

УДК 576.31

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЛЯГУШЕК МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

М.Ю. Скоркина, Е.А. Сладкова

*Белгородский государственный университет,
ул. Победы, 85, Белгород, Россия. E-mail: marina_skorkina@mail.ru*

Морфометрические параметры эритроцитов определяют эффективность участия клеток в локальной регуляции кислородообеспечения тканей, а вся совокупность эритроидной популяции в тканевом микроциркуляторном русле является ключевым звеном сопряжения местных тканевых и интегральных систем регуляции структурно-функционального гомеостаза [1]. В научной литературе представлены и постоянно обсуждаются различные способы исследования формы клеток с использованием методов световой и электронной микроскопии. Исследователи отмечают, что обычная световая микроскопия дает нечеткое изображение краев объекта (0,5 мкм). Это соответствует 6 %-й возможной ошибке в определении диаметров и 20 %-й ошибке – в определении толщины эритроцитов [2]. Анализаторы изображений на базе световых микроскопов, позволяющие найти для каждого объекта координаты x и y , его положение в измеряемом поле, данные о ближайших соседних объектах, оптическую плотность исследуемой площади [3, 4], имеют ряд существенных недостатков, главным из которых является измерение параметров объектов в двух плоскостях, при этом высоту клеток технически измерить невозможно. Традиционная модель для описания формы эритроцита, используемая в программных обеспечениях анализаторов изображений, принимает клетку за цилиндрическое тело. В основе расчета геометрических характеристик эритроцитов (объема, площади поверхности, толщины) приняты промеры их диаметров и определение показателя гематокрита, при этом не учитываются погрешности, присущие определению гематокрита [5]. С целью изучения морфологии эритроцитов птиц и низших позвоночных нами был разработан способ оценки морфометрических индексов клетки эллипсоидной формы [6, 7], который, однако, не учитывал трехмерных характеристик измеряемых объектов. Широкое внедрение в практику исследований методов сканирующей зондовой микроскопии для изучения морфологии клеток крови позволило получать трехмерные изображения, сведения об особенностях строения поверхностной цитомембраны, морфологически характеризовать различные формы эритроцитов, определять их процентное содержание и функциональные особенности [8, 9].

Проведенные исследования посвящены изучению морфометрических параметров эритроцитов лягушек методом сканирующей зондовой микроскопии с целью сопоставления с аналогичными данными, полученными методом световой микроскопии при разработке математической модели эллипсоида вращения.

Материалы и методы исследования

Исследования выполнены в ЦКП «Наноструктурные материалы и нанотехнологии» и лаборатории «Физиология клеток крови» кафедры анатомии и физиологии человека и животных Белгородского государственного университета. В качестве объекта исследования использовали ядренные эритроциты лягушек *Rana ridibunda* Pall. Кровь брали пункцией сердца. Готовили суспензию клеток крови путем разведения ее в физиологи-

ческом растворе в соотношении 1:20. Каплю полученной суспензии капали на подложку, высушивали при комнатной температуре на воздухе. Этот способ позволяет получить равномерный монослой эритроцитов.

СЗМ-исследования проводили на сканирующем зондовом микроскопе Quanta 200 3D (FEI, США) в режиме низкого вакуума. Сканирование проводили контактным методом с использованием кантилевера марки НА_С1. Размер выборки составил 10 клеток.

Одновременно изучали морфометрические параметры эритроцитов лягушек на мазках, приготовленных по стандартным методикам [10], с использованием метода световой микроскопии. Размер выборки 200 эритроцитов. В работе использовали аппаратно-программный комплекс визуализации изображений с программным обеспечением «ВидеоТест-МастерМорфология» (Санкт-Петербург). Полученные данные были статистически обработаны.

Результаты исследования

В контактном режиме на малых полях сканирования получены изображения эритроцитов лягушек эллипсоидной формы с центрально-расположенным ядром (рис. 1).

На изображениях измерены морфометрические параметры эритроцитов лягушек: диаметр клетки длиной оси эллипса составил $21,37 \pm 0,24$ мкм, короткой оси – $14,01 \pm 0,88$ мкм. Размеры ядра составили по длинной оси $7,93 \pm 0,7$ мкм, по короткой оси – $7,52 \pm 0,4$ мкм. При измерении толщины клеток подложка с образцом была повернута под углом 70° к кантилеверу. Установлено, что толщина клетки в различных ее частях неодинакова: в области выступа ядра она составила $1,62 \pm 0,19$ мкм, на периферии $673,60 \pm 3,9$ нм. Полученные данные были сопоставлены с данными морфометрического профиля клеток при измерении их размеров на мазках методом световой микроскопии. Результаты представлены в табл. 1.

