



ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

**С. Н. Мамаева¹, Я. А. Мунхалова¹, И. В. Кононова¹,
А. А. Дьяконов¹, В. Н. Корякина¹, В. В. Шутова²,
Г. В. Максимов³**

¹ФГАОУ ВПО «СВФУ им. М. К. Аммосова» (г. Якутск, Россия)

²ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (г. Саранск, Россия)

³ФГОУ ВПО «МГУ им. М. В. Ломоносова» (г. Москва, Россия)

Введение. Использование возможностей современного оборудования, такого как растровый электронный микроскоп (РЭМ), может позволить получить важную дополнительную информацию с возможностью ее дальнейшего использования для внедрения новых методов комплексного исследования анализов крови в диагностике почечных заболеваний с синдромом гематурии.

Материалы и методы. Исследования морфологии эритроцитов больных гематурией проводились методом РЭМ высокого разрешения на приборе JSM-7800F. В ходе работы была применена методика исследования клеток и наночастиц без напыления проводящих покрытий.

Результаты исследования. Были получены результаты сравнительного анализа (методами математической статистики) линейных размеров эритроцитов крови детей с болезнью Берге и контрольной группы; обнаружены наноразмерные частицы на поверхности эритроцитов и IgA-нефропатии. Исследование образцов мазков крови показало, что при определенных заболеваниях наблюдаются изменения морфологии эритроцитов и наличие на их поверхности нанообъектов. Можно предположить, что эти объекты имеют органическое происхождение, поскольку многие органические объекты являются диэлектриками и при изучении с помощью РЭМ могут быть видны как яркие светящиеся объекты. Нанообъекты имеют размеры, сходные с размерами малых вирусов, и могут являться подтверждением предположения о возможном вирусном этиологическом факторе заболевания Берге и других видов нефропатий. Кроме этого, были выявлены изменения линейных размеров эритроцитов в сторону увеличения при заболеваниях Берге по сравнению с размерами эритроцитов контрольной группы и группы больных другими видами нефропатии.

Обсуждение и заключения. Метод РЭМ без напыления исследуемых образцов является достаточно точным для исследования морфологии клеток крови. Его использование улучшит качество диагностирования сложно диагностируемого заболевания Берге. Дальнейшее увеличение статистики и анализ объектов нанометровых размеров расширит знания о проявлениях заболевания.

Ключевые слова: эритроциты, гематурия, болезнь Берге, электронная микроскопия, нефропатия

Для цитирования: Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии / С. Н. Мамаева [и др.] // Вестник Мордовского университета. 2016. Т. 26, № 3. С. 381–390. DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.381-390

THE STUDY OF RED BLOOD CELLS BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

**S. N. Mamayeva^a, Ya. A. Munkhalova^a, I. V. Kononova^a,
A. A. Dyakonov^a, V. N. Koryakina^a, V. V. Shutova^b,
G. V. Maksimov^c**

^a*Northen-Eastern Federal University (Yakutsk, Russia)*

^b*National Research Mordovia State University (Saransk, Russia)*

^c*Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia)*

Introduction. Using the possibilities of modern equipment, such as a scanning electron microscope (SEM), could provide important additional information for red blood cells (RBCs) diagnostics, which can be used to introduce new methods of complex studies of blood tests in the diagnosis of renal disease with hematuria syndrome.

Materials and Methods. Investigations of the morphology of the RBCs of patients with hematuria by SEM high-resolution instrument JSM-7800F. The technique of cell and uncoated nanoparticles research without conductive coatings has been developed.

Results. The findings obtained results of a comparative analysis of the methods of mathematical statistics, linear dimensions of the red blood cells of children Berger's disease patients and control group. Nanoscale particles detected on the surface of red blood cells and IgA-nephropathy. Smear of blood samples showed that in certain diseases of the observed changes in the morphology of red blood cells and the presence on their surface nano-objects. It can be assumed that these objects are of organic origin, as many organic objects are dielectrics and in the study of SEM, they can be seen as bright glowing objects. Nano-objects have dimensions similar to the small size of viruses and can be a confirmation of the assumption of a possible viral etiological factor Berger disease and other forms of nephropathy. The changes in linear dimensions of erythrocytes upward Berger in diseases compared with the size of the control group and the group of erythrocytes of patients with other forms of nephropathy.

