

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭЛЕМЕНТОВ ФИЛЬТРА «РОСА» АППАРАТА НЕМОФЕНИХ И КРОВИ ПРИ МЕМБРАННОМ ПЛАЗМАФЕРЕЗЕ И ЛАЗЕРНОМ ОБЛУЧЕНИИ

Байбеков И.М., Бутаев А.Х., Саидханов Б.А.

Лаборатория патологической анатомии (руководитель – д. м. н., проф. И.М. Байбеков),
Республиканский специализированный центр хирургии им. акад. В. Вахидова МЗ РУз (директор – д. м. н., проф. Ф.Г. Назыров), Ташкент, Узбекистан

Цель исследования. Изучить с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) взаимодействие структурных элементов фильтра «Роса» аппарата НЕМОФЕНИХ при мембранном плазмаферезе с эритроцитами и влияние на них лазерного облучения во время процедуры. **Материал и методики.** С помощью сканирующей электронной микроскопии и морфометрии изучены клетки крови и компоненты плазмафильтра при плазмаферезе у пациентов с миастенией. **Результаты.** Показано, что при миастении возрастает доля патологических форм эритроцитов в периферической крови. Плазмаферез приводит к увеличению доли патологических форм эритроцитов на компонентах плазмафильтра и в периферической крови. Лазерное воздействие способствует редукции числа патологических форм эритроцитов в периферической крови и на компонентах плазмафильтра. **Заключение.** Лазерное облучение плазмафильтров во время плазмафереза при миастении нормализует соотношение дискоцитов и патологических форм эритроцитов.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, миастения, плазмаферез, эритроциты.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF “ROSA” FILTER ELEMENTS FROM HEMOFENIX APPARATUS, AND OF BLOOD IN MEMBRANE PLASMAPHERESIS AND LASER IRRADIATION

Baybekov I.M., Butaev A.K., Saidkhanov B.A.

Pathologic Anatomy department (Head – professor I.M. Baybekov) Republican Specialized Center of Surgery named after Academician V. Vakhidova (Head – F.G. Nazarov), Tashkent, Uzbekistan

Aim. To study with scanning electron microscopy an interaction between structural elements of “Rosa” filters (a component of HEMOFENIX) with erythrocytes during membrane plasmapheresis and under the effect of laser irradiation performed during plasmapheresis. **Materials and methods.** Using scanning electron microscopy and morphometry, blood cells and plasma-filter components were studied in patients with myasthenia gravis. **Results.** It has been revealed that the percentage of pathologic forms of erythrocytes increased in peripheral blood of patients with myasthenia gravis. Plasmapheresis leads to an increase in the number of pathologic forms of erythrocytes in peripheral blood as well as on plasma-filter components. **Conclusion.** Laser irradiation, in turn, promotes the significant reduction of pathological forms of erythrocytes number in peripheral blood and on plasma-filter components.

Key words: scanning electron microscopy, myasthenia, plasmapheresis, erythrocytes.

Миастения (*Myasthenia gravis*) – тяжелое заболевание, для которого характерным является прогрессирующая мышечная слабость, быстрая патологическая мышечная утомляемость, а также ряд других симптомов.

Заболевание не является казуистической патологией. Миастения наблюдается у одного человека на 1500–2000 жителей [1–3].

Возникновение миастении является результатом поражения вилочковой железы и связанных с этим

аутоиммунных расстройств [2–4]. Клинические и физиологические проявления миастении обусловлены уменьшением количества ацетилхолиновых рецепторов в нервно-мышечных синапсах вследствие аутоиммунной атаки, что приводит к их недостаточности.

Наиболее эффективным лечебным мероприятием при развитии миастенических и холинергических кризов является проведение обменного плазмафереза [5–8].

Проводимые исследования показывают, что, несмотря на значительный прогресс в совершенствовании устройств для детоксикации и их высокую эффективность, использование этих методов приводит к существенной травматизации клеток крови, особенно эритроцитов [1, 3, 9, 10].

