

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПАЦИЕНТКИ С ХРОНИЧЕСКИМ МЕЗАНГИОПРОЛИФЕРАТИВНЫМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Мамаева С.Н.<sup>1</sup>, Кононова И.В.<sup>2</sup>, Мунхалова Я.А.<sup>1</sup>, Максимов Г.В.<sup>3,4</sup>, Захарова Ф.А.<sup>1</sup>, Антонов С.Р.<sup>1</sup>, Николаева Н.А.<sup>1</sup>, Федорова Н.Ф.<sup>1</sup>, Платонова К.Н.<sup>1</sup>, Саввинова Л.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск;

<sup>2</sup>Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск, e-mail: irinakon.07@mail.ru;

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва;

<sup>4</sup>Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

Для диагностики гломерулонефритов часто проводится биопсия почки, которая сопровождается высокотравматическими процедурами. В качестве менее инвазивного метода диагностики гломерулонефритов предлагается, как альтернативный, метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) крови. Для его разработки необходимо установление специфических морфологических характеристик эритроцитов у пациентов с различными клинико-морфологическими формами гломерулонефритов. Целью настоящего инициального исследования было установление специфических морфологических характеристик эритроцитов у пациентки с хроническим мезангиопролиферативным гломерулонефритом (ХМПГН). Были получены СЭМ-изображения ее крови пациентки и для сравнения - пациентки с другой формой патологии почек, хроническим тубулоинтерстициальным нефритом (ХТИН). Использовали сканирующий электронный микроскоп, оснащенный термоэлектронным катодом Шоттки и системой Gentle Beam в режиме низких ускоряющих напряжений (1-2 кВ) с параллельным использованием системы торможения пучка электронов без нанесения проводящих покрытий на образцы крови. Были выявлены различия в линейных размерах эритроцитов и размерах наночастиц (НЧ) эндогенного происхождения на их поверхности. Обнаружено, что у пациентки с ХМПГН по сравнению с пациенткой с ХТИН линейные размеры эритроцитов относительно меньше ( $7,45 \pm 0,13$  микрона vs  $7,54 \pm 0,17$  микрона), а размеры НЧ значительно меньше (30-40 нм vs 80-90 нм). Конечно, нужно продолжить исследования. Тем не менее полученные результаты могут быть полезны для разработки новых методов лабораторной диагностики хронического мезангиопролиферативного гломерулонефрита как альтернативы почечной биопсии.

Ключевые слова: наночастицы, экзосомы, эритроциты, электронная микроскопия, мезангиопролиферативный гломерулонефрит, лабораторная диагностика.

## THE STUDY OF ERYTHROCYTES OF A PATIENT WITH CHRONIC MESANGIAL PROLIFERATIVE GLOMERULONEPHRITIS BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Mamaeva S.N.<sup>1</sup>, Kononova I.V.<sup>2</sup>, Munkhalova Ya.A.<sup>1</sup>, Maksimov G.V.<sup>3,4</sup>, Zakharova F.A.<sup>1</sup>, Antonov S.R.<sup>1</sup>, Nikolaeva N.A.<sup>1</sup>, Fedorova N.F.<sup>1</sup>, Platonova K.N.<sup>1</sup>, Savvinova L.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>North-Eastern Federal University, Yakutsk;

<sup>2</sup>Yakut Science Centre of Complex Medical Problems, Yakutsk, e-mail: irinakon.07@mail.ru.;

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow;