Discussion and Conclusions. The SEM method without spraying of the samples is very accurate for the study of the morphology of blood cells. Its use will improve the quality of diagnosis is difficult diagnosed Berger disease. A further increase in statistics and the analysis of nanometer-sized objects extend the knowledge of the manifestations of the disease.

Keywords: erythrocytes, red blood cells (RBCs), hematuria, Berger's disease, electron microscopy, nephropathy

For citation: Mamayeva SN, Munkhalova YaA, Kononova IV, Dyakonov AA, Koryakina VN, Shutova VV, Maksimov GV. The study of red blood cells by scanning electron microscopy. *Vestnik Mordovskogo universiteta* = Mordovia University Bulletin. 2016; 3(26):381-390. DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.381-390

Введение

В Республике Саха (Якутия), как и в странах с преобладающим количеством азиатского населения, в настоящее время наблюдается рост почечной патологии среди детей. Для сравнения: в США распространение заболевания варьируется в пределах 2–10 %, тогда как в Азии – до 50 % (в Японии – 18–40 %) [1–3]. Известно, что среди многочисленных нефропатий гематурия является единствен-

ным симптомом заболевания почек и мочевыводящих путей [4]. Так, при IgA-нефропатии (болезнь Берже) гематурия является одним из основных симптомов [5]. Причины возникновения, проявления заболевания с синдромом гематурии, в том числе болезни Берже, на клеточном и молекулярном уровнях в настоящее время изучены недостаточно.

В связи с этим важным является формирование новых методов иссле-



дования морфологии эритроцитов при гематурии для развития диагностики и терапии заболевания с учетом активного внедрения сложного научно-технического оборудования, в том числе лазерной интерференционной и электронной микроскопии [6–7].

Использование возможностей современного оборудования, такого как растровый электронный микроскоп, позволит получить важную дополнительную информацию, которую можно использовать для внедрения новых методов комплексного исследования анализов крови в изучение и диагностировании почечных заболеваний с синдромом гематурии [4–5].

Материалы и методы

В данной работе предлагается новый метод исследования изменения морфологии клетки и выявления неидентифицированных нанообъектов с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) высокого разрешения JSM-7800F («Japanese Electron Optics Laboratory» – «JEOL», Япония) [8–9]. Прибор имеет термополевой эмиссионный катод Шоттки и супергибридную объективную линзу, значительно уменьшающую хроматические и сферические aberrации и существенно увеличивающую разрешение, особенно при малых ускоряющих напряжениях. Данный РЭМ оснащен системой «Gentle Beam», которая позволяет уменьшать скорость электронов падающего на образец пучка и ускорять испускаемые им электроны, что существенно улучшает соотношение сигнал/шум и качество изображения при низких ускоряющих напряжениях.

Данная система позволяет проводить исследования поверхностей эритроцитов в мазках крови и пробах мочи без напыления проводящих покрытий и без повреждения исследуемого объекта в течение времени, достаточного для того, чтобы сделать необходимые снимки, а также визуализировать на поверхности эритроцитов объекты

размером 21 нм. Использование покрытий, толщина которых соизмерима с наноструктурами на поверхности клетки, ранее не давало возможности обнаруживать подобные объекты.

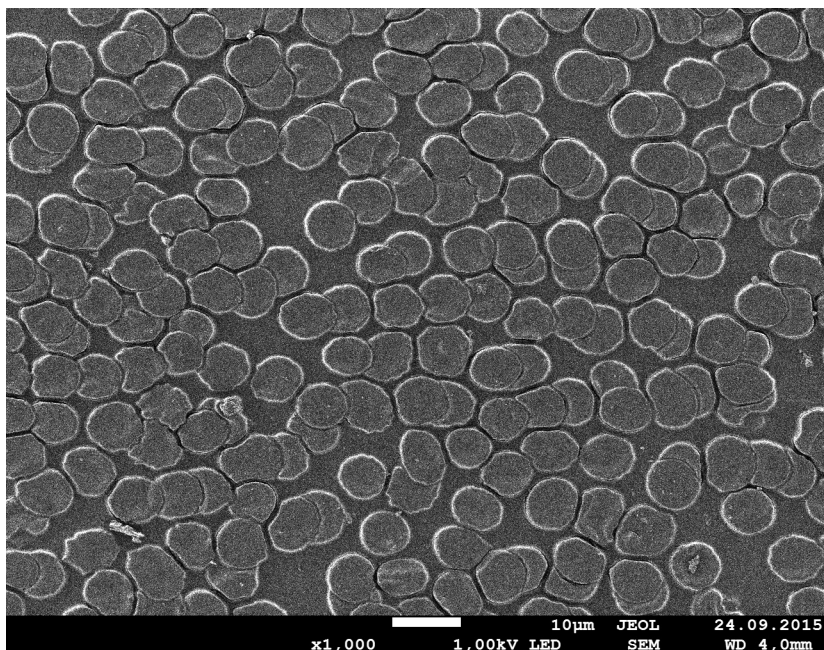
Рассматриваемый РЭМ, имеющий диапазон увеличения 25–1 000 000, позволяет исследовать объект при ускоряющем напряжении 0,1–30 кВ с разрешением порядка 1,2 нм при 1 кВ и 0,08 нм при 15 кВ. Устройство оборудовано 4-мя типами детекторов: верхний детектор электронов, верхний детектор вторичных электронов, детектор обратно отраженных электронов, нижний детектор вторичных электронов. В данной работе был использован нижний детектор, обеспечивающий регистрацию отраженных электронов, испускаемых при малых углах. Работа в этом режиме позволяет снизить эффект электростатического заряда на поверхности образца, что существенно улучшает качество изображения поверхности эритроцитов.

