

© Коллектив авторов, 2017

УДК 616-091.8

DOI:10.23888/PAVLOVJ201716-13

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ СКАНИРУЮЩЕЙ
(АТОМНО-СИЛОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ) МИКРОСКОПИИ
В НАНОГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ
(на примере преэклампсии)**

*Т.В. Павлова¹, Л.А. Павлова¹, В.А. Петрухин², Н.Б. Пилькевич¹,
А.В. Селиванова³, И.С. Сырцева³, А.Н. Каплин⁴*

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский
университет», ул. Победы, 85, 308015, г. Белгород, Российская Федерация (1)
Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии,
ул. Покровка, 22А, 101000, г. Москва, Российская Федерация (2)
Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа,
ул. Некрасова, 8/9, 308007, г. Белгород, Российская Федерация (3)
Курский государственный медицинский университет,
ул. Карла Маркса, 3, 305001, г. Курск, Российская Федерация (4)

С помощью атомно-силовой и электронной микроскопии показано изменение цитоархитектоники эритроцитов у женщин на фоне преэклампсии. Основную группу составили 80 женщин, беременность которых осложнялась преэклампсией. Выявленные данные о патоморфологических изменениях в клетках крови показали, что форма, изменение профиля клетки, а также состояние плазмолеммы эритроцита является диагностическим индикатором тяжести заболевания и приводит к нарушению состояния плода, матери и новорожденного.

Ключевые слова: беременность, преэклампсия, эритроциты, микроскопия.

**THE USAGE OF SCANNING TECHNIQUES (ATOMIC POWER AND ELECTRON)
MICROSCOPY IN NANOGISTOLOGICAL STUDIES
(for example preeclampsia)**

*T.V. Pavlova¹, L.A. Pavlova¹, V.A. Petruhin², N.B. Pilkevich¹,
A.V. Selivanova³, I.S. Syrtseva³, A.N. Kaplin⁴*

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod State National
Research University», Victory str., 85, 308015, Belgorod, Russian Federation (1)
Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology,
Pokrovka str., 22A, 101000, Moscow, Russian Federation (2)
Belgorod Regional Hospital St. Joasaph, Nekrasov str., 8/9, 308007, Belgorod, Russian Federation (3)
Kursk State Medical University, Karl Marx str., 3, 305001, Kursk, Russia (4)

The alteration of cytoarchitectonics of erythrocytes in women on background of preeclampsia was shown with help of atomic power and electron microscopy. The main group consisted of 80 women whose pregnancies complicated by preeclampsia. Identified data on the

pathological changes in the blood cells showed that the shape, change the profile of the cells, as well as state plasmolemma erythrocyte is diagnostic indicator of severity of the disease and leads to disruption of fetal well-being, the mother and the newborn.

Keywords: *pregnancy, preeclampsia, erythrocytes, microscopy.*

Аntenатальная охрана плода – одна из наиболее актуальных задач перинатологии, тесно связанная с проблемами снижения перинатальной заболеваемости и смертности, частота которых в значительной степени зависит от экстрагенитальных заболеваний матери, функции плаценты, характера течения беременности, осложнений родов [1, 2]. Несмотря на многолетнее изучение, преэклампсия по-прежнему остается серьезной проблемой, обусловленной тяжелыми последствиями этого заболевания [3-6]. Инновационные методы в патоморфологии делают возможным получение новых данных для решения клинических вопросов профилактики и коррекции преэклампсии [7-9]. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение эритроцитов женщин, беременность которых осложнена преэклампсией с помощью атомно-силовой и электронной сканирующей микроскопии.

Материалы и методы

В работе использован клинический материал обследования пациенток, беременность у которых осложнялась преэклампсией с умеренно выраженным (50 женщин) и тяжелым (30 женщин) течением (основная группа). Контрольную группу составили 20 беременных. Проводилось изучение акушерского анамнеза, сопутствующей экстрагенитальной патологии, течения беременности и родов. Исследование морфологических свойств эритроцитов выполнено при помощи гемосканирования, эритроцитометрии и элементного анализа форменных элементов крови и проводились в растровом микроскопе «FEI Quanta 200 3D». Кровь на исследование брали из вены в количестве $2,5 \pm 0,5$ мл.

Нами была проведена зондовая и электронная сканирующая микроскопия эритроцитов с использованием больших полей сканирования с выполнением топографии поверхности и их морфометрии. При исследовании в электронном микро-

скопе были изучены различные формы эритроцитов в зависимости от их поверхностной архитектоники и размеров.

