

Оригинальное исследование
УДК 617.37–002.4:616.155.1–076.5

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ПАНКРЕАТИТОМ ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНЕЙ ТЯЖЕСТИ

Г.Н. Гуликян¹, Р.А. Пахомова², В.В. Козлов³

¹ ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» города Красноярск». Красноярск, Россия

² Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». Москва, Россия

³ ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. Атомно-силовая микроскопия в диагностике различных заболеваний с каждым годом применяется все больше и больше.

Цель. Проанализировать состояние эритроцитарной мембраны у пациентов с панкреатитом легкой и тяжелой степеней тяжести.

Материалы и методы. В мультицентровое исследование включены две группы пациентов. Всем больным проводилось атомно-силовая микроскопия эритроцитов, полученных из периферической венозной крови с помощью атомно-силового микроскопа. В качестве контрольной группы была исследована кровь доноров. Статистическая обработка выполнена с помощью программы Statistica 6.1. Во время исследования проводили сравнение линейных размеров, площади и объема эритроцитов и формы, а также состояние мембраны эритроцитов.

Результаты. При визуализации плазматической мембраны у пациентов с легкой степенью острого панкреатита отмечено появление бляшек. При тяжелом течении острого панкреатита были обнаружены эрозии эритроцитарной мембраны.

Выводы. Применение в качестве теста атомно-силовой микроскопии позволяет заметить тенденцию к прогрессированию заболевания на ранних сроках при отсутствии других изменений. Применение атомно-силовой микроскопии позволяет оперативно выявлять изменения тяжести состояния пациента еще до появления клинических и лабораторных изменений. Мониторинг состояния эритроцитов при атомно-силовой микроскопии необходим для своевременной коррективной проводимого лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острый панкреатит, атомно-силовая микроскопия, бляшки, эрозия, эритроцит

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ: Гуликян Гарен Нораирович, e-mail: gkns_100@mail.ru

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Гуликян Г.Н., Пахомова Р.А., Козлов В.В. Сравнительный анализ изменений плазматической мембраны эритроцитов, полученных при атомно-силовой микроскопии у пациентов с панкреатитом легкой и тяжелой степеней тяжести // Вестник Медицинского института непрерывного образования. — 2025. — Т. 5, № 1. — С. 13–17. — DOI 10.36107/2782-1714_2025-5-1-13–17.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ: Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ: Данные текущего исследования можно получить по обоснованному запросу у корреспондирующего автора.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ERYTHROCYTES PLASMA MEMBRANE OBTAINED BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN PATIENTS WITH MILD AND SEVERE PANCREATITIS

G.N. Gulikyan¹, R.A. Pakhomova², V.V. Kozlov³

¹ Clinical Hospital "RZHD-Medicine", Krasnoyarsk, Russia

² Medical Institute of Continuing Education, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

ABSTRACT

Background. Atomic force microscopy in the diagnosis of various diseases is being used more and more every year.

Purpose. To analyze the state of the erythrocyte membrane in patients with mild and severe pancreatitis.

Materials and methods. Two groups of patients were included in the multicenter study. All patients underwent atomic force microscopy of erythrocytes obtained from peripheral venous blood using an atomic force microscope. Blood from donors was examined as a control group. Statistical processing was performed using the Statistica 6.1 program. The linear dimensions, area and volume of red blood cells and the shape and condition of the erythrocyte membrane were compared during the study.

Results. When visualizing the plasma membrane in patients with mild acute pancreatitis, the appearance of blebbing was noted. In severe acute pancreatitis, erosions of the erythrocyte membrane were detected.

Conclusion. The use of atomic force microscopy as a test makes it possible to notice a tendency to disease progression in the early stages in the absence of other changes. The use of atomic force microscopy makes it possible to quickly detect changes in the severity of the patient's condition even before the appearance of clinical and laboratory changes. Monitoring of the state of red blood cells during atomic force microscopy is necessary for timely correction of the treatment.

KEYWORDS: acute pancreatitis, atomic force microscopy, blebbing, erosion, erythrocyte

CORRESPONDENCE: Garen N. Gulikyan, e-mail: gkns_100@mail.ru

FOR CITATIONS: Gulikyan G.N., Pakhomova R.A., Kozlov V.V. Comparative Analysis of Erythrocytes Plasma Membrane Changes Obtained by Atomic Force Microscopy in Patients with Mild and Severe Pancreatitis // Bulletin of the Medical Institute of Continuing Education. — 2025. — V. 5, No. 1. — P. 13–17. — DOI 10.36107/2782-1714_2025-5-1-13–17.