Применение для коррекции формы эритроцитов внутрисосудистого лазерного облучения крови (ВЛОК), одного из наиболее эффективных методов воздействия на мембрану эритроцитов, приводило к восстановлению соотношения дискоцитов – нормальных эритроцитов и их патологических форм [11–13].

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является наиболее объективным методом изучения трехмерной структуры биологических объектов. Однако исследования взаимодействия структурных компонентов приспособлений для плазмафереза с клетками крови и влияния на них лазерного облучения контуров не проводилось.

Указанное определило **цель** настоящего исследования: изучить с помощью СЭМ взаимодействие структурных элементов фильтра «Роса» аппарата НЕМОФЕНИХ при мембранном плазмаферезе с эритроцитами и влияние на них лазерного облучения во время процедуры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью СЭМ изучены структурные компоненты 34 фильтров РОСА после проведения сеанса плазмафереза длительностью не более 60 мин пациентам с различными формами миастении. В 14 случаях плазмаферез сочетали с облучением крови лазерным излучением на протяжении всего сеанса плазмафереза с помощью контактирующей с входящим контуром излучающей лазерной головки с длиной волны 0,63 мкм (красный), выходная мощность 1,5 мВт, аппарат «Матрикс-ВЛОК».

Для СЭМ фрагменты мембран и сетки плазмодифильтров после их демонтажа фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН-7,4). После дегидратации в растворах спирта – ацетона возрастающей концентрации высушивали способом перехода через критическую точку закиси азота в аппарате «НСР-2» (Hitachi).

Образцы монтировали на алюминиевые подложки электропроводящим клеем. После ионного напыления золотом в аппарате «IB-3» (Eiko, Japan), клетки просматривали и фотографировали в СЭМ «Hitachi S-40SA» с помощью цифровой фотокамеры Canon.

Наряду с электронномикроскопическими исследованиями мембран и сеток плазмодифильтров изучалась периферическая кровь пациентов, полученная из пальца до и после плазмафереза, которая подвергалась аналогичной обработке и исследованию.

Подсчет различных форм эритроцитов проводили на электроннограммах при увеличении 400. Использовали не менее 1000 эритроцитов на каждый исследованный случай. Статистическую обработку данных проводили на компьютере Pentium-IV с помощью программы BS-Statistica, а также прикладных программ «Exel-Office Microsoft-Windows-2008».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенный подсчет соотношения различных форм эритроцитов у пациентов с миастенией показал, что у них существенно снижена доля дискоцитов в периферической крови. Они составляют $62,0 \pm 1,0\%$ (контроль – $89,0 \pm 0,5\%$), эхиноциты при этом составили $17,0 \pm 0,5\%$ (контроль – $9,0 \pm 0,3\%$), а стоматоциты – 16% (контроль – $1,0 \pm 0,05\%$), эритроциты с гребнем – $3 \pm 0,03\%$ (контроль $0,5 \pm 0,02\%$). Необратимые формы составили $2,0 \pm 0,01\%$ (контроль $0,5 \pm 0,05\%$).

СЭМ мембран фильтра показал, что после плазмафереза на мембранах отмечается скопление эритроцитов, среди которых доминируют патологические формы, преимущественно эхиноциты. Сама мембрана представляет собой довольно ровную гомогенную поверхность с многочисленными порами диаметром 0,6–1 мкм (рис. 1, 2).

Патологические формы эритроцитов, как в периферической крови, так и на поверхности мембран плазмодифильтра, после плазмафереза доминируют у всех пациентов с миастенией.

В плазмодифильтре помимо мембраны имеется два вида сеток. Сетка воздушного фильтра представляет собой прямоугольные переплетения нитей, а сетка

Байбеков Искандер Мухамедович – д. м. н., проф., руководитель лаборатории патологической анатомии, РСЦХ им. акад. В. Вахидова, Ташкент, Узбекистан. *Бутаев Азамат Хасанджанович* – м. н. с. той же лаборатории. *Саидханов Боис Акаидович* – к. м. н., руководитель отдела экспериментальной хирургии того же центра.