Элементный анализ кислорода, осуществляли с использованием детектора для регистрации спектров характеристического рентгеновского излучения фирмы EРAX, которые были интегрированы с растровым электронным микроскопом «Quanta 600 FEG». Помимо этого, проведено изучение тканей с применением атомно-силового микроскопа «Ntegra-Aura». Обработку и построение АСМ-изображений проводили при помощи программного обеспечения «NOVA» (НТ-МДТ, Россия) и «Image Analysis» (НТ-МДТ, Россия).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью Microsoft Excel и Statistica 6.0. В целях определения репрезентативности исследования высчитывался коэффициент вариации ($V < 33\%$), далее применялся t-критерий Стьюдента для оценки значимости расхождения между средними выборочных совокупностей, была оценена однородность исследуемых совокупностей на основе коэффициента вариации.

Результаты и их обсуждение

Результаты гемосканирования показали, что у женщин с преэклампсией эритроциты имели склонность к стазу, сладж-феномену и тромбозу. Основная часть клеток была представлена дискоцитами ($89,71 \pm 2,35$ в контрольной группе, $75,50 \pm 1,25$ при преэклампсии умеренно выраженной и $72,50 \pm 2,31$ – тяжелой). При этом, данный показатель был достоверно выше ($p < 0,05$) в сравнении с группами пациенток без патологии беременности (табл. 1).

Большая часть эритроцитов имела округлую форму. Однако наблюдались клетки вытянутой формы, что может свидетельствовать как о нарушении эластичности мембран, так и затруднении прохождения через микроциркуляторное русло в связи с изме-

Таблица 1

Изменения формы эритроцитов у беременных женщин с преэклампсией

Морфологические формы эритроцитов	Контрольная группа (20)	Преэклампсия умерено выраженная (50)	Преэклампсия тяжелая (30)
Дискоциты (%)	89,71±2,35	70,61±2,44*	62,67±2,01**
Обратимо измененные (переходные) (%)	10,00±1,46	19,06±2,35*	21,00±2,31**
Необратимо измененные: (предгемолитические) (%)	0,15±0,16	6,19±1,10*	10,11±1,67**
Дегенеративные формы (%)	0,15±0,15	4,15±0,56*	7,23±0,82**

* $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

** $p < 0,05$ в сравнении между группами с преэклампсией различной степени тяжести

нением его строения. Увеличивалось содержание цитоплазматических мостиков между клетками, что способствовало в дальнейшем тромбозу сосудов. Происходило нарушение строения плазматических мембран клеток. Изменялась архитектура плазматических отростков.

Нами показано, что содержание микроцитов при преэклампсии средней степени тяжести ($18,20 \pm 1,41\%$) было достоверно

выше в сравнении с контрольной группой ($14,30 \pm 1,52\%$) ($p < 0,05$) (табл. 2). Наблюдалась тенденция к уменьшению их содержания при тяжелом течении заболевания. Содержание макроцитов прогрессивно возрастало ($p < 0,05$) по мере увеличения тяжести заболевания ($1,40 \pm 0,14\%$, $6,30 \pm 0,14\%$ и $15,30 \pm 1,15\%$). Диаметр нормоцитов, макроцитов и микроцитов достоверно не отличался от контрольной группы.

Таблица 2

Соотношение видов эритроцитов у беременных без патологии и с преэклампсией

Соотношение размеров эритроцитов	Контрольная группа (20)	Преэклампсия умерено выраженная (50)	Преэклампсия тяжелая (30)
Микроциты (%)	14,30±1,52	18,20±1,41*	12,20±1,50*
Нормоциты (%)	84,30±1,41	75,50±1,25*	72,50±2,31*
Макроциты (%)	1,40±0,14	6,30±0,14*	15,30±1,15*

* $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Содержание переходных форм эритроцитов достоверно увеличивалось по мере возрастания тяжести заболевания ($19,06 \pm 2,35\%$ и $21,00 \pm 2,31\%$) по сравнению с группой практически здоровых беременных ($10,00 \pm 1,46\%$) ($p < 0,05$) (табл. 1). Так, число эллипсоидных клеток было $3,06 \pm 1,05\%$ при преэклампсии средней тяжести и $4,00 \pm 0,09\%$ – тяжелой. Последний показатель достоверно выше ($p < 0,05$), чем в контрольной группе ($2,50 \pm 0,08\%$). Дискоциты с гребнем составляли при осложненной беременности: $2,40 \pm 0,30\%$ и $2,80 \pm 0,30\%$ ($1,00 \pm 0,09\%$) ($p < 0,05$), клетки в виде плоских

