© Коллектив авторов, 2019
УДК 616.001.4-002-06:616.14-008.64:616.155.1-076.5
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14040>
ISSN 2073-8137

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИМИ РАНАМИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Г. Э. Карапетян, Л. В. Кочетова, Р. А. Пахомова

Красноярский государственный медицинский университет
им. В. Ф. Войно-Ясенецкого, Россия

ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH LONGERLY NON-HEALING WOUNDS AT THE BACKGROUND OF CHRONIC VENOUS FAILURE

Karapetyan G. E., Kochetova L. V., Pakhomova R. A.

V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Russia

Длительно незаживающие раны нижних конечностей на фоне хронической венозной недостаточности – медицинская и социально-экономическая проблема. Наиболее радикальным методом лечения патологии, снижающим давление на стенки вен, является хирургическое вмешательство. К эффективным способам консервативной терапии, направленным на активацию репаративных процессов и восстановление поврежденных тканей, следует отнести метод локальной и системной озонотерапии. В исследование включено 48 больных, которым проведен курс комплексной озонотерапии, включающей местное воздействие на рану и внутривенное введение озонированной аутокрови. На фоне комплексной озонотерапии структура плазматических мембран улучшалась, эритроцит восстанавливал форму, адгезивные силы приобретали тенденцию к нормализации. Озонирование крови повышало гибкость плазматических мембран, восстанавливало форму эритроцитов.

Ключевые слова: хроническая венозная недостаточность, атомно-силовая микроскопия эритроцита, озонированная аутокровь

Long-term unhealed wounds of the lower extremities against the background of chronic venous insufficiency is a medical and socio-economic problem. The most radical method of pathology treating, which reduces the pressure on the walls of the veins, is surgery. The effective methods of conservative therapy aimed at the activation of reparative processes and the restoration of damaged tissues should include the method of local and systemic ozone therapy. The study included 48 patients who underwent a course of complex ozone therapy, including local effects on the wound and intravenous administration of ozonized autologous blood. At the background of complex ozone therapy, the structure of plasma membranes improved, the erythrocyte regained its shape, and the adhesive forces tended to normalize. Blood ozonization increased the flexibility of plasma membranes, restored the form of red blood cells.

Keywords: chronic venous insufficiency, atomic force microscopy of the erythrocyte ozonized autoblood

Для цитирования: Карапетян Г. Э., Кочетова Л. В., Пахомова Р. А. АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИМИ РАНАМИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019; 14(1.1):22-25. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14040>

For citation: Karapetyan G. E., Kochetova L. V., Pakhomova R. A. ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH LONGERLY NON-HEALING WOUNDS AT THE BACKGROUND OF CHRONIC VENOUS FAILURE. *Medical News of North Caucasus*. 2019; 14(1.1):22-25. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14040> (In Russ.)

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ХВН – хроническая венозная недостаточность

Длительно незаживающие раны нижних конечностей на фоне хронической венозной недостаточности (ХВН) – это не только медицинская, но и значимая социально-экономическая проблема. В 12,5 % случаев такие раны становятся причиной прекращения профессиональной трудовой деятельности, при этом лечение требует значительных материальных затрат,

терпения и высокого профессионализма врачей-хирургов [1–3].

Наиболее радикальным методом лечения этой патологии, снижающим давление на стенки вен, является хирургический [2, 3, 4]. С развитием высокотехнологичной сосудистой хирургии разработаны и внедрены в клинику разнообразные варианты оперативного лечения хронической венозной недостаточности.

сти [4, 5]. В то же время имеется достаточно большой контингент больных, которым оперативное лечение не показано, поэтому имеется необходимость в разработке консервативных методов лечения хронической венозной недостаточности, осложненной поражением мягких тканей нижних конечностей [2, 6, 7]. К эффективным способам консервативной терапии, направленным на активацию репаративных процессов и восстановление поврежденных тканей, следует отнести метод локальной и системной озонотерапии [6, 7].

Озонотерапия оказывает лечебное воздействие на местном и на системном уровнях. При взаимодействии озона с клетками крови повышается лабильность плазматических мембран клеток, улучшается кислород-транспортная функция эритроцитов. Противовоспалительные, антибактериальные, иммуностимулирующие свойства озона позволяют более эффективно проводить комплексное консервативное лечение больных с инфицированными ранами на фоне ХВН [1].

Однако методы контроля эффективности лечения, направленные на индивидуальную оценку доз и способов введения озона и его влияния на организм, практически отсутствуют.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является, как известно, одним из наиболее перспективных методов изучения структурных особенностей макромолекул. В отличие от электронной атомно-силовая микроскопия дает возможность работать с образцом в условиях атмосферы, получать информацию о поверхностном заряде, поверхностной емкости, поверхностной проводимости, магнитных и адгезивных свойствах клеточной мембраны.

