

УДК: 612.84:778.38

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ РОЖЕНИЦ И НОВОРОЖДЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ЦИФРОВОГО ГОЛОГРАФИЧЕСКОГО ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО МИКРОСКОПА**Т.В.Тишко¹, В.П.Титар¹, Д.Н.Тишко¹, В.А.Бондаренко¹, В.В.Мартыненко¹, Н.В.Стаценко¹, В.И.Корвай²**¹ Харьковський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харьков, Україна)² Городской родильный дом №7 г. Харькова (Харьков, Украина)

Исследовалась морфология эритроцитов крови беременных женщин без гемопатологии с нарушениями углеводного обмена, а впоследствии рожениц и новорожденных. Исследования проводились с помощью цифрового голографического интерференционного микроскопа. Обнаружено, что у большинства обследованных женщин морфология эритроцитов не соответствует медицинской норме. Специфических изменений морфологии эритроцитарного пула у пациенток с нарушениями углеводного обмена не выявлено. Установлена морфологическая особенность эритроцитов новорожденных. Соответствия между формой эритроцитов матери и новорожденного не выявлено. Исследования подтвердили, что морфология эритроцитов претерпевает изменения не только при гематологических заболеваниях, но и при патологии различного генеза и отражает состояние организма в целом.

Ключевые слова: *эритроцит, морфология, сахарный диабет, роженица, новорожденный, цифровой голографический интерференционный микроскоп.*

Введение

Красные клетки крови (эритроциты) являются клетками живого организма, морфология которых (а именно отношение площади поверхности эритроцита к его объему) определяет их функциональные возможности по снабжению организма кислородом. Кроме того, проведенные в последние годы исследования показали, что красные клетки крови испытывают патологические изменения не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевают значительные морфологические изменения при заболеваниях различного генеза (Новицкий и др., 2004; Тишко и др., 2006). Изучение морфологии эритроцитов при различной патологии организма представляет большой интерес потому, что они участвуют в процессах гомеостаза всего организма. Следовательно, эритроциты крови являются самыми удобными для медицинской практики объектами для оценки состояния всего организма и его биологического отклика на воздействие различных внешних факторов.

Наиболее частой причиной смертности и высокой заболеваемости среди новорожденных является внутриутробная гипоксия, способствующая развитию асфиксии. Гипоксия – не самостоятельное заболевание, а лишь следствие различных заболеваний материнского организма и самого плода. Достаточное снабжение плода кислородом обеспечивается интенсивностью маточно-плацентарного кровообращения, проницаемостью плацентарного барьера, а также свойствами самих эритроцитов и гемоглобина матери и плода. Однако в медицинской литературе отсутствуют данные об исследовании морфологии эритроцитов крови рожениц и новорожденных в норме и патологии.

Для исследования эритроцитов крови до настоящего времени применялись различные биохимические и биофизические методы (Даниленко и др., 2006), но наиболее ценная информация о характере морфологических изменений красных кровяных клеток при различной патологии была получена с помощью электронной микроскопии (Новицкий и др., 1999; Новицкий и др., 2000а, б; Новицкий и др., 2003). До настоящего времени электронная микроскопия была единственным методом, который позволял получать трехмерные изображения микрообъектов. Электронная микроскопия позволяет получать изображения микрообъектов с высоким разрешением, но этот метод требует специальной подготовки препарата и поэтому исследование нативных биомедицинских микрообъектов этому методу недоступно. Необходимость исследования нативных медицинских препаратов поставило задачу разработки методов наблюдения, при которых бы при подготовке препарата не производилось воздействие на исследуемый микрообъект.

Красные клетки крови человека, как и другие клетки живого организма, являются фазовыми микрообъектами. Такие микрообъекты практически не изменяют интенсивность проходящего через них излучения и не видны в обычный световой микроскоп. Для наблюдения фазовых микрообъектов необходимо фазовые изменения, вносимые такими микрообъектами в проходящую через них световую волну, преобразовать в изменение интенсивности. В классической световой микроскопии

для наблюдения фазовых микрообъектов применяются такие методы, как метод фазового контраста Цернике и метод интерферометрии. Однако задача трехмерной визуализации фазовых микрообъектов в классической микроскопии не была решена.