дисков $-3,60 \pm 0,85\%$ и $4,00 \pm 0,09\%$ ($1,00 \pm 0,30\%$) ($p < 0,05$), дискоциты с выростом $-2,50 \pm 0,35\%$ и $2,40 \pm 0,30\%$ ($1,40 \pm 0,04\%$) ($p < 0,05$), дискоциты с множественными выростами – $4,50 \pm 1,05\%$ и $4,60 \pm 0,08\%$ ($2,60 \pm 0,31\%$) ($p < 0,05$), эритроциты в виде «тутовой ягоды» – $3,00 \pm 0,45\%$ и $3,2 \pm 2,39\%$ ($0,50 \pm 2,39\%$) ($p < 0,05$).

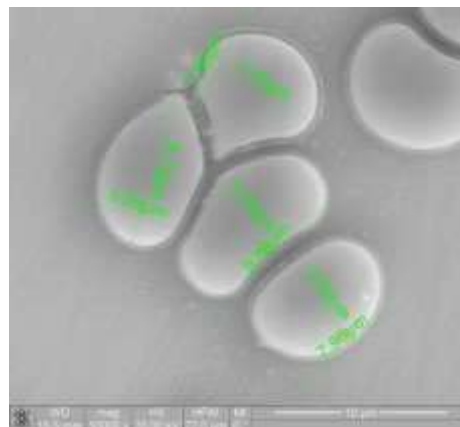
Еще в большей степени, прогрессировало содержание необратимо измененных (предгемолитических) клеток ($0,15 \pm 0,16\%$, $6,19 \pm 1,10\%$ и $10,11 \pm 1,67\%$) ($p < 0,05$). Так, если в контрольной группе куполообразные клетки практически не встречались, то при

преэклампсии в зависимости от тяжести состояния они составляли соответственно $1,40 \pm 0,04\%$ и $3,50 \pm 0,50\%$ ($p < 0,05$). Аналогичная тенденция выявлена при исследовании сферических форм эритроцитов ($1,60 \pm 0,28\%$ и $4,50 \pm 1,30\%$) ($p < 0,05$). Если в контрольной группе наблюдались единичные клетки в виде «спущенного мяча», то при патологии беременности их величина возрас-
 тала до $2,19 \pm 0,15\%$ и $4,11 \pm 1,20\%$

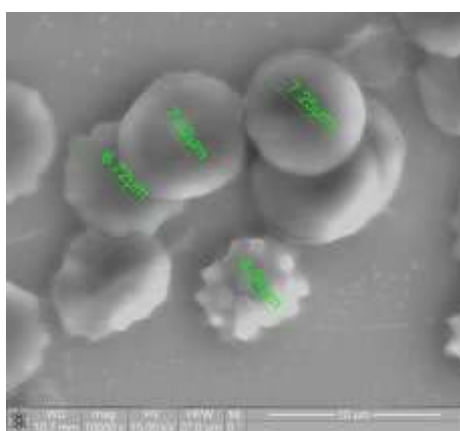
($p < 0,05$). При преэклампсии резко возрас-
 тало содержание дегенеративных форм эритроцитов ($0,15 \pm 0,15\%$, $4,15 \pm 0,56\%$ и $7,23 \pm 0,82\%$) ($p < 0,05$). Все эти виды измененных эритроцитов не подлежат восстановлению. Они относятся к группе необратимо деформированных или предгемолитических. Возрастал уровень разрушенных эритроцитов (рис. 1, 2, 3).



