© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.361-007.271-06:616-008.5-06:616.155.1

Р. А. Пахомова, Ю. С. Винник, Л. В. Кочетова, Ю. С. Нагорнов

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (ректор — проф. И. П. Артюхов)

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Изучить структурно-функциональные свойства эритроцитов при доброкачественной механической желтухе разной степени тяжести. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Обследован 81 больной с механической желтухой доброкачественного генеза. Группу контроля составили 29 практически здоровых человек. Всем больным выполнена атомно-силовая микроскопия эритроцитов для изучения их структурно-функциональных свойств. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** У больных с нарастанием содержания билирубина увеличиваются размеры эритроцита, из двояковогнутого эритроцит приобретает горизонтальную ориентацию у больных при тяжести механической желтухи класса В и трансформируется в куполообразный стоматоцит у больных со степенью тяжести механической желтухи класса С, у последних увеличивается площадь эритроцита, а объём его становится в 2 раза больше нормы. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** С нарастанием степени тяжести механической желтухи происходит трансформация эритроцита: двояковогнутый эритроцит превращается в куполообразный стоматоцит, достоверно увеличивается объём эритроцита, увеличиваются количество разрывов и величина их на билипидном слое мембраны.

Ключевые слова: механическая желтуха, печёночная недостаточность, атомно-силовая микроскопия

R. A. Pakhomova, Yu. S. Vinnik, L. V. Kochetova, Yu. S. Nagornov

Morphofunctional state of erythrocytes in benign obstructive jaundice

V. F. Voyno-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University

OBJECTIVE. Structural and functional properties of erythrocytes were researched in patients with benign obstructive jaundice of different degree of severity. **MATERIAL AND METHODS.** Patients (n=81) with obstructive jaundice of benign genesis were examined at the period from 2013 till 2016. The control group consisted of 29 healthy patients. The atomic-force microscopy of erythrocytes was applied in all patients in order to study structural and functional properties of erythrocytes. **RESULTS.** There was noted, that growth of bilirubin concentration caused the increase of erythrocyte size. Binocave red blood cells acquired horizontal orientation in patients with B class of obstructive jaundice. Erythrocytes transformed to domed stomatocyte and their square increased, volume of red cells become twice more compared with normal state in patients with C class of obstructive jaundice. **CONCLUSIONS.** The degree of severity of obstructive jaundice caused red cell transformation. The binocave erythrocytes changed to the domed stomatocytes. This transformation significantly increased erythrocyte volume, the number of ruptures and their volume on bilipidic membrane layer.

Key words: obstructive jaundice, hepatic failure, atomic-force microscopy

Введение. Проблема лечения больных с механической желтухой (МЖ) остаётся одной из наиболее актуальных в современной хирургии в связи с неуклонным увеличением числа больных с поражением гепатопанкреатодуоденальной зоны (ГПДЗ) и ростом числа осложнений. В последние годы актуальность проблемы возросла в связи с увеличением частоты атипичных клинических форм заболеваний ГПДЗ, ростом хирургической активности, особенно у больных пожилого и старческого возраста, распространением инвазивных диагностических и лечебных мероприятий, нарушающих автономность жёлчевыводящей системы.

Тяжесть состояния больного с механической желтухой зависит от степени угнетения функционального состояния печени и прогрессирующей печёночной недостаточности, что сопровождается нарастанием явлений эндогенной интоксикации, усилением свободнорадикального окисления липидов и снижением антиоксидантной защиты организма [1, 2, 7, 8, 10]. Все это в итоге приводит к прогрессирующей полиорганной недостаточности. Сегодня можно говорить о том, что эритроциты вовлекаются в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевают серьезные

изменения структуры и функции при болезнях разного генеза: злокачественных новообразованиях, воспалении, нарушении обмена веществ, заболеваниях сердечно-сосудистой системы, психических расстройствах, инфекционных заболеваниях и др. [3, 4, 9]. Отсутствие достоверных данных о структурно-функциональных свойствах эритроцитов при механической желтухе разной тяжести предопределяет целесообразность их детального изучения.