Во время исследований при подготовке мазков крови использовали венозную кровь, взятую натощак с помощью вакуумных систем забора крови. Максимальный диаметр образцов составлял 20 мм. Предварительно отбирали наиболее характерные эритроциты в мазках с помощью оптической микроскопии, что позволило сократить время и ресурсы основного исследования.

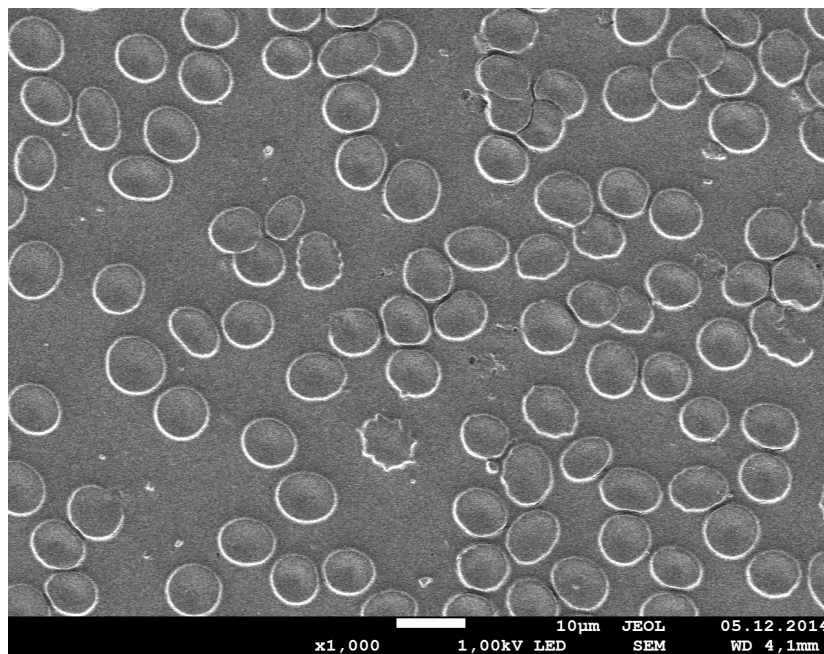
Исследования мазков крови проводили при ускоряющих напряжениях 1 и 2 кВ с подачей напряжения на исследуемый объект 8–10 В.

Результаты исследования

На растровом электронном микроскопе «JSM-7800F» фирмы «JEOL» в УНТЛ «Графеновые нанотехнологии» ЦКП АИЦ МНИОК СВФУ им. М. К. Аммосова были проведены исследования мазков крови больных детей с синдромом гематурии и детей контрольной группы, в результате которых были получены изображения эритроцитов (рис. 1–2).



Р и с. 1. РЭМ-изображения эритроцитов крови ребенка из контрольной группы
F i g. 1. Controls red blood cells on SEM



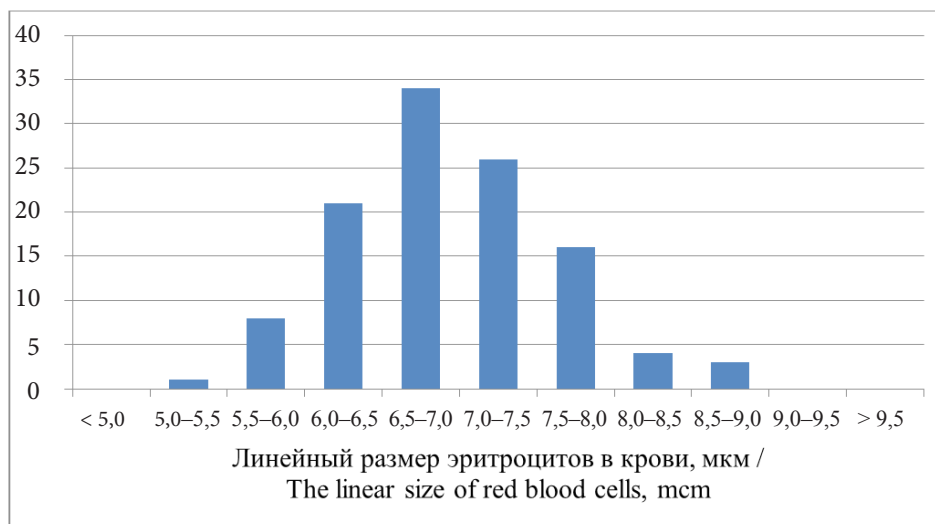
Р и с. 2. РЭМ-изображения эритроцитов крови больного ребенка с синдромом гематурии
F i g. 2. Hematuria red blood cells on SEM



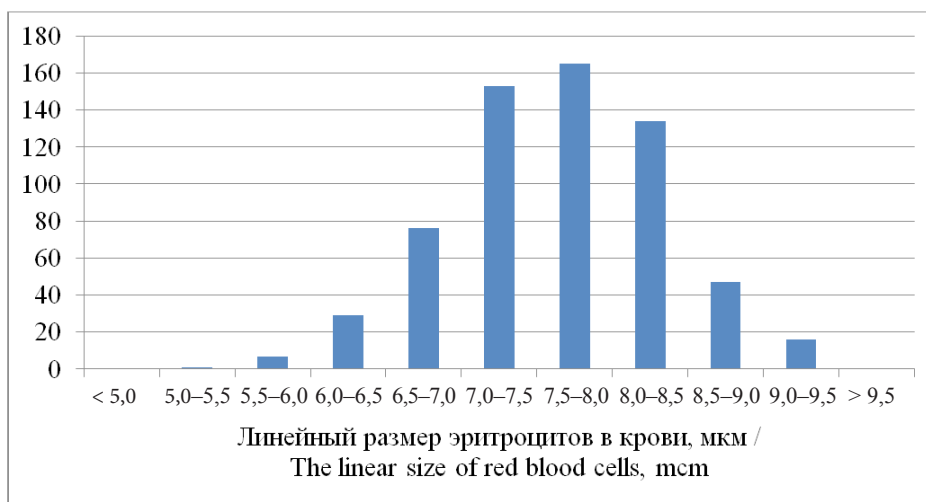
На основе эмпирических данных исследований мазка крови методом РЭМ были проведены обработка и анализ результатов методами математической статистики.

Например, при проведении измерения диаметров каждого эритроцита на рис. 1–2 статистическая выборка составила 113 и 94 эритроцитов соот-

ветственно. Для построения распределения размеров эритроцитов интервалы значений для линейных размеров эритроцита составляли 5–10 мкм с шагом 0,5 мкм. На рис. 3–4 представлены гистограммы распределения размеров эритроцитов крови детей контрольной группы и больных с синдромом гематурии соответственно.