Для корреспонденции: Бутаев Азамат Хасанджанович. Адрес: 100077, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Б.И.Й., 1-41. Тел. 998 90 960 40 31. E-mail: azazello78@mail.ru

Baybekov Iskander Mukhamedovich – doc. of med. sci., prof., Head of Pathologic Anatomy department, RSCS named after akad. Vakhidov V., Tashkent, Uzbekistan. *Butaev Azamat Khasandjanovich* – junior research fellow at the same department. *Saidkhanov Bois Akaidovich* – cand. med. sci., Head of Experimental Surgery department at the same center.

For correspondence: Butaev Azamat Khasandjanovich. Address: Buyuk ipak yuli Str. 1-41, Tashkent 100077, Uzbekistan. Phone 998 90 960 40 31. E-mail: azazello78@mail.ru

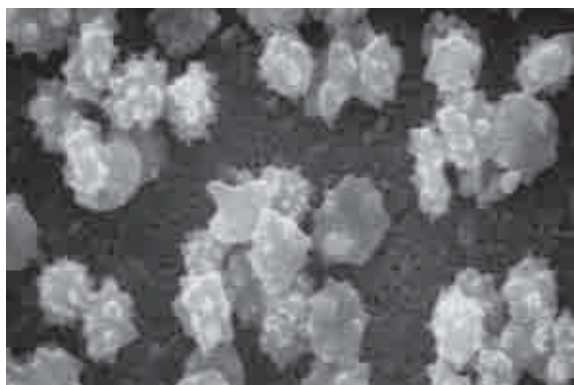


Рис. 1. Доминирование патологических форм эритроцитов на поверхности мембраны фильтра после плазмафереза. СЭМ, $\times 2000$

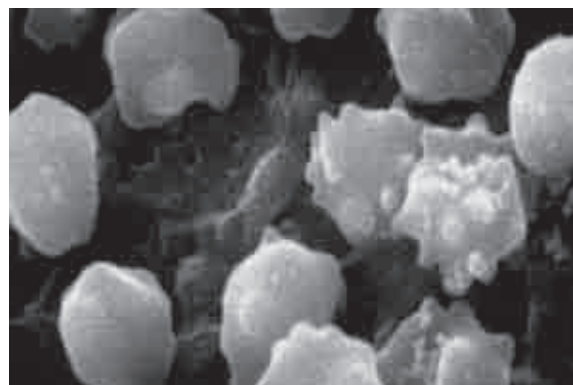


Рис. 2. Патологические формы эритроцитов (эхиноциты) на поверхности мембраны фильтра после плазмафереза. СЭМ, $\times 4000$

собственно плазмофильтра сформирована сложно переплетающимися между собой нитями, формирующими многоугольные ячейки. При проведении плазмафереза у всех групп пациентов на нитях сеток обнаруживаются лишь единичные эритроциты. Это чаще всего эхиноциты. Определяются также мелкие дискретные частицы (рис. 3–6), которые не встречаются на поверхности мембран плазмофильтров.

Облучение плазмофильтров ГНЛ в процессе проведения плазмафереза приводит к существенному снижению на поверхности мембран плазмофильтров всех форм эритроцитов. При этом среди эритроцитов доминируют дискоциты.

Нередко среди эритроцитов располагаются скопления некрупных, вытянутых образований, представляющих собой тромбоциты (рис. 7).