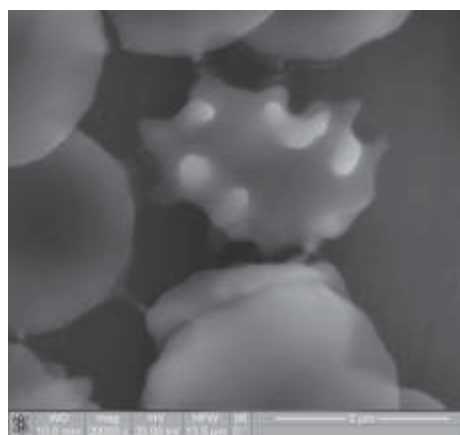
а



б



в



г

Рис. 1. Эритроциты крови у беременных женщин с умерено выраженной преэклампсией РЭМ. рис. а (x5000), рис. б (x10000), рис. в (10000), рис. г (x20000)

Клетки в состоянии стаза, сладжа и начала тромбоза. Дискоциты в виде неправильного овала или с нарушенной формой. Наблюдаются нормоциты, макроциты, микроциты. Содержание клеток с выростами уменьшено. Кривизна центрального углубления различна, как и его глубина. Выявлены необратимо измененные (предгемолитические) эритроциты в виде сферы и «спущенного мяча». Содержание цито-

плазматических мостиков между клетками увеличено.

При изучении поверхности эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что глубина впадины дискоцитов подсчитанная с помощью изучения профиля клетки в среднем составляла $0,30 \pm 0,07 \mu\text{m}$, $0,40 \pm 0,05 \mu\text{m}$, что значительно отличалось от контрольной группы ($0,25 \pm 0,06 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$). При изучении со-

отношения диаметра эритроцита к диаметру впадины данная величина составляла

16 ± 2 и 14 ± 1 единиц (21 ± 2 в контрольной группе) ($p < 0,05$) (табл. 3).

Таблица 3

**Поверхность неизмененных эритроцитов (зондовая микроскопия)
(100% – все эритроциты)**

Размеры эритроцитов	Контрольная группа (20)	Преэклампсия умерено выраженная (50)	Преэклампсия тяжелая (30)
Глубина впадины дискоцитов (μm)	$0,25 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,05$
	21 ± 2	16 ± 2	14 ± 1

* $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

** $p < 0,05$ в сравнении между группами с преэклампсией различной степени тяжести

При изменении нормальной дискоидальной формы на поверхности эритроцитов, наряду с такими структурами, форми-

ровались более крупные выступы. Строение пор было нарушено во всех группах (рис. 2).

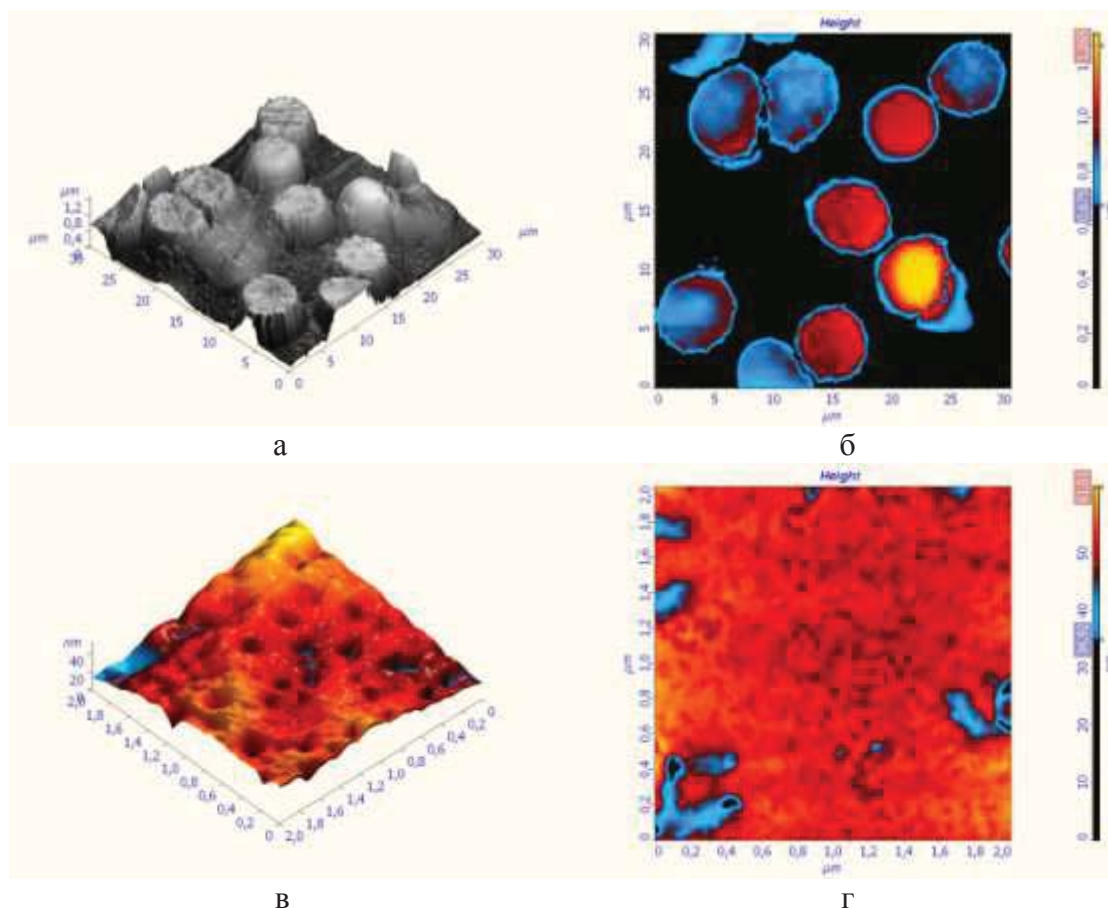


Рис. 2. Эритроциты крови у беременных женщин с тяжелой формой преэклампсии. Дискоциты в форме неправильного овала (а, б). Кривизна и глубина центрального углубления изменена. Наблюдаются клетки куполообразные, в виде сферы и «спущенного мяча». Начало гемолиза клеток (а, б). Строение пор на поверхности эритроцитов нарушено (в, г). Атомно-силовая микроскопия. (рис. а, б – трехмерная гистограмма; рис. в, г – двухмерная гистограмма)