<sup>4</sup>NUST MISIS, Moscow

To diagnose glomerulonephritis, a kidney biopsy is often performed, which is accompanied by highly traumatic procedures. As an alternative less invasive method for the diagnosis of glomerulonephritis the blood's scanning electron microscopy (SEM) is proposed. For its development, it is necessary to establish specific red blood cells (rbc) morphological characteristics in association with several clinical and morphological forms of glomerulonephritis. The aim of this initial study was to establish the rbc's specific morphological characteristics of patient with chronic mesangial proliferative glomerulonephritis (CMPG). SEM rbc images of patient with CMPG and of patient with chronic tubulointerstitial nephritis (CTIN) for comparison were obtained. We used a scanning electron microscope equipped with a Schottky cathode and the Gentle Beam system in the mode of low accelerating voltages (1-2 kV) with the parallel use of an electron beam drag system without blood samples' conductive coating. Differences in the linear sizes of rbc and the sizes of endogenous origin nanoparticles on the rbc surface were revealed. It was found that a patient with HMGF, in comparison with a patient with CTIN, has the rbc linear sizes relatively smaller ( $7.45 \pm 0.13$  microns vs  $7.54 \pm 0.17$  microns), and the size of NPs much smaller (30-40 nm vs 80-90 nm). Of course, further research is needed. Nevertheless, the results obtained can be

## **useful to develop new lab method as an alternative to renal biopsy to diagnose mesangial proliferative glomerulonephritis.**

Keywords: nanoparticles, exosomes, erythrocytes, electron microscopy, mesangial proliferative glomerulonephritis, laboratory diagnostics.

Диагностика гломерулонефритов является актуальной проблемой современной медицины. Основным методом лабораторной диагностики клинико-морфологических форм гломерулонефрита является биопсия почки, которая сопровождается высокотравматическими процедурами. В качестве одного из малоинвазивных лабораторных методов диагностики гломерулонефритов предлагается метод сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии крови пациентов. Ранее нами были опубликованы научные работы, посвященные исследованию крови детей с заболеваниями почек, сопровождающимися гематурией, методами сканирующей электронной (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии [1; 2]. Их результаты позволили сформировать гипотезу о наличии связи между клинической формой гломерулонефрита и как морфологии самих эритроцитов, так и обнаруженных на их поверхности наноразмерных частиц (НЧ) эндогенного происхождения. Для разработки нового метода, основанного на данных СЭМ крови, необходимо установление специфических морфологических характеристик эритроцитов у пациентов с различными клинико-морфологическими формами гломерулонефритов. Специфические различия могут послужить основой для разработки новых лабораторных методов для диагностики гломерулонефритов.

Цель настоящего исследования – изучение морфологических особенностей эритроцитов в крови у пациентки с верифицированным диагнозом хронического мезангиопролиферативного гломерулонефрита методом сканирующей электронной микроскопии в сравнении с данными пациентки с другой формой воспаления почек – хроническим тубулоинтерстициальным нефритом.

### **Материалы и методы исследования**

Материалом исследования служили капиллярная кровь и моча двух пациенток – пациентки Г. с диагнозом хронического мезангиопролиферативного гломерулонефрита и пациентки К. с диагнозом хронического тубулоинтерстициального нефрита. Лабораторные работы выполнялись в Северо-Восточном федеральном университете имени М.К. Аммосова и получили одобрение Локального комитета по биомедицинской этике. Обе пациентки подписали информированное добровольное согласие на использование личных данных и биологического материала в научных целях.

Пациентка Г., 23 года, группа крови Аβ(II), Rh+, основное заболевание: хронический мезангиопролиферативный гломерулонефрит (ХМПГН). В январе 2018 года в условиях

стационара пациентке была выполнена пункционная биопсия левой почки, по результатам световой микроскопии картина соответствовала мезангиопролиферативному гломерулонефриту (14 клубочков, 4 из них склерозированы).

Пациентка К., 24 года, группа крови АВ(II), Rh+, основное заболевание: хронический тубулоинтерстициальный нефрит (ХТИН). Результаты обследования пациентки К. использовались для сравнения, как контрольные.

Для оценки функции почек был проведен общеклинический анализ мочи на автоматическом анализаторе и микроскопия мочевого осадка.

Мазки из капиллярной крови готовили на предметных стеклах, пользуясь шлифованным краем другого предметного стекла, затем высушивали на воздухе при комнатной температуре без их фиксации и окраски. Исследование мазков проводили методом СЭМ.

