kerttersen J. B., Macdonald R. C., 2002).

Эритроциты играют основную роль в обеспечении организма человека кислородом, представляя собой высокоспециализированную транспортную систему, переносящую кислород от легких к тканям. Изменение формы эритроцитов (пойкилоцитоз) может быть результатом нарушения внутриклеточного обмена или возникать вследствие внешних физико-химических и иммунологических воздействий, то есть клетки могут подвергаться различным обратимым и необратимым трансформациям (Новодержкина Ю. К., Шишканова З. Г., Козинец И. Г., 2004).

Форму эритроцитов исследуют в мазках периферической крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе в световом микроскопе, но данная методика является в большей степени субъективной оценкой формы клеток и имеет достаточно высокий коэффициент вариации. Разработка метода сканирующей зондовой микроскопии положила начало новому периоду в исследовании эритроцитов периферической крови. С помощью данного метода стало возможным исследование морфологических изменений в эритроцитах и получение более полной информации о состоянии эритрона по сравнению с традиционными лабораторными методами (Бондарь Т. П., Запарожцева О. И., Мельченко Е. А. и др., 2010).

Функциональной особенностью детского организма является его ранимость и чувствительность, что определяет не только показатели здоровья, но и оказывает влияние на дальнейшее морфофункциональное развитие ребенка. Одной из интегративных систем, позволяющих проследить сдвиги на различных уровнях функционирования является система крови. Поэтому представляется наиболее возможным оценивать состояние организма по показателям системы крови (Сердюковская Г. Н., Крылова Д. Н., 2003).

В ходе работы изучались возможности применения сканирующей зондовой микроскопии для оценки геометрических характеристик эритроцитов в критические периоды онтогенеза (1, 6-7, 14 лет) у здоровых детей.

Для выполнения поставленных в работе целей и задач нами было обследовано 399 детей разных возрастных групп. На момент проведения обследования в ходе ежегодной диспансеризации все

дети были признаны педиатром здоровыми. Из обследования исключались дети, имеющие острые и хронические заболевания, воспалительные процессы, наследственные болезни.

Группы формировались с учетом классификации периодов детства, предложенной Н. П. Гундобиным.

I группу составили дети в возрасте 1 года, что соответствует периоду раннего детства. В эту группу вошло 156 детей, из которых 88 мальчиков и 68 девочек. II группу составили дети 1-го периода детства возрастом 6-7 лет. В этой группе 177 детей, из которых 99 мальчиков и 78 девочек. III группу составили дети старшего школьного возраста. К этому периоду относятся дети возрастом старше 12-13 лет. Всего было обследовано 66 детей: 43 мальчика и 23 девочки в возрасте 14 лет.

Клеточный состав периферической крови изучали с помощью автоматического гематологического анализатора ADVIA 60, определяли 18 лабораторных показателей, из которых 3 показателя характеризуют состояние периферического звена эритрона: RBC (эритроциты) – количество эритроцитов; HGB (гемоглобин) – концентрация гемоглобина 4 и HCT (гематокрит) – это доля (%) от общего объема крови, которую составляют эритроциты.

Изучение наностроения мембраны эритроцитов периферической крови пациентов осуществлялось при помощи сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) «Интегра Прима». Сканирование участков проводилось в различных режимах полуконтактной атомно-силовой микроскопии, основанной на регистрации параметров взаимодействия колеблющегося кантилевера с поверхностью, с последующей обработкой изображения.

Известно, что количество эритроцитов в периферической крови является важным показателем здоровья человека, так как основной его задачей является обеспечение клеток и тканей кислородом и удаление углекислого газа. Эта функция обеспечивается гемоглобином, который занимает большую часть объема эритроцита и с помощью которого осуществляется транспортировка газов в организме. Гематокритное число является отношением количества эритроцитов и плазмы и основным показателем недостатка или избытка эритроцитов в периферической крови. Этот эритроцитарный индекс указывает на активность и нормальную работу системы эритропоэза. В результате статистического анализа полученных данных установлены некоторые закономерности. Данные количественных эритроцитарных показателей приведены в таблице 1.

Таблица 1

Различия количественных эритроцитарных показателей крови у детей разных возрастных групп ($X \pm m$, $p \leq 0,01$)

Показатель, ед. измерения	Здоровые дети		
	I группа (n=154 чел)	II группа (n=177 чел)	III группа (n=66 чел)
RBC, 10^{12} г/л	4,45 $\pm$ 0,04*	5,3 $\pm$ 0,27	5,42 $\pm$ 0,05***
HGB, г/л	119,38 $\pm$ 0,83*	138,84 $\pm$ 0,63**	141,89 $\pm$ 1,18***
HCT, %	34,27 $\pm$ 0,24*	40,19 $\pm$ 0,2**	44,57 $\pm$ 0,71***

Примечание:

* – достоверные различия между 1 и 2 группой;

** – между 2 и 3 группой;

*** – между 1 и 3 группой.

Как видно из таблицы 1, количество эритроцитов, гемоглобин и гематокрит достоверно ниже у детей в возрасте 1 года, по сравнению как с группой детей 6-7 лет, так и группой 14 лет. При сравнении результатов исследования в группах 6-летних и 14-летних детей достоверной разницы в количестве эритроцитов не наблюдается. В то же время у подростков (14 лет) отмечается достоверно большая концентрация гемоглобина и показатель HCT, что сочетается с данными научной литературы (Ингерлейб М. Б., 2011).

С помощью АСМ удалось получить двух- и трехмерное изображение эритроцитов крови здоровых детей в разных возрастных группах, измерить диаметр и высоту клеток, что невозможно получить с помощью других методов исследования. Изображения клеток представлены на рисунках 1 и 2, результаты статистической обработки полученных данных – в таблице 2.

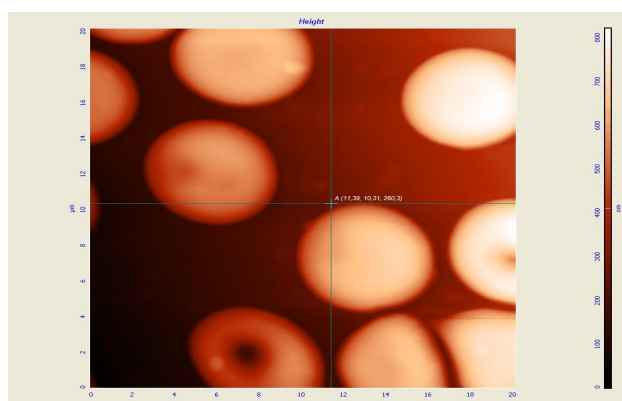


Рис. 1. Двухмерное изображение эритроцитов, полученное при помощи АСМ «Интегра Прима»

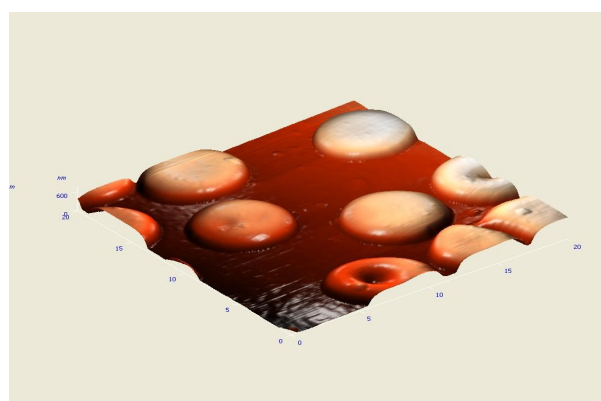


Рис. 2. Трехмерное изображение эритроцитов, полученное при помощи АСМ «Интегра Прима»

В результате статистического анализа полученных сканирующим зондовым микроскопом данных выявлено, что у детей в возрасте 1 года эритроциты имеют достоверно меньший диаметр и высоту по сравнению с детьми старшего возраста. Геометрические показатели (высота и диаметр) эритроцитов у детей одного возраста достоверно не различаются, хотя, как видно из полученных данных, размер клеток у девочек больше, чем у мальчиков. Данные приведены в таблице 2.

Таблица 2

Изменение геометрических эритроцитарных показателей в группах детей 1, 6–7 и 14 лет ($X \pm m$; $p < 0,05$)

Возраст		1 год $X \pm m$	6–7 лет $X \pm m$	14 лет $X \pm m$
Пол	h			
	Мальчики	0,23±0,01	0,27±0,01	0,33±0,02
d	Девочки	0,27±0,02	0,28±0,01	0,34±0,01
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05
h	Мальчики	6,24±0,14	6,52±0,09	7,04±0,05
	Девочки	6,68±0,10	7,03±0,11	6,88±0,06
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05

Таким образом, изучив геометрические характеристики эритроцитов в критические периоды онтогенеза у детей с помощью сканирующей зондовой микроскопии, мы выяснили, что изменения эритроцитов достоверно выявляются только в возрастных группах, но не в половых.

Применение сканирующей зондовой микроскопии является дополнительным методом исследования при выявлении геометрических изменений эритроцитов.

Литература

1. Бондарь Т. П., Запарожцева О. И., Мельченко Е. А. и др. Наноисследование поверхности мембран эритроцитов с нарушенным морфофункциональным состоянием в норме и при сахарном диабете 2 типа // Вестник СГУ. 2010. Вып. 69 (4). С. 219–224.
2. Ингерлейб М. Б. Анализы. Полный справочник. М.: АСТ; Астрель; ВКТ, 2011. 416 с.
3. Здоровье, развитие, личность / под ред. Г. Н. Сердюковской, Д. Н. Крылова и др. М.: Медицина, 2003. 336 с.
4. Миронов В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. М.: Техносфера, 2005.
5. Новодержкина Ю. К., Шишканова З. Г., Козинец Г. И. Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии. М.: Триада-фарм, 2004. 151 с.
6. Swihart A. H., Mikrut J. M., Kerterson J. B., Macdonald R. C. Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton // J. of microscopy. 2002. Vol. 204. P. 212–225.