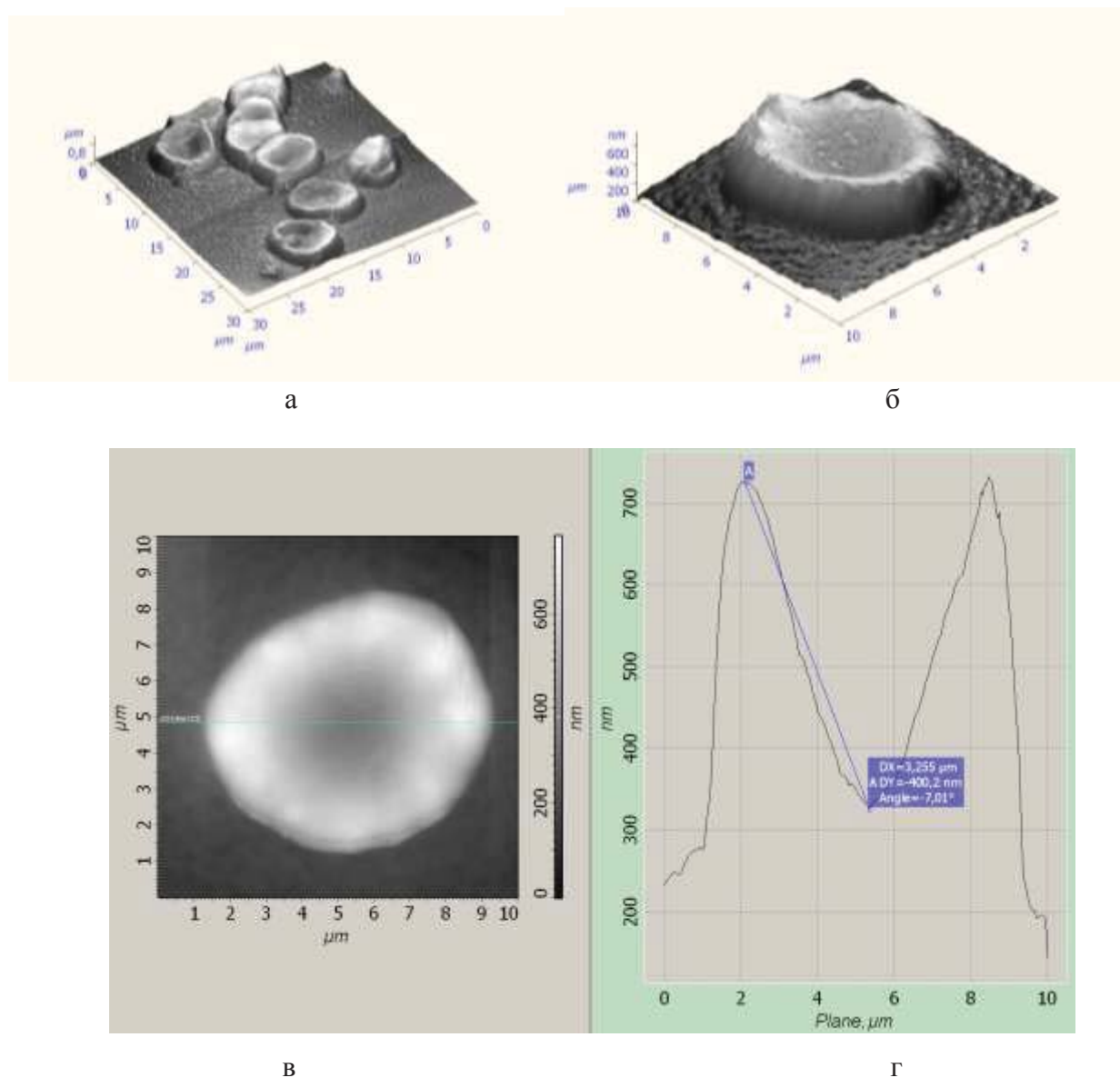


Рис. 3. Эритроциты крови у беременных женщин с тяжелой формой преэклампсии. Дискциты в форме неправильного овала (а, б, в). Кривизна и глубина центрального углубления изменена. Атомно-силовая микроскопия. (рис. а, б – трехмерная гистограмма; рис. в – двумерная гистограмма, г – графическое изображение размеров эритроцита)

Таблица 4

**Содержание кислорода в эритроцитах внутри сосудов ворсин
(пропорциональное содержание атомов микроэлемента в %
от общего числа содержания атомов в эритроците)**

Элемент	Контроль	Преэклампсия умерено выраженная	Преэклампсия тяжелая
О	24, 25±2,31	17,51±2,03*	15,42±2,65**
Всего	100	100	100

*p<0,05 по сравнению с практически здоровыми беременными женщинами
**p<0,05 по сравнению с пациентами с преэклампсией

При изучении содержания кислорода в эритроцитах было выявлено, что содержание кислорода внутри эритроцитов в основной группе было статистически достоверно ниже, чем в контрольной группе, а в процентном соотношении эта разница составила 18%.

Выводы

1. С помощью сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии проведен обзор и анализ результатов исследования трехмерных форм эритроцитов при преэклампсии различной тяжести. Показано, что форма эритроцита является диагностическим индикатором заболевания.

2. Содержание переходных форм эритроцитов достоверно увеличивалось по мере возрастания тяжести преэклампсии. Еще в большей степени, прогрессировало содержание необратимо измененных (пред-

гемолитических) клеток. Возрастал уровень разрушенных эритроцитов.

3. Структура плазмолеммы клеток была нарушена. Изменялась архитектура плазматических отростков. Нарушалось строение пор плазмолеммы клеток. Увеличивалось содержание цитоплазматических мостиков между клетками, что способствовало стазу, сладжированию и тромбозу.

4. Отмечено изменение степени двояковогнутости нормальных эритроцитов. Глубина впадины дискоцитов, подсчитанная с помощью изучения профиля клетки значительно отличалась от контрольной группы, как и соотношения диаметра эритроцита к диаметру впадины.

5. Содержание кислорода внутри эритроцитов в группе преэклампсии было статистически достоверно ниже на 18%, чем в контрольной группе.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Сюндюкова Е.Г., Медведев Б.И., Сашенков С.Л., Зайнетдинова Л.Ф., Канайкина А.Ю. Гистоморфологические особенности плаценты при преэклампсии // Медицинский вестник Башкортостана. 2014. Т. 9, №5. С. 104-107.

2. Павлова Т.В., Петрухин В.А., Сумин С.А., Селиванова А.В., Сырцева И.С. Гемореологические особенности маточно-плацентарного кровотока при тяжелом гестозе // Архив патологии. 2014. №3. С. 37-40.

3. Павлова Т.В., Куликовский В.Ф., Павлова Л.А. Клиническая и экспериментальная морфология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2016. 256 с.

4. Brewer J., Owens M.Y., Wallace K., Reeves A.A., Morris R., Khan M. et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome in 46 of 47 patients with eclampsia // Am. J. Obstet. Gynecol. 2013. Vol. 208, №6. P. 1-6.

5. Muralimanoharan S., Maloyan A., Mele J., Guo C., Myatt L.G., Myatt L. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia // Placenta. 2012. Vol. 33. P. 23-816.

6. Wortelboer E.J., Koster M.P., Cuckle H.S., Stoutenbeek P.H., Schielen P.C., Visser

G.H. First-trimester placental protein 13 and placental growth factor: markers for identification of women destined to develop early-onset preeclampsia // Br. J. Obstet. Gynaecol. 2010. Vol. 117, №11. P. 9-1384.

7. Gao W.L., Liu M., Yang Y., Yang H., Liao Q., Bai Y. et al. The imprinted H19 gene regulates human placental trophoblast cell proliferation via encoding miR-675 that targets Nodal Modulator 1 (NOMO1) // RNA Biol. 2012. Vol. 9, №7. P. 1000-1002.

8. Pavlova T., Malutina E., Petrukhin V., Nesterov A., Bashuk I., Kolesnikov D. et al. Use of methods of scanning microscopy at pathology of placenta // Virchows Archiv. 2015. Vol. 467 (Suppl 1). P. 141-143.

9. Hafner E., Metzenbauer M., Stümpflen I., Waldhör T. Measurement of placental bed vascularization in the first trimester, using 3D-power-Doppler, for the detection of pregnancies at-risk for fetal and maternal complications // Placenta. 2013. Vol. 34, №10. P. 888-892.

References

1. Syundyukova EG, Medvedev BI, Sashenkov SL, Zajnetdinova LF, Kanajkina AYU. Gistomorfologicheskie osobennosti placenty pri preehklampsii [Histomorphological especially the placenta in preeclampsia]. *Me-*

dicinskij vestnik Bashkortostana [Medical Bulletin of Bashkortostan]. 2014; 9(5): 104-107. (in Russian)

2. Pavlova TV, Petruhin VA, Sumin SA, Selivanova AV, Syrceva IS. Gemoreologicheskie osobennosti matochno-placentarnogo krovotoka pri tyazhelom gestoze [Hemorheological features of utero-placental blood flow in severe preeclampsia]. *Arhiv patologii [Pathology Archives]*. 2014; 3: 37-40. (in Russian)

3. Pavlova TV, Kulikovskij VF, Pavlova LA. *Klinicheskaya i ehksperimental'naya morfologiya [Clinical and Experimental Morphology]*. Moscow: ООО «Medical News Agency»; 2016. 256 p. (in Russian)

4. Brewer J, Owens MY, Wallace K, Reeves AA, Morris R, Khan M et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome in 46 of 47 patients with eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2013; 208(6): 1-6.

5. Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, Myatt L. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta*. 2012; 33: 23-816.

6. Wortelboer EJ, Koster MP, Cuckle HS, Stoutenbeek PH, Schielen PC, Visser GH. First-trimester placental protein 13 and placental growth factor: markers for identification of women destined to develop early-onset preeclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 2010; 117(11): 1379-1384.

7. Gao WL, Liu M, Yang Y, Yang H, Liao Q, Bai Y et al. The imprinted H19 gene regulates human placental trophoblast cell proliferation via encoding miR-675 that targets Nodal Modulator 1 (NOMO1). *RNA Biol.* 2012; 9(7): 1000-1002.

8. Pavlova T, Malutina E, Petrukhin V, Nesterov A, Bashuk I, Kolesnikov D et al. Use of methods of scanning microscopy at pathology of placenta. *Virchows Archiv.* 2015; 467(1): 141-143. (in Russian)

9. Hafner E, Metzenbauer M, Stümpflen I, Waldhör T. Measurement of placental bed vascularization in the first trimester, using 3D-power-Doppler, for the detection of pregnancies at-risk for fetal and maternal complications. *Placenta*. 2013; 34(10): 888-892.

Павлова Т.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой патологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

E-mail: pavlova@bsu.edu.ru

Павлова Л.А. – д.м.н., проф. кафедры патологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

E-mail: lpavlova@bsu.edu.ru

Петрухин В.А. – д.м.н., проф., руководитель I акушерской клиники Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии, г. Москва.

E-mail: lakmoniiag@mail.ru

Пилькевич Н.Б. – д.м.н., проф. кафедры патологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.

E-mail: pilkevich@bsu.edu.ru

Селиванова А.В. – врач акушер-гинеколог перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа, г. Белгород.

E-mail: okb@bel.ru

Сырцева И.С. – врач анестезиолог-реаниматолог Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа, г. Белгород.

E-mail: innessita25@mail.ru

Каплин А.Н. – ассистент кафедры патологической анатомии Курского государственного медицинского университета, г. Курск.

E-mail: drkaplin@rambler.ru