FUNDING SOURCE: The authors declare no funding for the study.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST: The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article

DATA AVAILABILITY STATEMENT: Data from the current study are available upon reasonable request from the corresponding author.

ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия с каждым годом все больше и больше применяется в диагностике различных заболеваний [1]. В отличие от световой и электронной микроскопии, данная методика позволяет увидеть состояние мембраны клетки и качественно оценить ее изменения [2]. В качестве объекта исследования чаще всего используют клетки крови (эритроциты, лимфоциты), предпочтение в исследованиях отдается эритроцитам [3]. Причина этого состоит в том, что изменения мембраны эритроцита полностью тождественны изменениям мембраны клеток в других органах, в том числе и в поджелудочной железе [4, 5]. Следовательно, АСМ плазматической эритроцитарной мембраны позволяет судить о степени тяжести острого панкреатита.

Использование атомно-силовой микроскопии эритроцитов при панкреатите обусловлено, во-первых, частотой встречаемости данного заболевания и высоким процентом развития осложнений и летальности [6]. Во-вторых, стандартные методы лабораторной и инструментальной диагностики не позволяют спрогнозировать течение заболевания [7, 8]. Как известно, острый панкреатит может перейти из легкой степени тяжести в панкреонекроз в течение 3 суток, а при молниеносной форме — в течение 24 часов [9, 10]. Именно это требует простой и быстрой диагностики состояния панкреоцитов с целью своевременного принятия мер по недопущению утяжеления состояния [11]. Выраженность изменения плазматической мембраны эритроцитов помогает спрогнозировать развитие панкреатита тяжелой степени тяжести.

Цель работы: проанализировать состояние эритроцитарной мембраны у пациентов с панкреатитом легкой и тяжелой степеней тяжести.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В мультицентровое исследование включены две группы пациентов: 32 с панкреатитом легкой степени тяжести и 33 — с тяжелым панкреатитом. Всем паци-

ентам из обеих групп при поступлении проводилось стандартное обследование, включающее клинический и биохимические анализы крови и мочи, УЗИ брюшной полости. В качестве контрольной группы выбраны эритроциты доноров (здоровых людей).

Также всем больным проводилось атомно-силовая микроскопия эритроцитов, полученных из периферической венозной крови. В подготовке и фиксации препарата необходимости не возникало. Анализ образцов крови проводили с помощью атомно-силового микроскопа Integra Aura (ЗАО «НТ-МДТ», Россия) как в полуконтактном, так и в контактном режимах. Проводилась оценка клетки в целом и оценка состояния мембраны эритроцита.

Статистическая обработка выполнена с помощью программы Statistica 6.1. Нормальность распределения оценивалась с помощью критерия Шапиро-Уилка (W). При отсутствии отличий распределения признака от нормального использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение ($M \pm SD$). В случае отсутствия нормального распределения использовали квартили и медиану. Группы сравнивались между собой с использованием t-критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни (U-test) при парных сравнениях и критерия Краскела-Уоллиса при множественных сравнениях. За статистически значимые принимали значения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во время исследования проводили сравнение линейных размеров, площади и объема и формы эритроцитов, а также состояние мембраны эритроцитов.

Сначала было проведено сравнение длины, ширины, высоты и глубины эритроцитарной впадины эритроцитов здоровых людей, пациентов с легким острым панкреатитом и с острым панкреатитом тяжелой степени (табл. 1).

В зависимости от тяжести течения отмечается значительное увеличение длины и ширины эритроцита, изменяются размеры впадины эритроцита, причем,

Таблица 1. Сравнение линейных размеров эритроцитов здоровых людей и больных с острым панкреатитом средней тяжести и тяжелого течения ($M \pm SD$)

	Кол-во исслед.	Длина (мкм)	Ширина (мкм)	Высота макс. (нм)	Высота мин. (нм)	Впадина (мкм)
1. Пр. здоровые	30	5,72±0,22	5,58±0,60	346,7±0,82	162,4±4,4	185,9±5,1
2. Легкой степени тяжести	32	8,71±0,28	8,39 ±0,68	346,5±0,51	160,9±5,6	182,4±4,8
3. Тяжелой степени тяжести	33	8,81±0,34	8,52±0,92	341,4±0,69	161,6±7,1	183,7±4,9
p 1–2		<0,001	<0,001	0,250	0,248	0,007
p 1–3		<0,001	<0,001	<0,001	0,597	0,086
p 2–3		0,201	0,520	<0,001	0,661	0,284

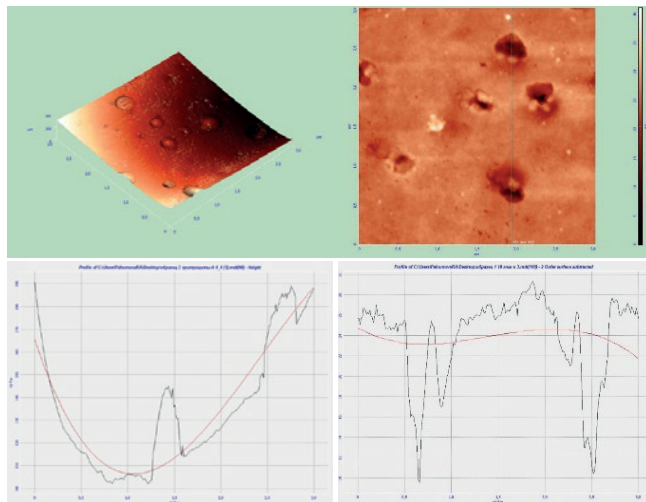


Рис. 1. Блеббинг мембраны эритроцита у пациента с острым панкреатитом средней степени тяжести

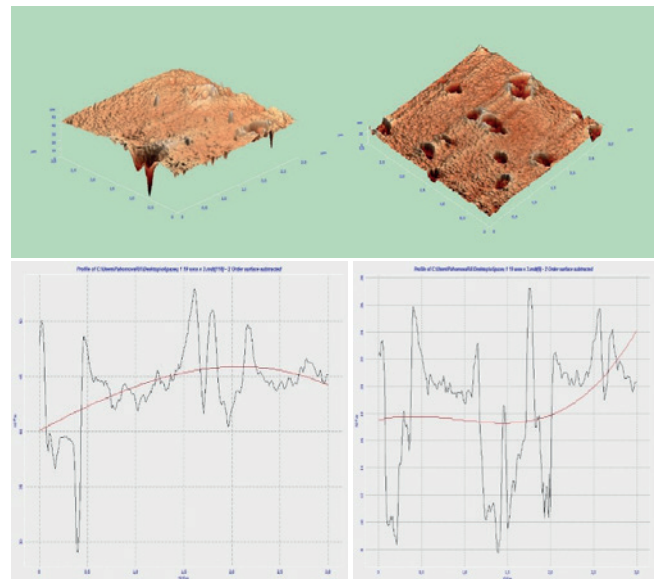


Рис. 2. Эрозии мембраны при остром панкреатите тяжелого течения

у пациентов с тяжелой степенью изменения более выраженные. Это свидетельствует о нарушении клеточного строения эритроцита.

Затем проводилось сравнение объема и площади эритроцита, определялась форма мембраны эритроцита (табл. 2).

При исследовании статистически значимо отмечено увеличение площади и объема эритроцитов. Кроме того, при визуализации плазматической мембраны отмечено появление блеббинга. Блеббинг — изменение поверхности мембраны, которое выражается в появлении везикул на поверхности, образующихся вследствие выпячивания последней. Чем больше количество и размер блеббинга, тем хуже прогноз на течение заболевания

и выше вероятность утяжеления течения процесса.

Блеббинг эритроцитарной мембраны обнаружен при визуализации поверхности эритроцита (рис. 1).

При остром панкреатите тяжелого течения на поверхности мембраны эритроцита появляются эрозии или язвы, представляющие собой нарушение целостности мембранозной оболочки (табл. 3).

Как видно из табл. 3, при остром панкреатите легкой степени тяжести эрозий выявлено не было. При тяжелом течении острого панкреатита было обнаружено в среднем 12 эрозий, практически близких по длине, ширине и глубине.

Наличие эрозий также можно визуализировать при проведении ACM (рис. 2).