Метод сканирующей электронной микроскопии для получения изображения эритроцитов капиллярной крови. Исследование проведено с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL JSM-7800F (Япония) с разрешающей способностью 1,2 нм (при 1 кВ) с системой Gentle Beam в режиме низких ускоряющих напряжений (1-2 кВ) с параллельным использованием системы торможения пучка электронов [3]. Изображения изучались при увеличениях от 1000 до 40000 крат при фокусном расстоянии 3,7 мм. Данная методика повышает качество изображения и позволяет не наносить внешние проводящие покрытия на образцы крови [1; 2].

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В ходе исследования были получены СЭМ-изображения эритроцитов, по которым анализировались размеры (диаметры) эритроцитов и их количество, размеры и количество наночастиц (НЧ).

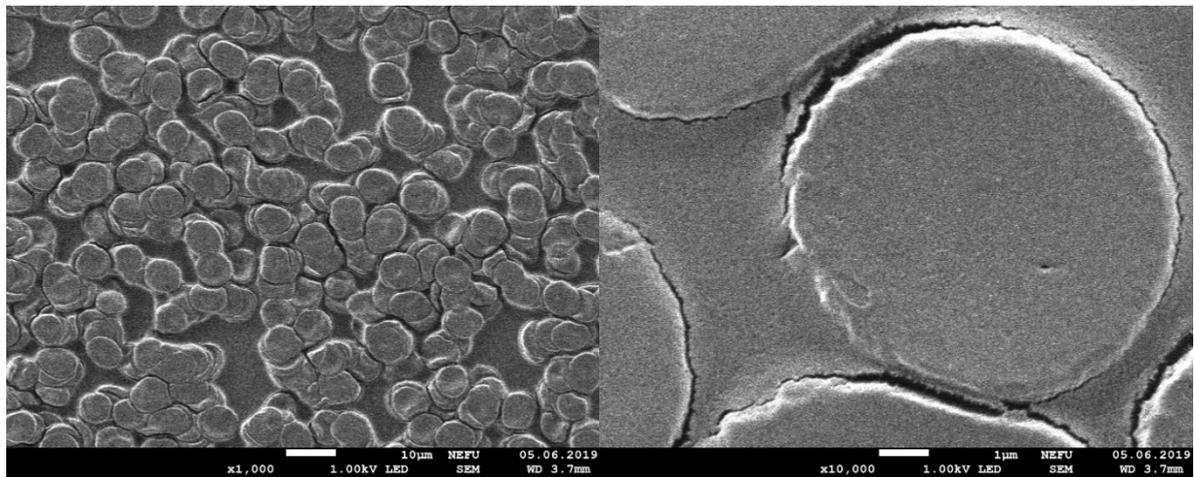
Отметим, что по результатам общеклинического анализа мочи у пациентки Г. (с ХМПГН) наблюдается слабо выраженная протеинурия и гематурия, а у пациентки К. (с ХТИН) - слабо выраженная протеинурия, эпителиурия, трипельфосфаты и более щелочная реакция мочи (табл.).

Общеклинический анализ мочи пациенток с микроскопией мочевого осадка

Свойства и материалы	Пациентка Г.	Пациентка К.
цвет	светло-желтый	светло-желтый
прозрачность	неполная (слабо мутная)	неполная (слабо мутная)
количество	50,0	30,0
плотность	1,020	1,015