Для изучения адгезивных свойств объекта под контролем атомно-силовой микроскопии производят касание объекта острием зонда. При отрыве зонда возникает адгезивное взаимодействие, балка кантилевера изгибается, формируется специальный сигнал – DFL. В дальнейшем происходит отрыв зонда от поверхности. Сигнал DFL с помощью программы «Nova» преобразуется в график [8, 9].

Оценка структурных особенностей клеточной поверхности и физических свойств мембраны у больных с длительно незаживающими инфицированными и гнойными ранами представляет интерес с точки зрения как изучения воздействия ХВН на клетку, так и оценки эффективности применяемых методов лечения [8, 10, 11, 12].

Исключительный интерес представляет изучение упруговязкостных свойств клеточных мембран, поскольку именно они являются наиболее общим, интегральным показателем функционального состояния мембран, мембранных органелл и клеток в целом.

Материал и методы. В исследование включено 48 больных с длительно незаживающими ранами на фоне ХВН, которым проведен курс комплексной озонотерапии, включающей местное воздействие на рану и внутривенное введение озонированной аутокрови, гемоглобин насыщается кислородом в процессе озонирования аутокрови.

Озонирование крови осуществляли в соответствии с рекомендациями, утвержденными Министерством здравоохранения РФ (2001) и декларацией Международной Ассоциации озонотерапевтов (Мадрид, 2010). На 100–200 мл крови использовали от 1 до 4 мг озон-кислородной смеси. Периодичность процедур составляла 48–72 часа.

Аутогемотерапию начинали с дозировки озона 1 мг на 100 мл крови пациента, с постепенным увеличением количества озона до 4 мг, а объема экстракорпоральной крови – до 200 мл. Процесс газации крови осуществляли

в течение 30–60 секунд. Забор венозной крови выполняли при помощи перистальтического насоса «Бозон – БАГТ» со скоростью 10 мл/мин в пластиковый стерильный контейнер фирмы «ООО Синтез Курган» МКЭ 266. Через дополнительный порт в контейнер после забора крови вводили 100 мл озон-кислородной газовой смеси с концентрацией озона 10 мг/л, при этом кровь, антикоагулянт и газ медленно постоянно перемешивали. Через 3–5 минут кровь, перемешиваясь в контейнере, приобретала алый цвет, после чего её возвращали пациенту в реверсном режиме с помощью перистальтического насоса.

Озонированной дистиллированной водой, обладающей выраженным бактерицидным и вируцидным действием, промывали рану в первую фазу раневого процесса, затем выполняли аэрацию раны, которую осуществляли с помощью установки «БОЗОН» НПО «Пульсар» с концентрацией озона 90 мг/л. Рану закрывали стерильной салфеткой «Воскопран». При появлении признаков перехода во вторую фазу и появлении грануляций рану закрывали стерильной салфеткой с озонированным маслом «Отри».

Больные обследовались по общепринятым стандартам. У всех была выполнена атомно-силовая микроскопия эритроцитов после первого, второго, третьего и пятого сеансов комплексной озонотерапии. Исследование выполняли на атомно-силовом микроскопе Integra Aura (ЗАО «НТ-МДТ», Россия). Поверхности образцов сканировали в полуконтактном режиме, а изучение адгезивных свойств – в контактном режиме. Для анализа сканов использовали мазок, приготовленный из венозной крови, взятой утром натощак. Для исключения воздействия соседних клеток и искажения морфологии выбирали только отдельные эритроциты, число которых варьировало от 50 до 60 для каждого образца. Каждый эритроцит сканировали дважды: первый – мембрана клетки, второй раз – клетка целиком.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы Statistica 6.1. Для оценки нормального распределения использовали критерий Шапиро – Уилка (W). В случае нормального распределения использовали среднее и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$), сравнение проводили с применением параметрических методов, предварительно оценивая равенство дисперсии с помощью критерия Левена. При неравенстве дисперсий в случае нормального распределения и при распределении, отличном от нормального, использовали метод Краскела – Уоллиса. Если принималась альтернативная гипотеза о различии групп, далее попарно сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента (в случае равных дисперсий при нормальном распределении) или критерия Манна – Уитни (U-test) (при распределении, отличном от нормального, и в случае неравных дисперсий при нормальном распределении). Для выявления статистически значимых различий в одной группе на разных сроках наблюдения использовали ранговый дисперсионный анализ по Фридмену (Friedman ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Атомно-силовая микроскопия является одним из наиболее современных и информативных методов для проведения исследований на микромолекулярном уровне. Значимость метода многократно возрастает при изучении живых тканей, плазматических мембран.