Появление голографии открыло новые возможности в микроскопии фазовых микрообъектов. Сочетание методов голографической микроскопии с методами компьютерной обработки изображений позволило решить задачу трехмерной визуализации фазовых микрообъектов. В лаборатории голографии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина создан цифровой голографический интерференционный микроскоп, который позволяет в реальном времени получать трехмерные изображения нативных фазовых микрообъектов и измерять их морфологические параметры (Тишко и др., 2005). Цифровой голографический интерференционный микроскоп использовался для исследования влияния озонотерапии на эритроциты крови пациентов *in vivo* (Тишко и др., 2000), влияния гамма-радиации на клетки крови крыс *in vivo* и *in vitro* (Паранич и др., 2002).

В данной работе представлены результаты применения цифрового голографического интерференционного микроскопа (ЦГИМ) для исследования морфологии эритроцитов крови рожениц в норме и патологии, а также морфологических особенностей эритроцитов новорожденных.

Методика

Исследования проводились на базе лаборатории Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Забор материала для исследования производили в городском родильном доме №7 города Харькова, который является профильным по сахарному диабету.

Объектами исследования послужили нефиксированные и неокрашенные мазки крови. Забор крови производили у беременных женщин без гемопатологии в возрасте от 19 до 36 лет с нарушениями углеводного обмена: сахарным диабетом (СД) 1-го типа тяжелой формы, гестационным СД в сроках гестации от 8 до 17 и 32–40 недель; впоследствии у рожениц и новорожденных в течение часа после родов и на третьи сутки.

Количество обследованных составило 54 человека (41 женщина и 13 новорожденных). Из числа обследованных 21 больных беременных женщин 9 с СД 1 типа тяжелой формы в сроках гестации от 32 до 40 недель, 2 из них дополнительно обследовались в период 8–17 недель, и 12 беременных с гестационным СД в сроках 32–40 недель, из которых 4 женщины наблюдались также ранее в сроках 8–17 недель. Были обследованы 13 новорожденных, из которых 6 рождено от женщин с СД 1 типа, 5 – от женщин с гестационным СД, 2 – контрольная группа, родители которых не имели нарушений углеводного обмена. Контрольная группа женщин состояла из 10 беременных женщин без патологии углеводного обмена (из них 5 – в сроке гестации 8–17 недель, 5 – в сроке 32–40 недель) и 10 небеременных здоровых женщин в возрасте 22–36 лет.

Для исследований использовались мазки из периферической крови, сделанные на предметных стеклах согласно унифицированному методу (Приказ ..., 1981). На сухое подготовленное предметное стекло ближе к короткой стороне наносилась небольшая капля крови непосредственно из места укола. Стекло оставлялось в горизонтальном положении и с помощью отшлифованного стекла, расположенного под углом 45 градусов к поверхности предметного стекла, коротким ребром, подождав, пока вся кровь расплывется по нему, быстро проводили по предметному стеклу.

Мазки крови помещались в цифровой голографический интерференционный микроскоп, с помощью которого получали интерферограммы исследуемых объектов. Интерферограммы регистрировались с помощью цифровой видеокамеры. Оцифрованные интерферограммы передавались в компьютер, где в результате цифровой обработки интерферограмм восстанавливались трехмерные изображения эритроцитов. В качестве источника излучения в ЦГИМ использовался He-Ne лазер с длиной волны излучения 0,63 микромметра.

Трехмерная форма эритроцита характеризовалась коэффициентом сферичности k , который определялся как отношение толщины эритроцита в его центре к толщине на половине радиуса. Коэффициент сферичности вычислялся для каждого эритроцита при компьютерной обработке интерферограмм.