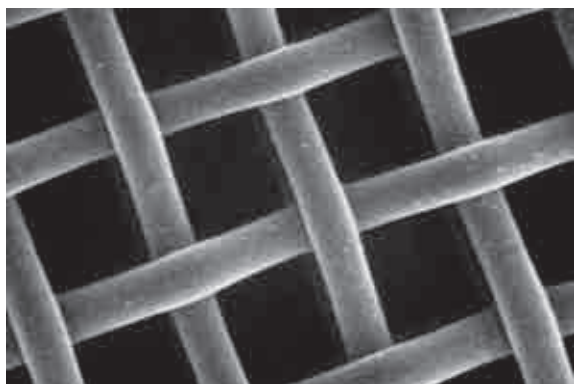


Рис. 3. Сетка плазмофильтра после плазмафереза. СЭМ, $\times 100$

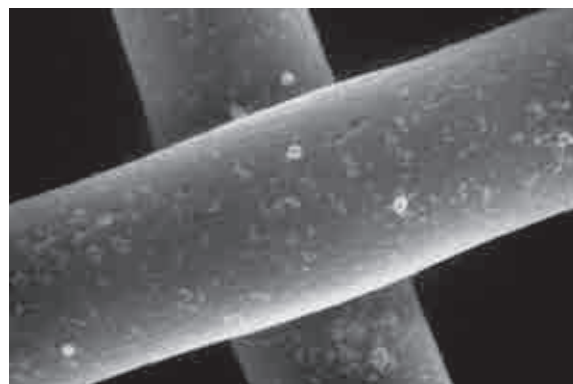


Рис. 4. Фрагмент сетки плазмофильтра после плазмафереза. СЭМ, $\times 400$



Рис. 5. Сетка воздушной ловушки после плазмафереза. СЭМ, $\times 100$

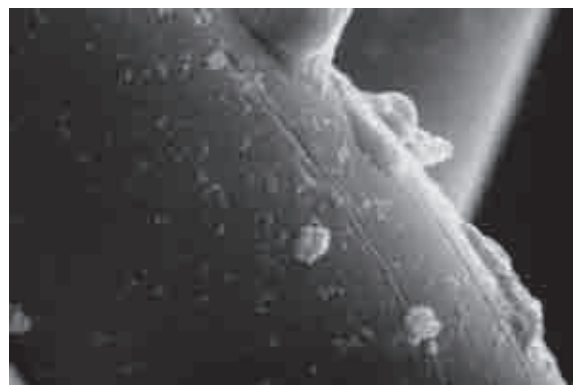


Рис. 6. Фрагмент сетки воздушной ловушки после плазмафереза. СЭМ, $\times 1000$

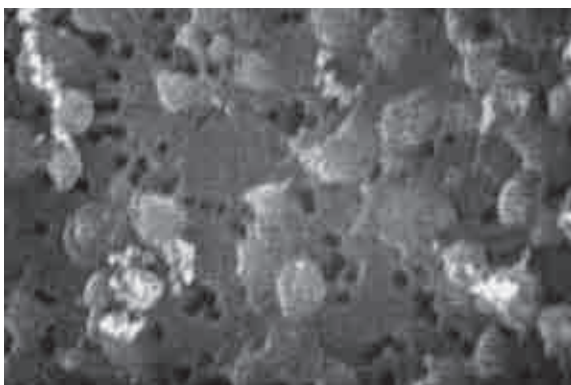


Рис. 7. Доминирование дискоцитов среди немногочисленных эритроцитов и тромбоцитов на поверхности мембраны плазмофилтра. Плазмаферез с лазерным облучением. СЭМ, $\times 1000$

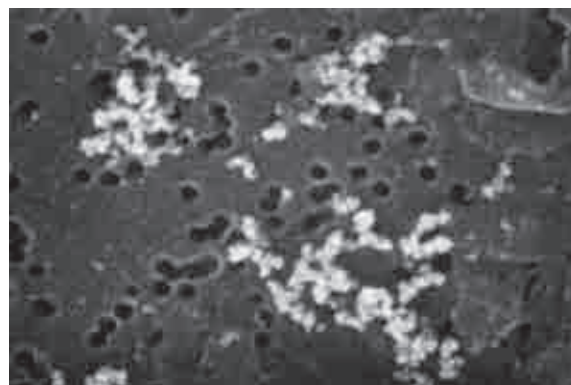


Рис. 8. Тромбоциты на поверхности мембраны плазмофилтра. Плазмаферез с лазерным облучением. СЭМ, $\times 4000$

Последние благодаря их форме и размерам отчетливо различимы на поверхности мембран плазмофилтров при больших увеличениях (рис. 8).

На поверхности сеток плазмофилтров, подвергнутых лазерному облучению во время плазмафереза, также реже выявляются эритроциты и другие дискретные структуры.

Проведенный подсчет соотношения дискоцитов и патологических форм эритроцитов на поверхности мембран плазмофилтров показывает, что у пациентов с миастенией доля эхиноцитов составляет $52 \pm 1,5\%$, стоматоцитов – $14 \pm 1\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эритроциты, как самые дифференцированные клетки организма человека и млекопитающих животных, лишенные всех органелл и ядра, являются наиболее чувствительными клетками к изменению различных параметров крови и другим воздействиям [11, 13, 14]. Морфологически это проявляется, в первую очередь, изменениями формы эритроцитов, обусловленными соответствующими структурно-функциональными сдвигами плазматических мембран. В норме эритроцит имеет форму двояковогнутого диска – дискоцита. Однако и в норме встречаются некоторые патологические формы эритроцитов, не являющиеся патогномичными для какой-либо патологии крови. Это стоматоциты: эритроциты с углублениями – эхиноциты, эритроциты с выростами, эритроциты с гребнем и другие. Определенную долю составляют так называемые необратимые патологические формы эритроцитов [11, 13, 14].

Все методы современной медицины, связанные с использованием различных аппаратов, с которыми контактирует кровь, неизбежно связаны с механическими и другими воздействиями на ее клетки.

В первую очередь – с воздействиями на самые многочисленные клетки, составляющие ее основу – эритроциты [1, 8–11, 13, 14].

Лазерные воздействия на кровь, как вне организма, так и при внутрисосудистом лазерном облучении крови, способствуют редукции патологических форм эритроцитов и возрастанию доли дискоцитов [1, 9–12, 15, 16].

Проведенные нами исследования показали возрастание патологических форм эритроцитов в периферической крови при миастении. В комплексе лечебных мероприятий последней для элиминации антител, блокирующих ацетилхолиновые рецепторы и затрудняющие передачу нервных импульсов к мышцам, что является важнейшей патогенетической составляющей при этой патологии, широко используется плазмаферез.

СЭМ-исследования показали существенное возрастание числа эритроцитов, особенно их патологических форм, на мембранах плазмофилтров. Лазерное облучение контуров плазмофилтров приводит к уменьшению количества эритроцитов на их поверхности и к редукции доли патологических форм эритроцитов.

ВЫВОДЫ

1. При миастении в периферической крови возрастает доля патологических форм эритроцитов.
2. Плазмаферез способствует увеличению доли патологических форм эритроцитов, как в периферической крови, так и на компонентах плазмофилтров.
3. Облучение лазером с длиной волны 0,63 мкм элементов плазмофилтров во время плазмафереза значительно уменьшает число эритроцитов на их поверхности, особенно их патологических форм.
4. Лазерное облучение плазмофилтров во время плазмафереза является эффективным мероприятием.

ятием, редуцирующим долю патологических форм эритроцитов и способствующим нормализации соотношения дискоцитов и патологических форм эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутаев А.Х. Изменение формы эритроцитов при миастении и возможности лазерного облучения крови в ее коррекции // Лазерная медицина. 2011; 15 (4): 22–25.
Butaev A.Kh. Alterations of erythrocytes' shape in myasthenia and possibilities of laser irradiation of blood in their correction // *Laser medicine*. 2011; 15 (4): 22–25.
2. Гехт Б.М., Санадзе А.Г., Касаткина Л.Ф., Сиднев Д.В., Щербак Н.И. Диагностика и лечение миастении // Информационное письмо МЗ РФ. М., 2003: 24.
Geht B.M., Sanadze A.G., Kasatkina L.F., Sidnev D.V., Shherbakova N.I. Diagnosis and treatment of myasthenia gravis // *Information Letter Mh RF*. M., 2003: 24.
3. Исмаилов Д.А., Бутаев А.Х., Байбеков И.М. Форма эритроцитов периферической крови, до и после хирургического лечения миастении // Пластическая и реконструктивная хирургия. Украина, 2007; 2 (VIII): 142–144.
Ismailov D.A., Butaev A.Kh., Baybekov I.M. Form of red blood cells of peripheral blood before and after surgical treatment of myasthenia gravis // *Plastic and Reconstructive Surgery*. Ukraine, 2007; 2 (VIII): 142–144.
4. Cole R.N., Reddel S.W., Gervasio O.L., Phillips W.D. Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction // *Ann. Neurol.* 2008; 63 (6): 782–789.
5. Gajdos P., Chevret S., Toyka K. Plasma exchange for generalized myasthenia gravis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011, Issue 4.
6. Jensen P., Bril V. A comparison of the effectiveness of intravenous immunoglobulin and plasma exchange as preoperative therapy of myasthenia gravis // *Clinical Neuromuscular Disease*. 2008; 9 (3): 352–355.
7. Perez-Nellar J., Dominguez A.M., Llorens-Figueroa J.A., Ferra-Betancourt A., Pardo A., Quiala M. Z Gali. A comparative study of intravenous immunoglobulin and Plasmapheresis preoperatively in myasthenia [Estudio comparativo entre inmunoglobulina intravenosa y plasmaferesis en el perioperatorio de la myasthenia gravis]. *Revista de Neurologia*. 2001; 33 (5): 413–416.
8. Yeh J.H., Chen W.H., Huang K.M., Chiu H.C. Prethymectomy plasmapheresis in myasthenia gravis // *Clinical Apheresis*. 2005; 20 (4): 217–221.
9. Байбеков И.М., Бутаев А.Х. Влияние экстракорпоральной детоксикации и лазерного облучения крови на форму эритроцитов и микроциркуляцию // VIII международная конференция «Актуальные аспекты экстракорпорального очищения крови в интенсивной терапии». М., 31 мая–1 июня 2012: 60.
Baybekov I.M., Butaev A.Kh. Effect of extracorporeal detoxication and of laser irradiation of blood on the form of red blood cells and on microcirculation // *VIII International Conference "Urgent aspects of extracorporeal blood detoxication in intensive therapy"*. M., May 31–June 1 2012: 60.
10. Бутаев А.Х., Стрижков Н.А., Саидханов Б.А., Байбеков И.М. Изменение формы эритроцитов при искусственном кровообращении и экстракорпоральной детоксикации и их коррекция с помощью лазерного воздействия // VIII международная конференция «Актуальные аспекты экстракорпорального очищения крови в интенсивной терапии». М., 31 мая–1 июня 2012: 31.
Butaev A.Kh., Strijkov N.A., Saidkhanov B.A., Baybekov I.M. Alterations of the forms of red blood cells during extracorporeal circulation and in extracorporeal detoxication and their correction with laser influence // *VIII International Conference "Urgent aspects of extracorporeal blood detoxication in intensive therapy"*. M., 31 may–1 june 2012: 60.
11. Байбеков И.М., Мавлян-Ходжаев Р.Ш., Эрстекис А.Г., Москвин С.В. Эритроциты в норме, патологии и при лазерных воздействиях. Тверь: Триада, 2008: 255.
Baybekov I.M., Mavlyan-Khodjaev R.Sh., Erstekis A.G., Moskvina S.V. Erythrocytes in norm, pathology and under laser influence. Tver: Triada, 2008: 255.
12. Гейниц А.В., Москвин С.В., Азизов Г.А. Внутривенное лазерное облучение крови. М.–Тверь: Триада, 2006: 144.
Gejnic A.V., Moskvina S.V., Azizov G.A. Intravascular laser irradiation of blood. M.–Tver: Triada, 2006: 144.
13. Новодержкина Ю.К., Шишканова З.Г., Козинец Г.И. Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии. М.: Триада-фарм, 2004: 152.
Novoderzhkina Ju.K., Shishkanova Z.G., Kozinec G.I. Configuration and the surface of blood cells in health and disease. M.: Triada-farm, 2004: 152.
14. Hoffman R., Benz E.J., Shattik S.J., Furie B., Cohen H.J., Silberstein L.E. (Eds). *Hematology Basic Principles and Practice*. N.Y., Churchill Livingstone. 2001: 1970.
15. Simunovic Z. (Ed-r) *Lasers in medicine science and praxis in medicine, surgery dentistry and veterinary Trilogy updates with emphasis on LILT-photobiostimulation-photodynamic therapy and laser acupuncture*. Locarno. 2009: 772.
16. Tuner J., Hode L. *The New Laser Therapy Handbook*. Stockholm: Prima Books, 2010: 847.