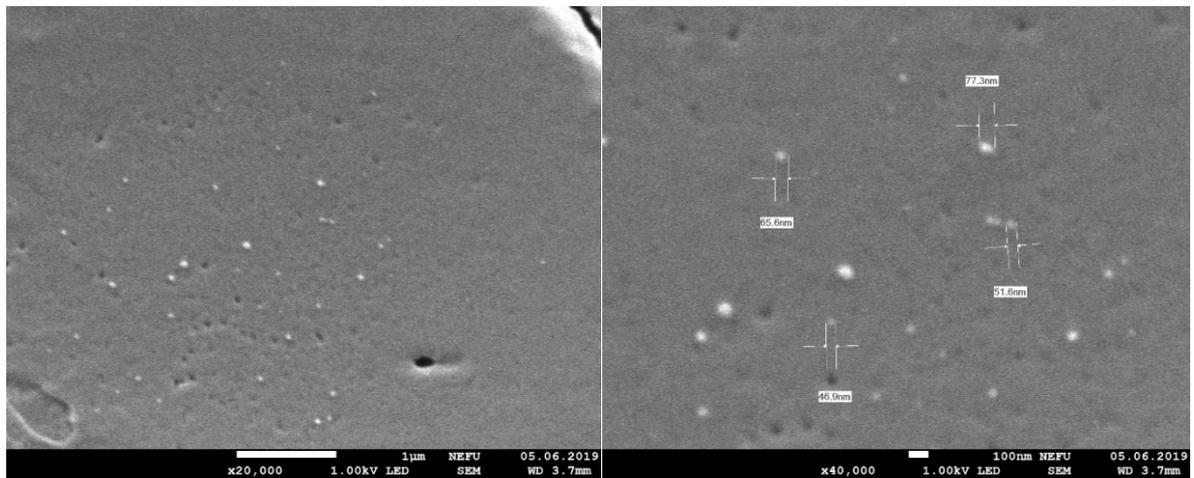
рН	6,0	8,0
белок	0,3 g/l	0,1 g/l
эритроциты	250 RBC/ul	-
лейкоциты	-	-
билирубин	-	-
глюкоза	-	-
уробилиноген	-	-
мочевина	1,6 umol	1,6 umol
кетоновые тела	-	-
нитриты	-	-
Микроскопическое исследование		
Эпителий:		
Плоский в п/зр	4-0-1	скопл.
Переходный	-	-
Почечный	-	-
Лейкоциты в п/зр	2-3-1	2-3-5
Эритроциты:		
Измененные в п/зр	2-3-5	-
Неизмененные в п/зр	25-26-27	-
Цилиндры	-	-
Слизь	-	-
Бактерии	-	-
Соли		трипельфосфаты ++
Грибки	-	-

На рисунке 1 представлены СЭМ-изображения поверхности эритроцитов капиллярной крови пациентки Г. (с ХМПГН). Размеры эритроцитов варьируются от 5 до 10 микрон, средний размер эритроцитов составил примерно  $7,45 \pm 0,13$  микрона. Для подсчета количества эритроцитов в связи с их линейными размерами были сформированы группы с шагом в 0,5 микрона. В соответствии с этим разделением наибольшее количество эритроцитов в поле зрения имело размер 6,5-7,0 микрон (рис. 2а). Для подсчета количества НЧ в связи с их размерами они были разделены на группы с шагом в 10 нм. НЧ, которые были выявлены у пациентки с ХМПГН на поверхности эритроцитов (визуализируются в виде белых включений на рис. 1), по размеру варьировали от 30 до 100 нм, максимальное количество НЧ имело размеры 30-40 нм (рис. 2б).



а)

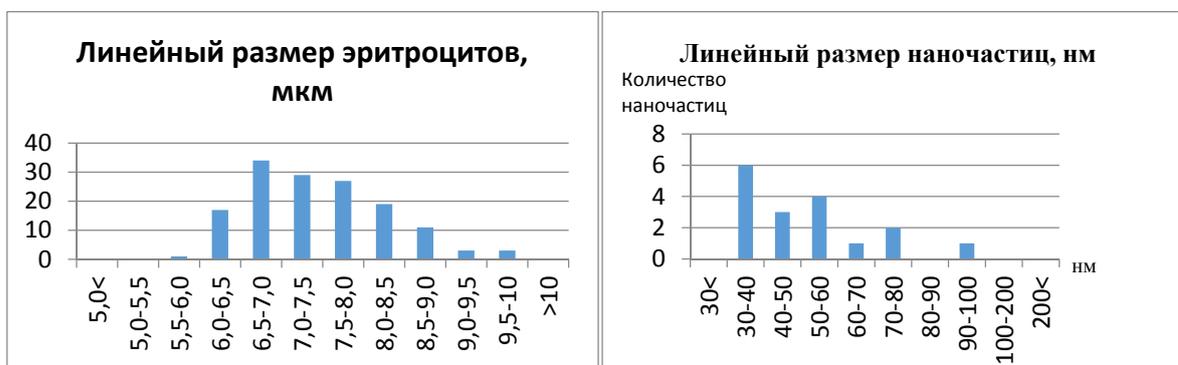
б)



в)

г)

Рис. 1. СЭМ-изображения поверхности эритроцитов пациентки Г. (с ХМПГН) при увеличениях 1000 (а), 10 000 (б), 20 000 (в) и 40 000 (г) крат; НЧ визуализируются в виде включений белого цвета (в, г)



а)

б)

Рис. 2. Пациентка Г. Диаграмма линейных размеров: а) СЭМ-изображений эритроцитов, б) НЧ на поверхности эритроцитов. Вертикальная ось – абсолютное количество в поле зрения, горизонтальная ось – размеры

СЭМ-изображения поверхности эритроцитов пациентки К. (с ХТИН) представлены на рисунке 3. Данные СЭМ-изображений ее крови свидетельствуют о том, что размеры эритроцитов варьируются от <5 до 9,5 микрон (средняя величина около  $7,54 \pm 0,17$  микрона). Максимальное количество эритроцитов характеризуется диаметром 7,0-7,5 микрон (рис. 4а). Отметим, что НЧ на поверхности эритроцитов у пациентки К. имеют размытые, хлопьеобразные формы, а размер НЧ варьируется от 40 до 200 нм (максимальное количество НЧ характеризуется размером в пределах от 80-90 и 100-200 нм) (рис. 4б).

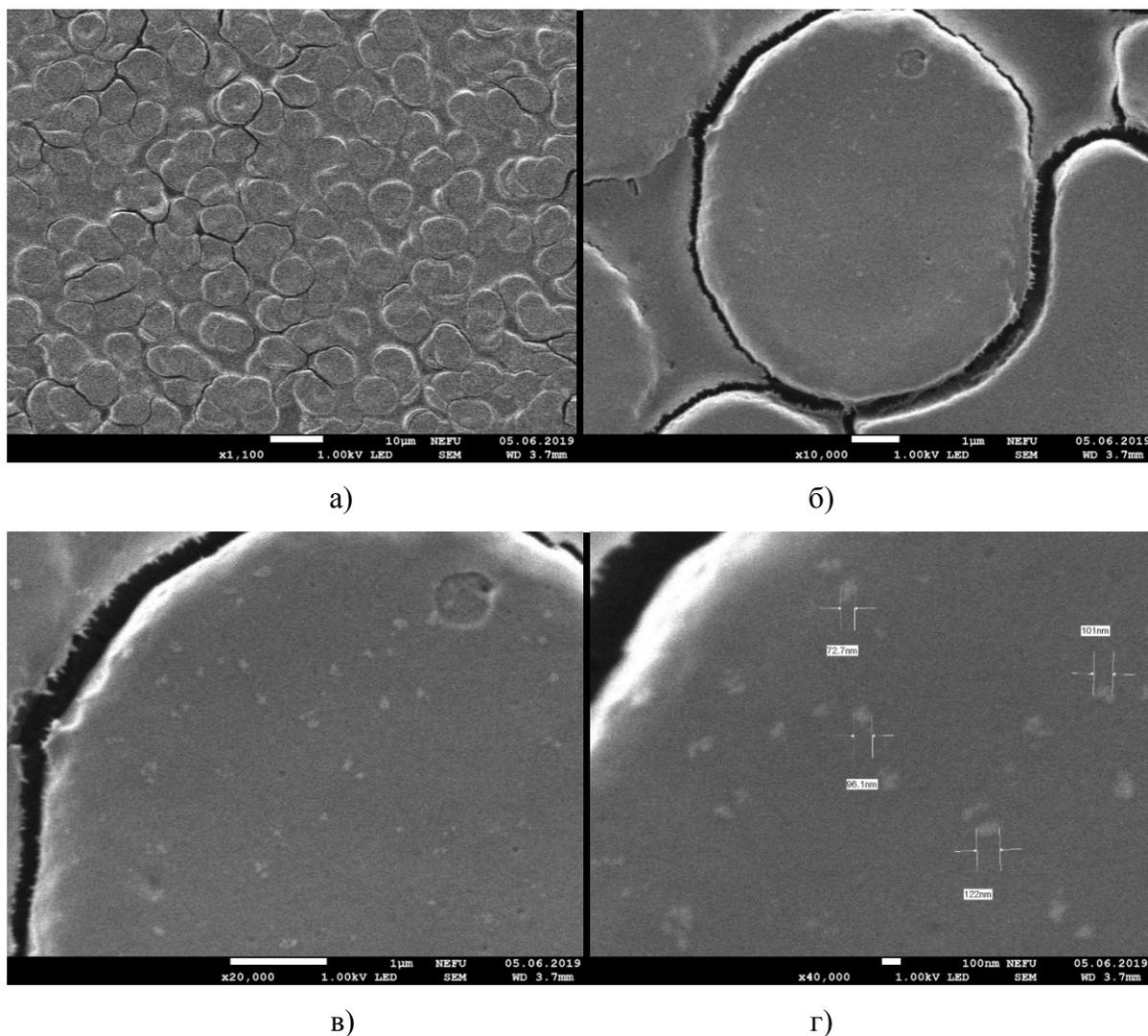


Рис. 3. СЭМ-изображения поверхности эритроцитов пациентки К. при увеличениях 1100 (а), 10 000 (б), 20 000 (в) и 40 000 (г) крат; НЧ визуализируются в виде хлопьевидных светлых включений (в, г)

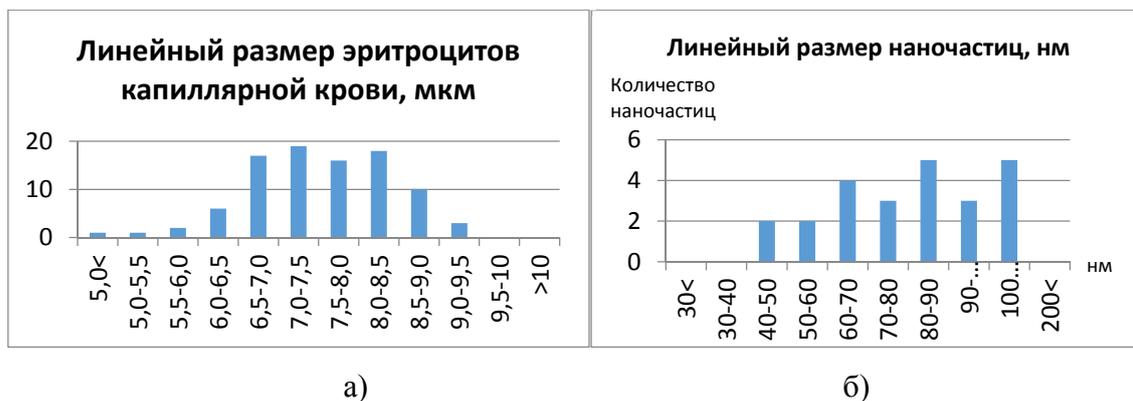


Рис. 4. Пациентка К. Диаграмма линейных размеров: а) СЭМ-изображений эритроцитов, б) НЧ на поверхности эритроцитов (27.05.19 г.). Вертикальная ось – абсолютное количество в поле зрения, горизонтальная ось – размеры

Таким образом, установлено, что у пациентки с ХМПГН средние линейные размеры эритроцитов относительно меньше, при том что нижний и верхний пределы вариабельности размеров больше. Также выявлено, что эндогенные НЧ на поверхности эритроцитов у пациентки с ХМПГН имеют значительно меньшие размеры и более четкие изображения.