В настоящее время атомно-силовая микроскопия (АСМ) находит все более широкое применение в биологии и медицине, поскольку имеет преимущества перед оптической и электронной микроскопией. Во-первых, она позволяет получить истинно трехмерное изображение рельефа исследуемой поверхности, во-вторых, измерения можно осуществлять не только в вакууме, но и при нормальном давлении воздуха, в газе и в жидкости. Одним из основных достоинств метода АСМ является возможность изучения локальных механических и биофизических свойств клеток, более глубокого изучения таких важнейших свойств клетки, как эластичность, мобильность поверхностных слоев, адгезию, молекулярное связывание и электростатичность [5, 6]. Благодаря возможностям АСМ стала доступна эластография клеток, которая позволяет продвинуть диагностику на качественно новый уровень. Оценка структурных особенностей поверхности эритроцита и физических свойств его мембраны у больных с механической желтухой (МЖ) представляет интерес с точки зрения как изучения воздействия МЖ на клетку, так и исследования воздействия МЖ разной степени тяжести на механические свойства клетки.

Цель работы — изучить структурно-функциональные свойства эритроцитов при доброкачественной МЖ разной степени тяжести.

Материал и методы. В период с 2013 по 2016 г. обследован 81 больной с МЖ доброкачественного генеза, находившийся на стационарном лечении в 1-м хирургическом отделении ГМББ № 6 им. Н.С.Карповича г. Красноярск. В качестве контрольной группы обследованы 29 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу с основной группой.

Согласно упрощенной классификации Э.И.Гальперина [2], больные по степени тяжести МЖ были разбиты на три группы. В 1-ю группу вошли 28 больных с тяжестью МЖ класса А, средний возраст которых составил $(63,2 \pm 2,9)$ года, во 2-ю группу — 27 больных с тяжестью МЖ класса В, средний возраст которых был $(63,4 \pm 2,8)$ года, 3-ю группу составили 26 больных со средним возрастом $(64,8 \pm 2,6)$ года.

Диагноз поставлен на основании клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования. Кроме того, всем больным выполнена АСМ эритроцитов. Мазки

крови исследовали на атомно-силовом микроскопе «Integra Auga» (NT-MDT, Россия). Сканирование поверхности образцов проводили в полуконтактном, а при измерении сил адгезии — в контактном режиме на воздухе. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 7,2 нН/нм, резонансной частотой 190 кГц, при этом длина кантилевера составляла 125 мкм, ширина — 20 мкм, толщина — 3 мкм. В работе использовали программное обеспечение ACM NOVA для получения изображений и программу Image Analysis для анализа изображений (благодарим коллектив кафедры нанотехнологий и материаловедения ИТМО, заведующий кафедрой — А.О.Голубок). Для анализа сканов использовали мазки крови, на которых выбирали только отдельные эритроциты, чтобы исключить механическое воздействие соседних клеток и искажение морфологии. Число клеток для анализа варьировало в пределах 50–60 для каждого образца, при этом каждый исследуемый эритроцит был просканирован дважды: первый раз клетка целиком, второй раз — мембрана клетки для анализа её состояния.

Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи компьютерной программы IBM SPSS, версии 22.0. Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных признаков в виде абсолютных значений и процентных долей с ошибками репрезентативности, для количественных — в виде средних арифметических (M) и стандартных ошибок средних (m). При подтверждении нормального распределения значений переменных проверку статистической значимости различий производили при помощи t -критерия Стьюдента, при отсутствии нормального распределения использовали критерий Манна — Уитни. Различия во всех случаях оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты. В структуре доброкачественных заболеваний ГПДЗ, обусловивших развитие МЖ, жёлчнокаменная болезнь (ЖКБ), осложненная холедохолитиазом (ХЛ) выявлена у 45 больных (55,6%). У 17 больных (20,9%) выявлены стенозы большого сосочка двенадцатиперстной кишки (БДС), у 14 (17,3%) — псевдотуморозный панкреатит. Стриктура общего жёлчного протока и билиодигестивного анастомоза диагностирована у 3 (3,7%) и у 2 (2,5%) больных соответственно. Все больные были в возрасте от 18 до 85 лет, мужчин было 28 (34,5%), женщин — 53 (65,5%).