С целью изучения влияния ХВН, осложненной гнойными ранами, и механизмов воздействия озонотерапии на макроорганизм была проведена атомно-силовая микроскопия эритроцитов условно здоровых людей и больных с инфицированными и гнойными ранами на фоне ХВН до лечения и после комплексной

озонотерапии. Большинство эритроцитов здоровых людей имело двояковогнутую форму в виде дискоцита и только 10 % эритроцитов имели форму эхиноцитов, сфероцитов или стоматоцитов.

Адгезивные силы эритроцита здоровых людей, рассчитанные программой Nova ACM Integra Aura (ЗАО «НТ-МДТ», Россия) составили $1,74 \pm 0,03$ нН (рис. 1).

Рис. 1. Форма эритроцита и графическое изображение адгезивных сил условно здоровых людей

При визуализации эритроцитов больных с гнойными ранами на фоне ХВН привлекало внимание увеличение количества трансформированных форм эритроцитов. Количество дискоцитов у больных с инфицированными ранами было достоверно меньше (62,3 %), а стоматоцитов – достоверно больше –

35,5 % ($p=0,001$), как и эхиноцитов. На фоне изменения формы эритроцита его площадь статистически достоверно не менялась, а объем и адгезивные силы увеличивались, то есть мембрана эритроцита у больных теряла эластичность, становилась ригидной (рис. 2).

Рис. 2. Форма эритроцита и графическое изображение адгезивных сил у больных с ХВН, осложненной инфицированными ранами

Исследования эритроцита на ACM выполняли после первого, третьего и пятого сеансов комплексной озонотерапии, включающей внутривенное введение озонированной аутокрови. К пятому сеансу комплексной озонотерапии количество нормальных форм эритроцитов увеличилось. Количество стоматоцитов стало ниже, чем у больных до лечения, но выше, чем у здоровых людей; количество сфероцитов превысило таковое

у здоровых и у больных до лечения. Адгезивные силы на фоне лечения постепенно снижались и после 5-го сеанса комплексной озонотерапии имели тенденцию к нормализации. На фоне лечения уменьшался и объем эритроцита: по окончании комплексной терапии он статистически значимо не отличался от объема здоровых людей. Ригидность плазматической мембраны уменьшалась и становилась умеренно повышенной (рис. 3).

Рис. 3. Форма эритроцита и графическое изображение адгезивных сил после комплексной озонотерапии у больных с ХВН

Таким образом, у больных ХВН, осложненной длительно незаживающими инфицированными и гнойными ранами, изменяется форма эритроцита, его объем и адгезивные силы, что в свою очередь вызывает изменения в плазматической мембране эритроцита, она становится ригидной.

Заключение. Ранее нами было показано, что у больных с гнойными ранами на фоне ХВН увеличена генерация активных форм кислорода, pH среды сдвинута в кислую сторону, что свидетельствует о наличии оксидантного стресса [2]. По всей видимости, изменения формы и геометрических размеров эритроцитов происходят на фоне активации свободно-радикального окисления. Накопление продуктов перекисного окисления липидов вызывает реорганизацию мембраны эритроцита, увеличивает количество малоподвижных конгломератов и липидных кластеров, ведущих к снижению скорости перемещения белковых молекул, на фоне ригидности мембраны эритроцита и к деформации её поверхности. Увеличение адгезии мембраны эритроцита, по всей видимости, нарушает не только газотранспортную функцию эритроцита, но и микрореологический статус крови, связывание и перенос аминокислот, липидов, вирусов, лекар-

ственных средств.

Постепенное восстановление формы эритроцита и его объема на фоне комплексной озонотерапии улучшает структуру плазматической мембраны за счет мембраностабилизирующего действия озона. Биоархитектоника мембраны начинает перестраиваться, восстанавливается её эластичность.

Следовательно, морфофункциональные структурные изменения эритроцитов купируются на фоне комплексной озонотерапии, восстанавливаются их функциональные свойства.

Выводы

1. У больных с длительно незаживающими инфицированными и гнойными ранами на фоне ХВН увеличивается количество трансформированных форм эритроцитов, их объем и адгезивные силы, мембрана становится ригидной.

2. На фоне комплексной озонотерапии восстанавливается форма эритроцита, его адгезивные свойства, эластичность плазматической мембраны.

3. Исследование микроструктуры эритроцита методом АСМ можно рекомендовать в качестве теста, позволяющего оценить эффективность лечения.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Винник Ю. С., Карапетян Г. Э., Якимов С. В., Сычев А. Г. Использование криогенной стимуляции в лечении хронических ран. *Вестник хирургии им. И. И. Грекова*. 2008;1:27-28. [Vinnik Ju. S., Karapetjan G. E., Jakimov S. V., Sychev A. G. Use of cryogenic stimulation in treatment of chronic wounds. *Vestnik hirurgii im. I. I. Grekova*. – *The messenger of surgery of I. I. Grekov*. 2008;1:27-28. (In Russ.).]
2. Кудыкин М. Н. Комплексное лечение трофических язв. *Флебология*. 2008;3:16-20. [Kudykin M. N. Complex treatment of trophic ulcers. *Phlebologija*. – *Phlebology*. 2008;3:16-20. (In Russ.).]
3. Луцевич О. Э., Тамразова О. Б., Шикунова А. Ю. Современный взгляд на патофизиологию и лечение гнойных ран. *Хирургия*. 2011;5:72-77. [Lucevich O. Je., Tamrazova O. B., Shikunova A. Ju. Modern view on a pathophysiology and treatment of purulent wounds. *Hirurgija*. – *Surgery*. 2011;5:72-77. (In Russ.).]
4. Мионов В. И., Фролов А. П., Гилёва И. И. Учение о ранах, история, развитие, перспективы (часть 1). *Сибирский медицинский журнал*. 2010;4:118-122. [Mirovov V. I., Frolov A. P., Giljova I. I. The doctrine about wounds, history, development, prospects (part 1). *Sibirskij medicinskij zhurnal*. – *Siberian medical magazin*. 2010;4:118-122. (In Russ.).]
5. Оболенский В. Н. Трофические язвы нижних конечностей – обзор проблемы. *Российский медицинский журнал*. 2010;4:28-55. [Obolenskij V. N. Trophic ulcers of the lower extremities – the review of a problem. *Rossiiskij medicinskij zhurnal*. – *Russian medical magazine*. 2010;4:28-55. (In Russ.).]
6. Карапетян Г. Э. Лечение больных с трофическими язвами. *Вестник хирургии*. 2014;173(3):72-76. [Karapetjan G. Je. Treatment of patients with trophic ulcers. *Vestnik hirurgii*. – *The messenger of surgery of I. I. Grekov*. 2014;173(3):72-76. (In Russ.).]
7. Moore K., Ruge F., Harding K.G. T-lymphocytes and the lack of activated macrophages in wound margin biopsies from chronic leg ulcers. *Br. J. Dermatol*. 2013;137(2):188-194.

8. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степовая Е. А., Быстрицкий Л. Д., Ткаченко С. Б. Атлас «Клинический патоморфоз эритроцита». Томск: Изд-во Томского ун-та; М.: Издательский Дом «ГЭОТАР-Мед», 2003. [Novickij V. V. Atlas «Klinicheskij patomorfoz jeritrocita». Tomsk: Izd-vo Tomskogo un-ta; M.: Izdatel'skij Dom «GJeOTAR-MED»; 2003. (In Russ.).]
9. Скоркина М. Ю., Чернявских С. Д., Федорова М. З., Сладкова Е. А., Забияков Н. А. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силовой микроскопии. *Бюл. экп. биол. и мед.* 2010;150(2):273-275. [Skorkina M. Ju., Chernjavskih S. D., Fedorova M. Z., Sladkova E. A., Zabinjakov N. A. Technique of assessment of morphometric parameters of native blood cells with use of atomic and power microscopy. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. – *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2010;150(2):273-275. (In Russ.).]
10. Винник Ю. С., Пахомова Р. А., Кочетова Л. В., Козлов В. В. Хемилюминесцентная активность и цитоархитектоника нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с механической желтухой. *Новости хирургии*. 2018;1:42-50. [Vinnik Ju. S., Pahomova R. A., Kochetova L. V., Kozlov V. V. Hemilyuminestsentny activity and cytovery tectonics of neytrofilny granuloocytes at patients with mechanical jaundice. *Novosti hirurgii*. – *Surgery news*. 2018;1:42-50. (In Russ.).]
11. Пахомова Р. А., Винник Ю. С., Кочетова Л. В., Наронов Ю. С. Морфофункциональное состояние эритроцитов при доброкачественной механической желтухе. *Вестник хирургии им. И. И. Грекова*. 2017;4:22-26. [Pahomova R. A., Vinnik Ju. S., Kochetova L. V., Nagorov Ju. S. Morfofunktsionalny condition of erythrocytes at benign mechanical jaundice. *Vestnik hirurgii im. I. I. Grekov*. 2017;4:22-26. (In Russ.).]
12. Gibson D. J., Schultz G. Chronic wound diagnostic for matrix metalloproteinase. *Wound healing Southern Africa*. 2013;2(2):68-70.

Сведения об авторах:

Карапетян Георгий Эдуардович, доктор медицинских наук, профессор кафедры;
тел.: 89836177000; e-mail: 911@list.ru

Кочетова Людмила Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент;
тел.: 89620677313; e-mail: dissovetkrasgmu@bk.ru

Пахомова Регина Александровна, кандидат медицинских наук, ассистент;
тел.: 89029423912; e-mail: PRA5555@mail.ru