Результаты и обсуждение

Предварительные исследования показали, что существуют три основных морфологических типа эритроцитов, которые можно определить как двояковогнутые эритроциты, эритроциты в виде плоских дисков и сфероциты. На рис. 1 и 2 представлены основные типы эритроцитов, которые мы обнаружили в мазках крови.

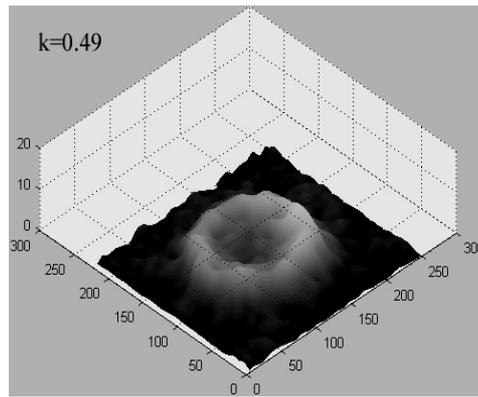


Рис. 1. Эритроцит крови человека в виде двояковогнутого диска

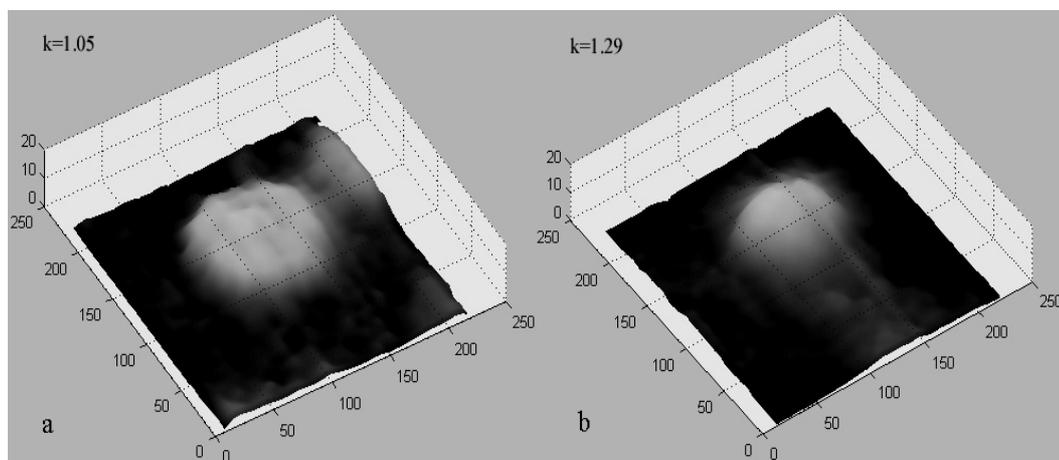


Рис. 2. Эритроцит крови человека в виде плоского диска (а) и сфероцит (b)

Двояковогнутая форма эритроцитов (рис. 1) считается нормой. Коэффициент сферичности таких эритроцитов меньше 1. Функциональные возможности таких эритроцитов максимальны и они характерны для здорового человека.

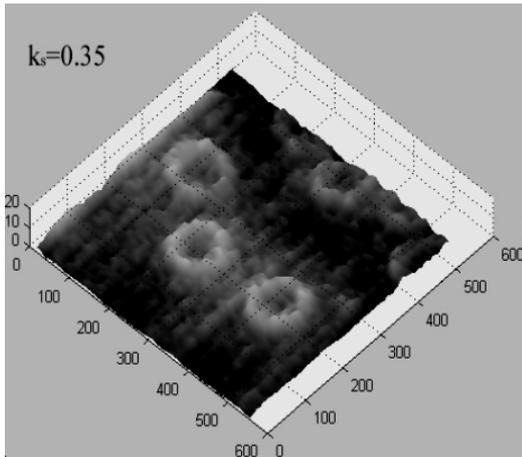
Два других типа эритроцитов относятся к патологическим случаям. Коэффициент сферичности эритроцитов в виде плоских дисков (рис. 2а) около 1, коэффициент сферичности сфероцитов (рис. 2b) – больше 1. Функциональные возможности таких эритроцитов снижены.