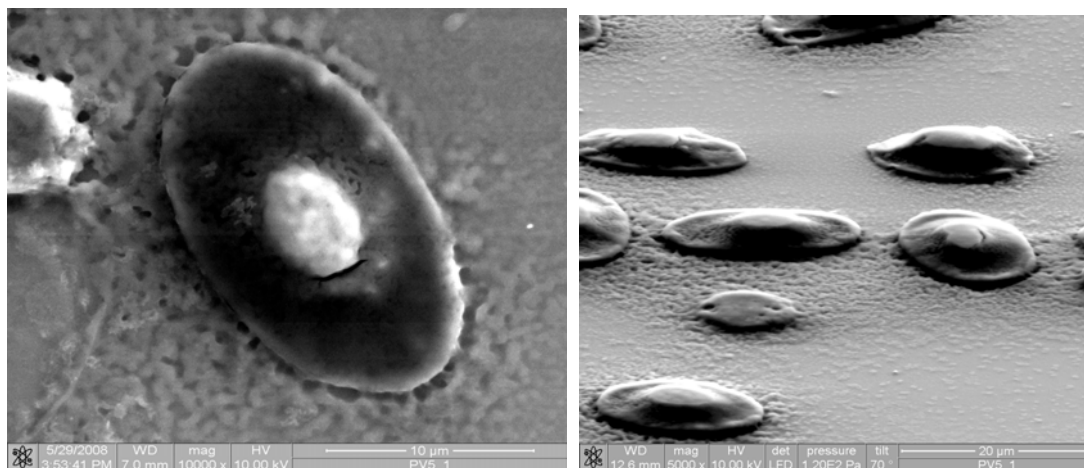


Рис. 1. СЗМ-изображения участков исследуемого образца

Таблица 1

Значения морфометрических индексов эритроцитов лягушек при различных способах измерения

Параметр эритроцита	Приемы расчетов морфометрических индексов	СЗМ-измерения	Прием расчетов морфометрических индексов (модель клетки – эллипсоид вращения)	Световая микроскопия
$D_{\max}$, мкм		$21,37 \pm 0,24$		$22,33 \pm 0,14$
$D_{\min}$, мкм		$14,01 \pm 0,88$		$15,13 \pm 0,08$
Объём, мкм ³	$V = \frac{4}{3} \pi abc$	$253,83 \pm 3,24$	$V = \frac{4}{3} \pi ab^2$	$2721,77 \pm 46,28$
Коэффициент эксцентricности	$\varepsilon = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}$	$0,75 \pm 0,09$	$\varepsilon = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}$	$0,73 \pm 0,001$
Толщина (высота), мкм		$1,62 \pm 0,19$	$T = \frac{\pi b}{4}$	$5,94 \pm 0,03$

Примечание: $D_{\max}$ – длинная ось эллипса, $D_{\min}$ – короткая ось эллипса, T – высота, R – средний радиус эритроцита, a – длинная полуось эллипса, b – короткая полуось эллипса, c – малая полуось эллипса, ε – числовая эксцентricность

Анализ результатов проведенных исследований показал, что количественный способ оценки формы эритроцитов лягушек, построенный на модели эллипсоида вращения, имеет явно завышенные результаты расчета объема и площади поверхности, поскольку форма эритроцита не является «геометрически правильной» и эта особенность исключалась в применяемых математических формулах. Высота клетки, получаемая расчетным путем, в 3,6 раза завышена по сравнению с фактически измеренной, отсюда и отличия геометрических параметров клетки в математически построенной модели эллипсоида вращения. Полученные значения морфометрических индексов эритроцитов методом СЗМ-измерений не могут рассматриваться в качестве абсолютных размеров клеток, так как существует опасение влияния зонда на клеточную поверхность и изменения морфологии клеток под его воздействием. Несмотря на мнение о том, что внешние воздействия сильнее сказываются на эластических свойствах мембран, чем на морфологии клеток [11], необходимы дополнительные исследования по изучению воздействия зонда на морфометрические параметры клеток.

Литература

1. Шилов В.Н. Молекулярные механизмы структурного гомеостаза. М.: Интерсигнал, 2006. 288 с.
2. Лейси А. Световая микроскопия в биологии: методы. М.: Мир, 1992. 462 с.
3. Козинец Г.И. Применение компьютеров в гематологических, цитологических исследованиях // Лабораторное дело. 1990. № 3. С. 21–24.

4. Байдун Л.В., Кашнар С.А., Плясунова С.А. Автоматическая эритроцитометрия в роботизированном микроскопе МЕКОС-Ц1 // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. № 10. С. 6.
5. Чижевский А.Л. Биофизические механизмы РОЭ. Новосибирск: Наука СО, 1980. 175 с.
6. Пат. на изобретение С1 2234701 RU G 01N 33/48 A 61B 10/00. Способ идентификации субпопуляций эритроцитарной системы / Е.А. Липунова, В. М. Никитин, Н.А. Чеканов, М.Ю. Скоркина (Белгородский гос. ун-т). – № 2002134029; заявл. 17.12.02 // БИПМ № 23, Ч. III. 2004. С. 573.
7. Скоркина М.Ю., Зеленцова А.С., Гончаренко М.Н. Биометрические параметры эритроцитов амфибий при гипоосмотической нагрузке // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. – Томск: СГМУ, 2004. № 1–3. С. 180–182.
8. Нагаева Т.А., Балашова И.И., Саратиков А.С. Метод сканирующей электронной микроскопии эритроцитов периферической крови в диагностике и лечение геморрагического васкулита у детей // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. № 5. С. 12–14.
9. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Антоненко Н.М. Особенности поверхностного рельефа эритроцитов периферической крови у больных шизофренией (по данным сканирующей эл. микроскопии) // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. № 4. С. 43–46.
10. Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Триада-Х, 1997. 480 с.
11. You H.X., Yu L. Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects // Methods Cell Sci. 1999. V. 21, № 1. Pp. 1–17.