Конечно, для установления значимости связи обнаруженных специфических морфологических характеристик эритроцитов, а также НЧ с диагнозом ХМПГН необходимы дополнительные исследования с использованием других методов клинической лабораторной диагностики, как минимум проведение общего клинического анализа крови.

Однако, как нам представляется, именно особенности НЧ, их качественные и количественные характеристики в большей степени, чем морфологические характеристики эритроцитов, связаны с клинико-морфологической формой патологии почек, с ХМПГН.

Анализ размера НЧ, обнаруженных на поверхности эритроцитов, свидетельствует об их соответствии размерам экзосом [4-7]. В связи с этим возможно, что разница в размерах НЧ у двух пациенток обусловлена различиями биогенеза НЧ, которые могут быть ассоциированы с клинико-морфологической формой патологии почек. Известно, что на характеристики экзосом влияет редокс-статус [8], а экспрессия окислительных и антиоксидантных ферментов различна внутри разных типов клеток одного органа. Следовательно, редокс-статус может зависеть от морфологических и патогенетических особенностей локализации патологии в почках - в клубочках, канальцах и интерстиции [9].

### Заключение

СЭМ с катодом Шоттки и системой Gentle Beam в режиме низких ускоряющих напряжений (1-2 кВ) с параллельным использованием системы торможения пучка электронов позволяет получить изображения эритроцитов без нанесения проводящих покрытий на образец. При проведении СЭМ мазков крови выявляются различия в

морфологических характеристиках элементов крови – эритроцитах и НЧ на их поверхности. Выявленные особенности морфологических характеристик эритроцитов капиллярной крови и НЧ на их поверхности, вероятно, могут быть ассоциированы с диагнозом мезангиопролиферативного гломерулонефрита у пациентки. Это может явиться основой для разработки новых лабораторных методов в качестве альтернативы почечной биопсии для установления диагноза мезангиопролиферативного гломерулонефрита. Для подтверждения нашей гипотезы, конечно, нужно продолжение исследований. Данное исследование было инициальным, поэтому было решено опубликовать его результаты.

### Список литературы

1. Maksimov G.V., Mamaeva S.N., Antonov S.R., Munkhalova Ya.A., Kononova I.V., Sheikin I.Yu. Measuring Erythrocyte Morphology by Electron Microscopy to Diagnose Hematuria. *Measurement Techniques*. 2016. vol. 59. no. 3. P. 327-330.
2. Мамаева С.Н., Максимов Г.В., Мунхалова Я.А., Антонов С.Р., Дъяконов А.А., Винокуров П.В. Исследование эритроцитов крови с заболеваниями почек с синдромом гематурии с использованием растровой электронной и атомно-силовой микроскопии // *Медицинская физика*. 2017. №1 (73). С.58-62.
3. Растровая электронная микроскопия для нанотехнологий. Методы и применение / Под ред. У. Жу, Ж.Л. Уанга; пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 582 с.
4. Minciacchi V.R., Freeman M.R., Di Vizio D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015. vol. 40. P. 41–51. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
5. Ludwig A. K., Giebel B. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012. vol. 44. no. 1. P. 11—15. DOI:10.1016/j.biocel.2011.10.005.
6. Pant S., Hilton H., Burczynski M.E. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology*. 2012. vol. 83. no. 11. P. 1484-1494. DOI:10.1016/j.bcp.2011.12.037.
7. Emerging Concepts of Tumor Exosome–Mediated Cell-Cell Communication / Editor: H.-G. Zhang. New York: Springer, 2013. DOI:10.1007/978-1-4614-3697-3.
8. Bodega G., Alique M., Puebla L., Carracedo J., Ramírez R.M. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019. vol. 8. no. 1 e. 1626654. DOI:10.1080/20013078.2019.1626654.

9. Gwinner W., Gröne H-J., Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2000. vol. 15. issue 8. P. 1127–1132. DOI: 10.1093/ndt/15.8.1127.