Основные морфологические типы эритроцитов и их различные варианты были обнаружены в мазках крови как беременных и рожениц с различной патологией углеводного обмена (сахарный диабет 1 типа, тяжелая форма; гестационный сахарный диабет), так и в крови беременных без патологии углеводного обмена, а также у здоровых небеременных женщин, входивших в контрольную группу.

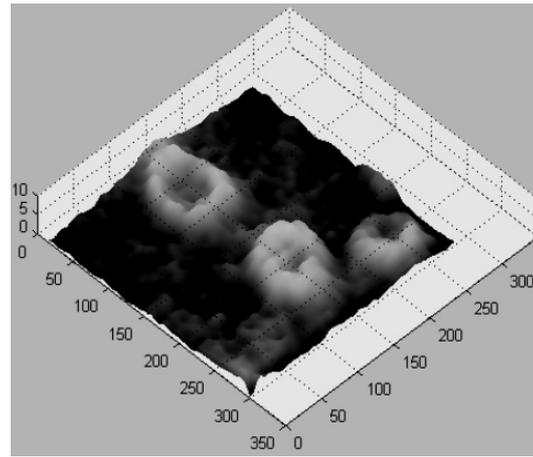
На рис. 3 представлен фрагмент мазка крови здорового человека. Можно видеть, что в мазке крови здорового человека доминируют эритроциты с нормальной двояковогнутой дискоидальной формой, средний коэффициент сферичности которых равен 0,35.

Результаты обследования беременных и рожениц, а также контрольной группы представлены на рис. 4 и 5. Только у 5 из 41 обследованных женщин эритроциты соответствовали медицинской норме. На рис. 4 представлен типичный фрагмент мазка крови таких пациенток. В крови остальных 32 женщин доминировали эритроциты в виде плоских дисков, не соответствующих норме. На рис. 5 представлен фрагмент мазка крови одной из рожениц, в котором преобладали такие типичные формы в виде плоских дисков.

В ходе исследования было выявлено, что плоские дискоциты (с присутствием единичных сфероцитов) могут доминировать в крови как здоровых беременных в разных сроках гестации, так и беременных с патологией углеводного обмена (сахарный диабет 1-го типа, гестационный сахарный диабет). Специфических изменений морфологии эритроцитарного пула при патологии углеводного обмена в ходе данного исследования не выявлено. Кроме того, такая закономерность характерна и для здоровых небеременных женщин детородного возраста, составивших контрольную группу.



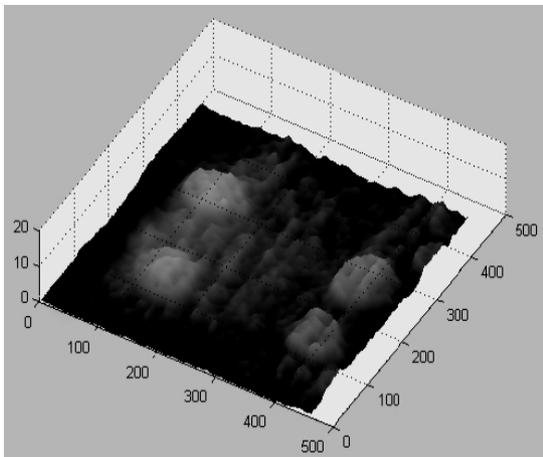
**Рис. 3. Фрагмент мазка крові здорового
чоловіка**



**Рис. 4. Фрагмент мазка крові роженниці
с преобладанием эритроцитов
двояковогнутой формы**

Как следует из представленных результатов, корреляции между формой эритроцитов матери и новорожденного не выявлено.

Эритроциты всех обследованных новорожденных в первые, вторые и третьи сутки имели форму плоских дисков. На рис. 6 представлен фрагмент мазка крови одного из детей. Учитывая то, что кровь новорожденных имеет определенные отличия (наличие ядросодержащих эритроцитов, транзиторный эритроцитоз, повышенный уровень гемоглобина, почти половину которого составляет фетальный гемоглобин), можно предположить, что такая форма эритроцитов является морфологической особенностью эритроцитов новорожденных.