В лечении больных с МЖ, поступивших в стационар по экстренным показаниям, придерживаемся двухэтапной тактики. На первом этапе ликвидировали холестаз и холемию с применением малоинвазивных эндоскопических вмешательств (ЭПСТ, у 60 пациентов) и чрескожное чреспечёночное дренирование (ЧЧПД, у 14), создавая условия для более качественной подготовки больного ко второму этапу хирургического лечения; по экстренным показаниям при поступлении лапаротомия с наложением билиодигестивного анастомоза выполнена у 7 больных.

Показания к оперативному вмешательству (у 34, или 41,9%, больных), его срочность

и вариант выполнения хирургического лечения на втором этапе определяли в зависимости от наличия разных факторов: эффективности первого этапа хирургического лечения, характера патологического процесса, состояния больного и наличия сопутствующих заболеваний.

40 пациентам второй этап хирургического лечения не выполняли.

Для исследования эритроцита на АСМ кровь брали до начала интенсивной терапии. У здоровых людей без поражения ГПДЗ форма цитоскелета эритроцита имела форму двояковогнутого дискоцита в 80–90 % случаев. С нарастанием МЖ форма цитоскелета эритроцита изменялась. У больных со степенью тяжести МЖ класса А появляются эритроциты с мембраной горизонтальной ориентации, их количество увеличивается у больных с тяжестью МЖ класса В, на билипидном слое мембраны у этих больных появляются шиповидные выросты и её разрушения размерами 100–200 нм.

На фоне увеличения тяжести МЖ (класс С) трансформация эритроцита нарастает. Во-первых, цитоскелет эритроцита меняется, и из двояковогнутого дискоцита он превращается в куполообразный эхиноцит. Кроме того, у больных со степенью тяжести МЖ класса С увеличиваются размеры эритроцита, причем в большей степени — его минимальная и максимальная высота, площадь эритроцита и объём (таблица).

Исследование шероховатости поверхности сканов эритроцита с использованием встроенного программного обеспечения NOVA АСМ микроскопа показало, что нарушения с размерами до 50 нм встречаются в основном в эритроцитах в норме, нарушения с размерами 50–100 нм возникают преимущественно в эритроцитах при механической желтухе классов А и В, а с размерами 100–200 нм — у больных с тяжестью класса С (рис. 1). Число нарушений в мембране эритроцита при желтухе класса А в 3,5 раза

меньше, чем при желтухе класса В (в среднем 9 разрывов мембраны на эритроцит против 2,4 при классе А). Кроме этого, распределение длин разрывов при классе А ограничено величиной 110 нм, а при классе В — 175 нм. У больных с МЖ со степенью тяжести класса С число разрывов мембраны значительно увеличивается (рис. 2), а средний размер их превышает размер разрывов у больных с МЖ со степенью тяжести класса А и В.

Следовательно, у больных с МЖ со степенью тяжести класса С не только изменяется форма эритроцита, но и увеличивается число шиповидных выростов и величина разрывов на билипидном слое мембраны.

Обсуждение. Современный уровень развития науки позволяет рассматривать морфологические изменения структуры отдельных клеток в качестве достаточно информативного критерия, позволяющего диагностировать ряд патологических изменений. В настоящее время изменения морфологических параметров клеток крови человека проецируют на функциональные свойства. В гомеостазе клетки большое значение имеет сохранение её объёма и формы. Существенное изменение объёма клеток является важным критерием, указывающим на трансформацию функционального состояния ткани, органа и организма в целом.

Повышенный интерес исследователей к эритроциту при патологических состояниях обусловлен его участием в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма. Эритроциты, помимо присущей им специфической газотранспортной функции, принимают участие в регуляции кислотно-основного состояния, водно-электролитного баланса, микрореологического статуса крови, связывании и переносе аминокислот, липидов, вирусов, лекарственных веществ [3, 4].

Поскольку морфофункциональные свойства эритроцита являются наиболее общими

Геометрические размеры ($M \pm m$) эритроцита при разной степени тяжести МЖ

Показатель	Норма	Класс А	Класс В	Класс С
Длина эритроцита, мкм	7,82±0,29	7,87±0,22	8,18±0,21	10,72±0,53
Ширина эритроцита, мкм	7,24±0,22	6,95±0,21	7,77±0,16	8,55±0,22
Максимальная высота, нм	315±14,22	351,67±5,43	344±10,46	384±26,94
Минимальная высота, нм	223,33±15,63	340±5,16	277±10,07	404±24,82
Площадь эритроцита, мкм ²	44,64±2,88	42,99±1,99	50,09±2,18	71,95±4,17
Глубина впадины, нм	91,67±13,52	11,67±1,67	67±6,5	-20,0±3,16
Объём эритроцита, мкм ³	12,79±1,23	14,91±0,57	16,09±0,84	28,34±3,2

Рис. 1. Сканы поверхности мембраны эритроцита, полученные при помощи атомно-силовой микроскопии с размером изображений 3×3 мкм, для эритроцитов с различной степенью механической желтухи.

а — норма; б — класс А; в — класс В; г — класс С

интегральными показателями функционального состояния организма в целом исследование изменений цитоскелета эритроцита и его геометрических параметров при разной степени билирубинемии представляет несомненный научно-практический интерес.

Впервые при изучении поверхностной архитектуры и ультраструктуры эритроцита в динамике развития патологического процесса, обусловленного МЖ, удалось доказать, что число трансформированных форм эритроцита увеличивается параллельно с нарастанием тяжести МЖ.

Видимо, увеличение количества трансформированных эритроцитов в крови больных с МЖ не является случайным фактом. Нарушение структуры эритроцита обусловлено состоянием катион-транспортующих систем, сбалансированностью молекулярной организации белковых и липидных компонентов мембраны эритроцита и содержанием АТФ. Эндогенная интоксикация, развивающаяся на фоне МЖ, нарушает биохимические процессы, что, в свою очередь, вызывает изменения структуры эритроцита и процессов метаболизма в нём.

Размер нарушений, нм			
0–50	50–100	100–150	150–200
$p_{1-2} < 0,05$	$p_{1-2} < 0,05$	$p_{1-2} < 0,05$	$p_{1-2} > 0,05$
$p_{1-3} < 0,05$	$p_{1-3} < 0,05$	$p_{1-3} < 0,05$	$p_{1-3} > 0,05$
$p_{1-4} < 0,05$	$p_{1-4} > 0,05$	$p_{1-4} < 0,05$	$p_{1-4} < 0,05$
$p_{2-3} > 0,05$	$p_{2-3} > 0,05$	$p_{2-3} > 0,05$	$p_{2-3} > 0,05$
$p_{2-4} < 0,05$	$p_{2-4} < 0,05$	$p_{2-4} < 0,05$	$p_{2-4} < 0,05$
$p_{3-4} > 0,05$	$p_{3-4} < 0,05$	$p_{3-4} < 0,05$	$p_{3-4} < 0,05$

Рис. 2. Распределение нормированного числа разрушений в мембране для мембран эритроцитов с различной степенью механической желтухи

Выводы. 1. С нарастанием степени тяжести МЖ происходит трансформация эритроцита, из двояковогнутого в куполообразный стоматоцит.

2. С нарастанием билирубинемии объём эритроцита увеличивается. При тяжёлой степени МЖ объём эритроцита, по сравнению с нормой, увеличивается в два раза. С нарастанием тяжести МЖ, увеличивается число разрушений и величина разрывов билипидного слоя мембраны.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCE]