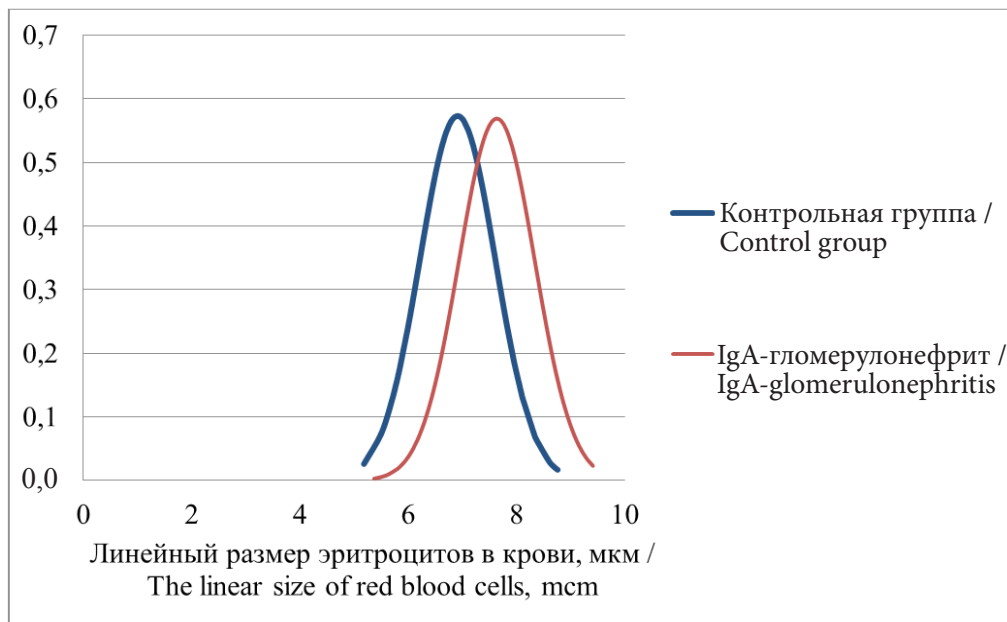
Р и с. 3. Гистограмма распределения размеров эритроцитов крови детей контрольной группы
F i g. 3. Histogram of control red blood cells



Р и с. 4. Гистограмма распределения размеров эритроцитов крови больных детей с синдромом гематурии (при болезни Берже)
F i g. 4. Histogram of hematuria (IgA-glomerulonephritis) red blood cells

В обоих случаях распределения размеров эритроцитов имеют экстремальный характер и подчиняется закону нормального распределения. По результатам

вычисления основных статистических характеристик были построены графики функций плотности распределения размеров эритроцитов в крови (рис. 5).



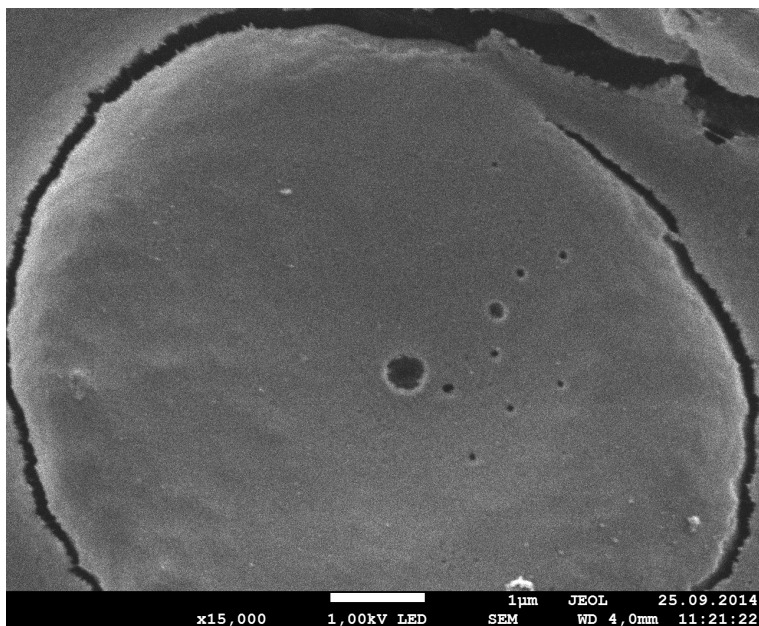
Р и с. 5. Функция плотности распределения размеров эритроцитов крови больных детей с синдромом гематурии (при болезни Берже)

F i g. 5. Gaussian function of distribution of sizes red blood cells with hematuria (IgA-glomerulonephritis)

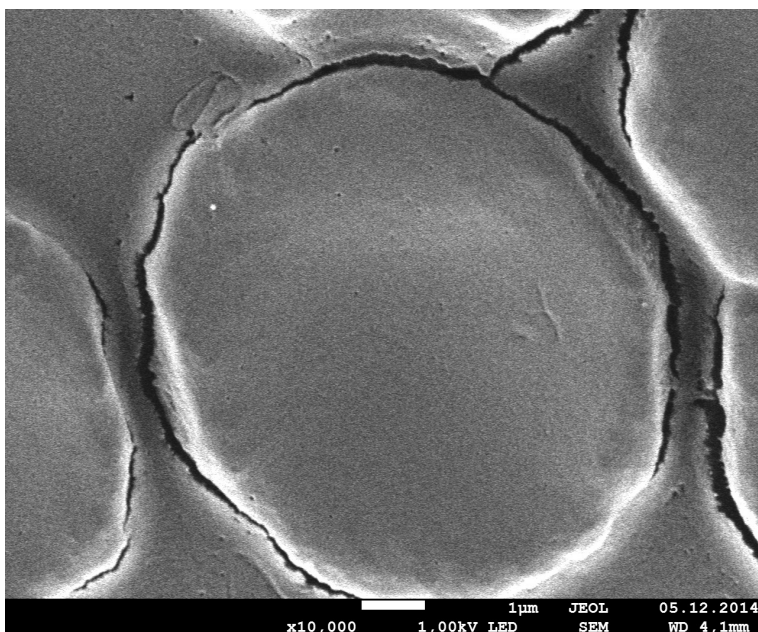
На рис. 5 представлены графики сравнения функций плотности распределения размеров эритроцитов для контрольной группы и группы больных с синдромом гематурии. В результате статистических исследований эритроцитов при сравнении контрольной группы и группы с заболеванием Берже методом математической статистики было выявлено, что распределение эритроцитов имеет вид оди-

ночных пиков с одинаковыми значениями ширины на полувысоте пиков, смещенных относительно друг друга. Среднее значение линейного размера эритроцита мазков крови контрольной группы составило 6,912 мкм; больных с синдромом гематурии – 7,640 мкм.

На поверхности эритроцитов наблюдались также «светящиеся» объекты нанометрового размера (рис. 6 а–б).



a)



б)

Р и с. 6. «Светящиеся» нанометровые объекты различных размеров на поверхности эритроцитов крови при болезни Берже

F i g. 6. Nano size objects on red blood cells with hematuria (IgA-glomerulonephritis)

Обсуждение и заключения

Исследование мазков крови на растровом электронном микроскопе «JEOL JSM-7800F» показало, что при определенных заболеваниях наблюдаются изменения морфологии эритроцитов и наличие на их поверхности нанообъектов, что было невозможно обнаружить при исследованиях на электронных микроскопах раннего поколения. Можно предположить, что эти объекты имеют органическое происхождение, поскольку многие органические объекты являются диэлектриками и при изучении с помощью РЭМ могут быть видны как яркие светящиеся объекты. Нанообъекты имеют размеры, сходные с размерами малых вирусов [10–11] и могут являться подтверждением предположения о возможном вирусном этиологическом

факторе заболевания Берже и других видов нефропатий. Выявление изменения линейных размеров эритроцитов в сторону увеличения при заболеваниях Берже по сравнению с размерами эритроцитов контрольной группы и группы больных другими видами нефропатии с помощью РЭМ без напыления исследуемых образцов является одним из наиболее точных методов исследования морфологии клеток крови и вносит существенный вклад в улучшение качества диагностирования данного заболевания (как правило, сложно диагностируемого).

Дальнейшее увеличение статистики и анализ объектов нанометровых размеров расширит знания о проявлениях заболевания и принесет свой вклад в методах диагностирования заболеваний с синдромом гематурии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Race/ethnicity and disease severity in IgA nephropathy / Y. N. Hall [et al.] // BMC Nephrol. 2004. Vol. 5. P. 10. DOI: 10.1186/1471-2369-5-10.
2. Мунхалова Я. А., Захарова Н. М., Горохова А. В. Особенности гломерулонефрита ассоциированного с герпес-вирусной инфекцией // Экология и здоровье человека на Севере : сб. трудов IV Конгресса с междунар. участием. Киров : МЦНИП, 2013. С. 405–409. URL: <http://elibrary.ru/download/77255227.pdf>.
3. Горохова А. В., Мунхалова Я. А. Результаты морфологического исследования биоптатов почек у детей с хроническими нефропатиями в РС (Я) // Современные проблемы педиатрии : сб. науч. трудов III съезда педиатров ДФО (Якутск, 2014). Киров : МЦНИП, 2014. С. 116–122. URL: <http://elibrary.ru/download/43601357.pdf>.
4. IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease / J. Mestecky [et al.] // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2013. Vol. 8. P. 217–240. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130216
5. Feehally J., Cameron J. S. IgA Nephropathy: Progress Before and Since Berger. Am. J. Kidney Diseases. 2011. Vol. 58 (2). P. 310–319. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.03.024>
6. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study / A. R. Brazhe [et al.] // Journal of biomedical optics. 2008. Vol. 13 (3). DOI: 10.1117/1.2937213.
7. Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки формы и состояния эритроцитов / А. И. Юсипович [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 145, № 3. С. 357–360. DOI: 10.1007/s10517-008-0097-3
8. Официальный сайт компании JEOL [Электронный ресурс]. URL: http://jeolrus.com/products/d_products/jsm-7800f/index.html (дата обращения: 20.02.2015).
9. Растровая электронная микроскопия для нанотехнологий: методы и применение / Под ред. У. Жу, Ж. Л. Уанга. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 582 с. URL: <http://docme.ru/5pb5>.
10. Ковалев Н. А., Красочко П. А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека. Минск : Беларус. наука, 2012. 426 с. URL: <http://www.litres.ru/n-a-kovaliev/virusy-i-priony-v-patologii-zhivotnyh-i-cheloveka-7063392>.