Таблица 2. Сравнение объема, площади и формы эритроцитов здоровых людей и больных с острым панкреатитом легкой тяжести и тяжелого течения (M±SD)

	Кол-во	Площадь (мкм ²)	Объем (мкм ³)	Кол-во блеббинга	Длина блеббинга (мкм)	Ширина блеббинга (мкм)	Высота блеббинга (мкм)
1. Пр. здоровые	30	43,9± 1,8	8,1± 0,2	—	—	—	—
2. Легкой степени тяжести	32	51,3 ±3,4	14,7 ± 0,4	21,0± 3,1	0,26 ±0,02	0,28 ±0,03	0,24± 0,02
3. Тяжелой степени тяжести	33	46,1± 1,2	14,15±0,5	—	—	—	—
p 1-2		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p 1-3		<0,001	<0,001	—	—	—	—
p 2-3		<0,001	0,080	—	—	—	—

Таблица 3. ACM поверхности эритроцитов у пациентов легкой и тяжелой степеней тяжести (M±SD)

	Количество эрозий на 4x4 нм	Длина эрозий (мкм)	Ширина эрозий (мкм)	Глубина эрозий (мкм)
Легкая степень	0,0	0,0	0,0	0,0
Тяжелая степень	12,0±2,1	0,46±0,29	0,37±0,19	0,41±0,3
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p 1-2		<0,001	<0,001	<0,001
p 1-3		<0,001	<0,001	—
p 2-3		<0,001	0,080	—

Таблица 4. Содержание основных химических элементов в цитоплазме эритроцитов (Me [Q25; Q75])

Показатель	Норма	ОПЛСТ	ОПТСТ
Натрий (%)	4,2 [4,0; 4,4]	4,9 [4,5; 5,2] p=0,044	6,10 [5,7; 6,5] p<0,001
Калий (%)	0,3 [0,2; 0,3]	0,2 [0,16; 0,23] p=0,116	0,1 [0,11; 0,13] p<0,001
Кальций (%)	1,4 [1,1; 1,6]	1,9 [1,6; 2,1] p=0,018	2,6 [2,2; 2,9] p=0,001
Кислород (%)	20,3 [19,8; 21,5]	19,3 [18,3; 19,7] p=0,035	13,5 [13,2; 14,8] p<0,001
Углерод (%)	65,0 [60,5; 66,7]	67,2 [61,3; 70,8] p=0,356	67,6 [62,3; 73,4] p=0,421
Азот (%)	8,5 [7,8; 8,9]	7,7 [7,1; 8,2] p=0,078	7,6 [7; 8,2] p=0,111

*p — статистическая значимость различий между исследуемым показателем и нормой

Также был исследован химический состав цитоплазмы эритроцитов (табл. 4).

Как видно из табл. 4, все показатели претерпели изменения, особенно при тяжелой форме острого панкреатита. Больше всего тревожно снижение внутриклеточного калия на фоне гипернатриемии, что имеет неблагоприятное прогностическое значение. В то же время увеличение содержания кальция в цитоплазме эритроцита показывает тенденцию к разрушению клетки.

Жалобы, физикальный осмотр, результаты лабораторных и инструментальных методов обследования не всегда позволяют точно определить степень тяжести панкреатита, и, тем более, сделать прогноз возможного прогрессирования заболевания с исходом в панкреонекроз.

Применение в качестве теста атомно-силовой микроскопии позволяет заметить тенденцию к прогрессированию заболевания на ранних сроках при отсутствии других изменений. Увеличение количества бейблинга

на мембране эритроцита, наличие хотя бы одного эритроцита с эрозией мембраны должно насторожить хирурга и побудить внести изменения в лечение больного вплоть до выполнения хирургической операции в том или ином объеме. Особенно ценно применение АСМ при проведении ежедневного мониторинга состояния мембраны эритроцитов. Состояние эритроцита в периферической крови и его мембраны полностью идентично состоянию других клеток в организме, в том числе и панкреатитов. Чем тяжелее течение панкреатита, тем сильнее выражены изменения эритроцитов, а следовательно, и клеток поджелудочной железы. Панкреатит легкой степени тяжести характеризуется появлением бейблинга на мембране, что свидетельствует о нарушении ее стабильности. Чем больше количество и размер бейблинга, тем хуже прогноз течения заболевания. О тенденции к утяжелению состояния свидетельствует увеличение количества бейблинга при динамическом наблюдении. Наличие эрозий плазматической мембраны эритроцита свидетельствует о панкреатите тяжелого течения — чем больше эрозий, чем они больше и глубже по размерам, тем большая вероятность развития панкреонекроза.

АСМ не причиняет дополнительных страданий пациенту, так как в протоколе лечения включен ежедневный забор крови из кубитальной вены или из центрального венозного катетера для проведения биохимического и клинического анализов крови. Кроме того, данная процедура финансово малозатратна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение данных о прогрессирующих изменениях мембраны эритроцита позволяет своевременно изменить проводимое лечение и незамедлительно решить вопрос о необходимости хирургического вмешательства, не допуская развития тотального панкреонекроза и присоединения системного воспалительного ответа и септических осложнений.

Мониторинг состояния эритроцитов при АСМ необходим для своевременной корректировки проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

- Платонова К. Н. и др. Исследование эритроцитов человека методом сканирующей электронной микроскопии: условие проведения эксперимента // Молодой ученый. — 2020. — № 23. — С. 27–33.
- Башук В. В. и др. Морфологические и морфофункциональные свойства эритроцитов в группе практически здоровых людей // Фундаментальные исследования. — 2014. — № 4–2. — С. 242–245.
- Мороз В. В. и др. Атомная силовая микроскопия структуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и реинфузии // Общая реаниматология. — 2009. — Т. 5. — № 5. — С. 5–9.
- Шейн А. В., Карпунин В. С. Исследование типов поверхности при помощи атомно-силового микроскопа // Молодой ученый. — 2016. — № 13. — С. 274–278.
- Тимашев П. С., Королева А. В., Коновалов Н. А., Котова С. Л., Соловьева А. Б. Атомно-силовая микроскопия — дополнительный метод в биомедицинских морфологических исследованиях // Современные технологии в медицине. — 2018. — № 10. — С. 70.
- Пахомова Р. А., Гулиян Г. Н. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов больных панкреонекрозом // Сибирское медицинское обозрение. — 2022. — № 2 (134). — С. 49–55. DOI: 10.20333/25000136–2022–2–49–55
- Грекова Н. М. и др. Острый панкреатит: современные концепции хирургического лечения // Новости хирургии. — 2020. — Т. 28. — № 2. — С. 197–206. DOI: 10.18484/2305–0047.2020.2.197
- Kwong W. T. Y., Ondrejková A., Vege S. S. Predictors and outcomes of moderately severe acute pancreatitis—evidence to reclassify // Pancreatology. — 2016. — Т. 16. — № 6. — С. 940–945. DOI: 10.1016/j.pan.2016.08.001
- Капралов С. В. и др. Возможности прогнозирования степени тяжести острого панкреатита в ранние сроки // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н. И. Пирогова. — 2023. — Т. 18. — № 2. — С. 41–45. DOI: 10.25881/20728255_2023_18_2_41

10. Халадова Л. М., Зангионов Г. Э., Карсанов А. М. Показатели заболеваемости и смертности при остром панкреатите как индикатор состояния медицинской помощи на региональном уровне // Научный Лидер. — 2023. — С. 26–28.
11. Паршин Д. С., Михайличенко В. Ю., Абдуллаев А. Я. Острый панкреатит: новые факты и подводные камни (обзор литературы) // Таврический медико-биологический вестник. — 2023. — Т. 26. — №3. — С. 131–140.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гуликян Гарен Нораирович — к.м.н., врач-хирург, «Клиническая больница «РЖД-Медицина» города Красноярск». ORCID 0000-0002-1549-0319.

Пахомова Регина Александровна — д.м.н., руководитель кафедры пластической и реконструктивной хирургии МИНО ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ». ORCID 0000-0002-3681-4685.

Козлов Василий Владимирович — к.м.н., доцент, доцент кафедры общественного здоровья и здравоохранения имени Н. А. Семашко, Первый МГМУ им. И. М. Сеченова. ORCID 0000-0002-2389 3820.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Гуликян Г.Н. — набор материалов, написание исследования.

Пахомова Р.А. — дизайн исследования.

Козлов В.В. — статистическая обработка.

ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ НА ПУБЛИКАЦИЮ: Авторы получили письменное согласие пациентов на публикацию медицинских данных и фотографий.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ: авторы заявляют, что все процедуры, описанные в данной статье, соответствуют этическим стандартам учреждений, проводивших исследование, и соответствуют Хельсинкской декларации в редакции 2024 г. Статья одобрена Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» (Москва, Волоколамское шоссе, дом 11) протокол No 8/3 от 25 марта 2025.

ПОСТУПИЛА: 20.01.2025

ПРИНЯТА ПОСЛЕ РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ: 10.03.2025

ОПУБЛИКОВАНА: 30.03.2025