**Рис. 5. Фрагмент мазка крові роженниці с
преобладанием эритроцитов со сниженными
функциональными возможностями**

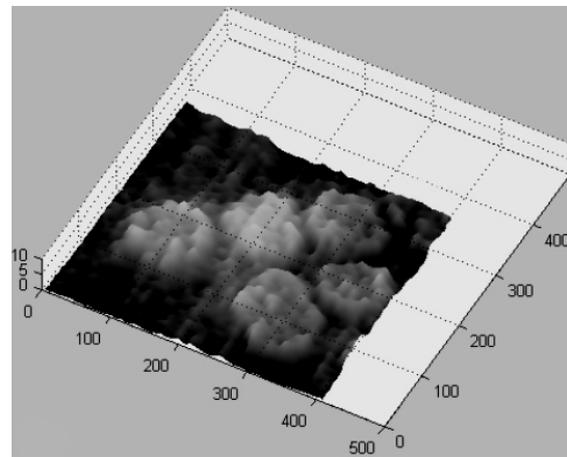


Рис. 6. Фрагмент мазка крові новорожденного

Полученные результаты оказались неожиданными. Тот факт, что у большинства обследованных беременных женщин (в норме и с патологией углеводного обмена), а также у женщин контрольной группы морфология эритроцитов не соответствует медицинской норме, требует дальнейшего изучения и объяснения. Подобные нарушения морфологии эритроцитов обуславливают снижение способности крови к снабжению органов и тканей организма кислородом и другими веществами, приводят к снижению функциональных возможностей всего организма. Наличие подобных нарушений у беременных женщин могут явиться одной из причин нарушений снабжения плода кислородом и приводить к развитию гипоксии плода и различных патологий у новорожденных.

Выводы

Проведенные исследования не выявили специфических изменений морфологии эритроцитарного пула у беременных и рожениц с патологией углеводного обмена (сахарный диабет 1-го типа, гестационный сахарный диабет).

В результате проведенных исследований было обнаружено, что у большинства обследованных женщин, как с патологией углеводного обмена, так и здоровых беременных, а также в контрольной группе небеременных здоровых женщин детородного возраста морфология эритроцитов не соответствует медицинской норме.

Установлено, что в крови всех обследованных новорожденных доминируют эритроциты в виде плоских дисков. Можно предположить, что такая форма эритроцитов является морфологической особенностью новорожденных. Соответствия между формой эритроцитов матери и новорожденного не выявлено.

Проведенные исследования подтвердили, что морфология эритроцитов претерпевает изменения не только при гематологических заболеваниях, но и при патологии различного генеза и отражает состояние всего организма. Поэтому исследование трехмерной морфологии эритроцитов может стать частью общего гематологического анализа.

Цифровой голографический интерференционный микроскоп, который позволяет получать в реальном времени трехмерные изображения фазовых микрообъектов и измерять их морфологические параметры, является эффективным прибором для подобных медицинских и биологических исследований и может найти применение как в медицинских центрах, так и в научных лабораториях.