- Винник Ю.С., Пахомова Р.А., Кочетова Л.В. Ближайшие результаты лечения больных с механической желтухой // Международный научно-практический журнал Хирургия (Восточная Европа). 2012. № 3. С. 31–33 [Vinnik Yu.S., Pakhomova R.A., Kochetova L.V. Blizhaishie rezul'taty lecheniya bol'nykh s mekhanicheskoi zheltukhoi // Mezhdunarodnyi nauchno-prakticheskii zhurnal Khirurgiya (Vostochnaya Evropa). 2012. № 3. P. 31–33].
- Гальперин Э.И. Классификация тяжести механической желтухи // Анн. хир. гепатол. 2012. № 2. С. 5–9 [Gal'perin E.I. Klassifikatsiya tyazhesti mekhanicheskoi zheltukhi // Annaly khirurgicheskoi gepatologii. 2012. № 2. P. 5–9].
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Быстрицкий Л.Д., Ткаченко С.Б. Атлас Клинический патоморфоз эритроцита. Томск : Изд-во Томского ун-та; М. : Издательский Дом «ГЭОТАР-МЕД», 2003. 208 с. [Novitskii V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Bystritskii L.D., Tkachenko S.B. Atlas Klinicheskii patomorfiz eritrotsita. Tomsk : Izd-vo Tomskogo un-ta; Moscow: Izdatel'skii Dom «GEOTAR-MED», 2003. 208 p.].
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск : Изд-во Томского ун-та, 2004. 200 с. [Novitskii V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A. Fiziologiya i patofiziologiya eritrotsita. Tomsk : Izd-vo Tomskogo un-ta, 2004. 200 p.].
- Скоркина М.Ю., Чернявских С.Д., Федорова М.З., Сладкова Е.А., Забияков Н.А. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силовой микроскопии // Бюл. эксп. биол. и мед. 2010. Т. 150, № 2. С. 273–275 [Skorkina M.Yu., Chernyavskikh S.D., Fedorova M.Z., Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. Metodika otsenki morfometricheskikh parametrov nativnykh kletok krvi s ispol'zovaniem atomno-silovoi mikroskopii // Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2010. Vol. 150, № 2. P. 273–275].
- Скоркина М.Ю., Чернявских С.Д., Федорова М.З., Сладкова Е.А., Забияков Н.А. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов // Цитология. 2011. Т. 53, № 1. С. 17–21 [Skorkina M.Yu., Chernyavskikh S.D., Fedorova M.Z., Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. Sravnitel'naya otsenka morfofunktsional'nykh kharakteristik nativnykh i fiksirovannykh eritrotsitov // Tsitologiya. 2011. Vol. 53, № 1. P. 17–21].
- Нагорнов Ю.С., Пахомова Р.А. Атомно-силовая микроскопия мембраны эритроцитов при механической желтухе // Биофизика. 2016. № 3. С. 483–491 [Nagornov Yu.S., Pakhomova R.A. Atomno-silovaya mikroskopiya membrany eritrotsitov pri mekhanicheskoi zheltukhe // Biofizika. 2016. № 3. P. 483–491].
- Нагорнов Ю.С., Пахомова Р.А., Жилыев И.В., Воронова Е.А. Морфология эритроцита и расчёт внутриклеточного давления по данным атомно-силовой микроскопии // Рос. журн. биомеханики. 2015. № 4. С. 1–10 [Nagornov Yu.S., Pakhomova R.A., Zhilyaev I.V., Voronova E.A. Morfologiya eritrotsita i raschet vnutrikletchnogo davleniya po dannym atomno-silovoi mikroskopii // Rossiiskii zhurnal biomekhaniki. 2015. № 4. P. 1–10].
- Новодержкина Ю.К., Шишканова З.Г., Козинец Г.И. Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии. М.: Триада-Фарм, 2004. 152 с. [Novoderzhkina Yu.K., Shishkanova Z.G., Kozinets G.I. Konfiguratsiya i poverkhnost' kletok krvi v norme i patologii. Moscow: Triada-Farm, 2004. 152 p.].
- Яковлев А.Ю., Семенов В.Б., Емельянов Н.В., Мокров К.В., Зубеев П.С., Акуленко С.В., Заречнова Н.В. Инфузионная коррекция желчеоттока и эндотоксикоза у больных с механической желтухой // Вестн. хир. 2011. № 6. С. 23–27 [Yakovlev A.Yu., Semenov V.B., Emel'yanov N.V., Mokrov K.V., Zubeev P.S., Akulenko S.B., Zarechnova N.V. Infuzionnaya korrektsiya zhelcheottoka i endotoksikoza u bol'nykh s mekhanicheskoi zheltukhoi // Vestnik khirurgii. 2011. № 6. P. 23–27].

Поступила в редакцию 09.04.2017 г.

Сведения об авторах:

Пахомова Регина Александровна (e-mail: PRA5555@mail.ru), канд. мед. наук, ассистент кафедры общей хирургии М.И. Гуманова;
Винник Юрий Семенович (e-mail: yuvinnik@yandex.ru), д-р мед. наук, проф., зав. той же кафедрой; Кочетова Людмила Викторовна (e-mail: dissovetskragmu@bk.ru), канд. мед. наук, проф. той же кафедры; Нагорнов Юрий Сергеевич (e-mail: nagornovys@yandex.ru), канд. физ.-мат. наук, доцент, ст. науч. сотрудник; Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1.