11. Роль вирусной инфекции в патогенезе гломерулонефрита у детей. Современные подходы к иммунокорригирующей терапии / В. В. Длин [и др.] // Нефрология и диализ. 2000. Т. 2, № 4. С. 285–289. URL: <https://docviewer.yandex.ru/?url=http%3A%2F%2Fjournal.nephro.ru%2Findex.php%3Fr%3Djournal%2FdownloadPdfFile%26articleId%3D1793&lang=ru&c=574d7290a2fe>.

Поступила 11.01.2016; принята к публикации 11.05.2016; опубликована онлайн 30.09.2016

Об авторах

Мамаева Саргылана Николаевна, доцент кафедры общей и экспериментальной физики Физико-технического института ФГАОУ ВПО «СВФУ им. М. К. Аммосова» (Россия, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58), кандидат физико-математических наук, sargylana_mamaeva@mail.ru

Мунхалова Яна Афанасьевна, заведующая кафедрой педиатрии и детской хирургии Медицинского института ФГАОУ ВПО «СВФУ им. М. К. Аммосова» (Россия, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58), кандидат медицинских наук, tokmacheva@mail.ru

Кононова Ирина Васильевна, заведующая учебно-научной иммунологической лабораторией клиники Медицинского института ФГАОУ ВПО «СВФУ им. М. К. Аммосова» (Россия, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58), irinakon.07@mail.ru

Дьяконов Афанасий Алексеевич, ведущий инженер кафедры высокомолекулярных соединений и органической химии Института естественных наук ФГАОУ ВПО «СВФУ им. М. К. Аммосова» (Россия, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58), afonya71185@mail.ru

Корякина Вероника Никоновна, студентка Физико-технического института ФГАОУ ВПО «СВФУ им. М. К. Аммосова» (Россия, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58), vkever@mail.ru

Шутова Виталина Викторовна, доцент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68), кандидат биологических наук, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6437-3621>, vshutova@yandex.ru

Максимов Георгий Владимирович, профессор кафедры биофизики биологического факультета ФГОУ ВПО «МГУ им. М. В. Ломоносова» (Россия, г. Москва, Ленинские горы 1, корп. 12), доктор биологических наук, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7377-0773>, gmaximov@mail.ru

REFERENCES

1. Hall YN, Fuentes EF, Chertow GM, Olson JL. Race/ethnicity and disease severity in IgA nephropathy. *BMC Nephrol.* 2004; 5(10). DOI: 10.1186/1471-2369-5-10
2. Munkhalova YaA, Zakharova NM, Gorokhova AV. Osobennosti glomerulonefrita assotsirovannogo s herpes-virusnoy infektsiey [Features of glomerulonephritis associated with herpesvirus infection]. In: *Ecologiya i zdorovye cheloveka na Severe: Sbornik trudov IV Kongressa s mezhdunarodnym uchastiem* [Environmental and human health in the North: proceedings of 4th Congress with international participation]. Kirov, 2013. Available from: <http://elibrary.ru/download/77255227.pdf>. (In Russ.)
3. Gorokhova AV, Munkhalova YaA. Rezultaty morfologicheskogo issledovaniya biopiatov pochek u detey s khronicheskimi nefropatiyami v RS (Ya) [The results of morphological examination of renal biopsies in children with chronic nephropathy in RS (Ya)]. In: *Sovremennyye problemy pediatrii: Sbornik nauchnykh trudov III Syezda peditrov Dalnevostochnogo federalnogo okruga* [Current problems in pediatric: Proceedings of 3rd Congress of pediatricians of the Far Eastern Federal District]. Kirov; 2014:116-122. Available from: <http://elibrary.ru/download/43601357.pdf>. (In Russ.)
4. Mestecky J, Raska M, Julian BA, Gharavi AG, Renfrow MB, Moldoveanu Z, et al. IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2013; 8:217-240. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130216
5. Feehally J, Cameron JS. IgA Nephropathy: Progress Before and Since Berger. *Am. J. Kidney Diseases.* 2011; 58(2):310-319. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.03.024>

6. Brazhe AR, Brazhe NA, Maksimov GV, Ignatyev PS, Rubin AB, Mosekilde E, Sosnovtseva OV. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study. *Journal of Biomedical Optics*, 2008; 13(3). DOI: 10.1117/1.2937213
7. Yusipovich AI, Bryzgalova NYu, Parshina YeYu, Lomakin AG, Rodnenkov OV, Levin GG, Maksimov GV, Rubin AB. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2008; 145(3):382-385. DOI: 10.1007/s10517-008-0097-3 (In Russ.)
8. Official site of JEOL company. Available from: http://jeolrus.com/products/d_products/jsm-7800f/index.html.
9. Zhu W, Wang ZhL, editors. Scanning Microscopy for Nanotechnology. Techniques and application. Springer; 2006. Available from: <http://bookree.org/reader?file=645711&pg=2>.
10. Kovalev NA, Krasochko PA. Virusy i priony v patologii zhivotnykh i cheloveka [Viruses and prions in animals and human pathology]. Minsk; 2012. Available from: <http://www.litres.ru/n-a-kovalev/virusy-i-priony-v-patologii-zhivotnykh-i-cheloveka-7063392>. (In Russ.)
11. Dlin VV, Gorchakova LN, Markaryan AS, Malinovskaya VV. Rol virusnoy infekcii v patogeneze gromerulonefrita u detey. Sovremennyye podkhody k immunokorregiruyushchey terapii [The viral infection role in children's glomerulonephritis pathogenesis. Modern approaches in immunocorrective therapy]. *Nefrologiya i dializ* = Nephrology and Dialysis. 2000; 2(4):285-289. Available from: <https://docviewer.yandex.ru/?url=http%3A%2F%2Fjournal.nephro.ru%2Findex.php%3Fr%3Djournal%2FdownloadPdfFile%26articleId%3D1793&lang=ru&c=574d7290a2fe>. (In Russ.)

Submitted 11.01.2016; accepted 11.05.2016; published online 30.09.2016

About the authors:

Sargylana N. Mamayeva, docent of General and Experimental Physics chair, Physical Technical Institute, Northen-Eastern Federal University (58, Belinskogo St., Yakutsk, Russia), Ph.D. (Physics and Mathematics), sargylana_mamaeva@mail.ru

Yana A. Munkhalova, head of Pediatrics and Pediatric Surgery chair, Medical Institute, Northen-Eastern Federal University (58, Belinskogo St., Yakutsk, Russia), Ph.D. (Medicine), tokmacheva@mail.ru

Irina V. Kononova, head of Teaching and Research of Clinical Immunology Laboratory, Medical Institute, Northen-Eastern Federal University (58, Belinskogo St., Yakutsk, Russia), irinakon.07@mail.ru

Afanasiy A. Dyakonov, leading engineer of Macromolecular Compounds and Organic Chemistry chair, Institute of Natural Sciences, Northen-Eastern Federal University (58, Belinskogo St., Yakutsk, Russia), afonya71185@mail.ru

Veronika N. Koryakina, student of Physical Technical Institute, Northen-Eastern Federal University (58, Belinskogo St., Yakutsk, Russia), vkever@mail.ru

Vitalina V. Shutova, docent of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry chair, National Research Mordovia State University (68, Bolshevistskaya St, Saransk, Russia), Ph.D. (Biology), **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6437-3621>, vshutova@yandex.ru

Georgiy V. Maksimov, professor of Biophysics chair, Lomonosov Moscow State University (1/12, Leninskiye gory, Moscow, Russia), Dr.Sci. (Biology), **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7377-0773>, gmaximov@mail.ru