Список литературы

- Даниленко Н.А., Мартыненко В.В., Бондаренко В.А. Особенности развития постгипертонического лизиса эритроцитов человека в присутствии хлорида алюминия // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – Вип.1. – С. 22–28.
- Новицкий В.В., Колосова М.В., Кравець Е.Б. Структурно-метаболический статус и функциональные особенности эритроцитов при инсулинзависимом сахарном диабете у детей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – №10. – С. 429–432 (а).
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Плотников М.Б. Морфофункциональный статус эритроцитарной популяции при шизофрении // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – №9. – С. 347–351.
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Соколович А.Г., Михайленко В.В. Морфологические особенности эритроцитов периферической крови у больных с распространенным атеросклерозом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – №11. – С. 19–21 (б).
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Атлас «Клинический патоморфоз эритроцитов». – Издательство Томского университета, 2003. – 206с.
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Физиология и патофизиология эритроцита. – М.: Изд. РАМН, 2004. – 200с.
- Паранич А.В., Тішко Т.В., Титарь В.П. и др. Применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния гамма-радиации на морфологию эритроцитов крыс при облучении *in vivo* и *in vitro* // Радіофізичний вісник. Вісник Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна. – 2002. – №544. – С. 40–45.
- Приказ Министерства здравоохранения СССР №1175 от 21.11.1979г. “Об унификации клинических лабораторных методов исследования”. – М., 1981. – 86с.
- Тішко Т.В., Титарь В.П., Тішко Д.Н. Голографические методы трехмерной визуализации фазовых микрообъектов // Оптический журнал. – 2005. – Т.72, №2. – С. 48–55.
- Тішко Т.В., Титарь В.П., Тішко Д.Н. Применение цифрового голографического интерференционного микроскопа для исследования трехмерной морфологии красных клеток крови человека // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна. Серія: «Радіофізика та електроніка». – 2006. – №712. – С. 52–56.
- Тішко Т.В., Титарь В.П., Бархоткина Т.М. и др. Применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния озонотерапии на форму эритроцитов крови человека // Биофизический вестник. Вестник Харьковского университета. – 2000. – Т.2 (7), №497. – С. 103–111.

**ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ВАГІТНИХ ТА НЕМОВЛЯТ ІЗ
ЗАСТОСУВАННЯМ ЦИФРОВОГО ГОЛОГРАФІЧНОГО ІНТЕРФЕРЕНЦІЙНОГО МІКРОСКОПА
Т.В.Тішко, В.П.Титар, Д.М.Тішко, В.А.Бондаренко, В.В.Мартиненко, Н.В.Стаценко,
В.І.Коровай**

Досліджувалася морфологія еритроцитів крові вагітних без гемопатології з порушенням вуглеводного обміну, а потім породілей та немовлят. Дослідження проводилися із застосуванням цифрового голографічного інтерференційного мікроскопу. Знайдено, що у більшості жінок, що досліджувалися, морфологія еритроцитів не відповідає медичній нормі. Специфічних порушень еритроцитарного пулу у пацієнок з порушенням вуглеводного обміну виявлено не було. Виявлена морфологічна особливість еритроцитів немовлят. Кореляції між формою еритроцитів матері та немовляти не знайдено. Дослідження підтвердили, що морфологія еритроцитів набуває змін не тільки при гематологічних хворобах, а й при захворюваннях різного генезу та відтворює стан організму у цілому.

Ключові слова: *еритроцит, морфологія, цукровий діабет, породілля, немовля, цифровий голографічний інтерференційний мікроскоп.*

**INVESTIGATION OF BLOOD ERYTHROCYTES MORPHOLOGY OF PREGNANT WOMEN AND
NEWBORN INFANTS USING THE DIGITAL HOLOGRAPHIC INTERFERENCE MICROSCOPE
T.V.Tishko, V.P.Titar, D.N.Tishko, V.A.Bondarenko, V.V.Martinenko, N.V.Statzenko, V.I.Korovay**

Blood erythrocytes morphology of pregnant women without hematological pathology, suffering from carbohydrates metabolic derangement, and newborn infants was investigated. Investigations were carried out using the digital holographic interference microscope. It was found that erythrocytes morphology of the majority of the women did not correspond to the medical norms. Specific changes of erythrocytes morphology of patients with diabetes mellitus were not detected. Morphological features of newborn infants erythrocytes were found out. Correlation of erythrocytes shape of a mother to erythrocytes shape of a child was not observed. The investigations confirmed, that erythrocytes morphology changes were observed not only under hematological diseases, they were coursed by pathology of different geneses and erythrocytes morphology reflected a state of an organism as a whole.

Key words: *erythrocyte, morphology, diabetes mellitus, pregnant woman, newborn infant, digital holographic interference microscope.*

Представлено М.М.Горобцем
Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко