

<https://doi.org/10.17238/2072-3180-2025-1-49-55>

УДК 616.37-002. 4:616.155.1.-076.5

© Гуликян Г.Н., Пахомова Р.А., Козлов В.В., 2025

Оригинальная статья/Original article



ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ПАНКРЕОНЕКРОЗОМ

Г.Н. ГУЛИКЯН¹, Р.А. ПАХОМОВА², В.В. КОЗЛОВ³

¹ЧУЗ «Клиническая больница "РЖД-Медицина" города Красноярск». 660058, Красноярск, Россия

²ФГБОУ ВО «Росбиотех». 125080, Москва, Россия

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия

Резюме

Введение. Актуальность проблемы панкреонекроза в том, что в настоящее количество заболеваний, в том числе и тяжелыми формами, неуклонно возрастает.

Цель. Улучшить результаты ранней диагностики панкреонекроза путем изучения мембран эритроцитов.

Материалы и методы. Исследование мембраны эритроцитов проводилось при помощи атомно-электронной микроскопии. Дополнительно при помощи данного метода проводилось исследование нейтрофильных эритроцитов. В проведенное исследование включено 17 больных с панкреонекрозом.

Результаты. При проведенном исследовании методом атомно-электронной микроскопии у пациентов с панкреонекрозом выявлены изменения мембраны эритроцитов и формы ядра и состояния цитоплазмы нейтрофильных лейкоцитов.

Выводы. Исследование мембраны эритроцитов и состояния нейтрофильных лейкоцитов методом атомно-электронной микроскопии у пациентов с панкреонекрозом позволяет выявить ранние изменения в отсутствие клинических проявлений и спрогнозировать возможность развития гнойно-септических осложнений.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, панкреонекроз, мембраны эритроцитов, нейтрофилы, плазматическая мембрана

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Гуликян Г.Н., Пахомова Р.А., Кочетова Л.В., Козлов В.В. Диагностическая ценность атомно-силовой микроскопии эритроцитов у больных с панкреонекрозом. *Московский хирургический журнал*, 2025. № 1 С. 49–55. <https://doi.org/10.17238/2072-3180-2025-1-49-55>

Вклад авторов: Г.Н. Гуликян – обработка и систематизация материала, подбор литературы, написание текста статьи. Р.А. Пахомова – обработка и систематизация материала, подбор литературы, редактирование текста статьи. В.В. Козлов – статистическая обработка данных.

DIAGNOSTIC VALUE OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH PANCREATIC NECROSIS

G.N. GULIKYAN¹, R.A. PAKHOMOVA², V.V. KOZLOV³

¹ University "Clinical hospital "Russian Railways-Medicine" of the city of Krasnoyarsk". 660058, Krasnoyarsk, Russia

²FGBOU IN Rosbiotech. 125080, Moscow, Russia

³ Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia annotation

Abstract

Introduction. The relevance of the problem of pancreatic necrosis is that currently the number of diseases, including severe forms, is steadily increasing.

Purpose. To improve the results of early diagnosis of pancreatic necrosis by studying the membranes of red blood cells.

Materials and methods. The erythrocyte membrane was examined using atomic electron microscopy. Additionally, neutrophilic erythrocytes were studied using this method. The study included 17 patients with pancreatic necrosis.

Results. The study conducted by atomic electron microscopy in patients with pancreatic necrosis revealed changes in the membrane of erythrocytes and the shape of the nucleus and the state of the cytoplasm of neutrophilic leukocytes.

Conclusions. The study of the erythrocyte membrane and the state of neutrophilic leukocytes by atomic electron microscopy in patients with pancreatic necrosis makes it possible to identify early changes in the absence of clinical manifestations and predict the possibility of purulent septic complications.

Key words: atomic force microscopy, pancreonecrosis, erythrocyte membranes, neutrophils, plasma membrane

Conflict of interests: The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Gulikyan G.N., Pakhomova R.A., Kochetova L.V., Kozlov V.V. Diagnostic value of atomic force microscopy of erythrocytes of patients with pancreatic necrosis. *Moscow Surgical Journal*, 2025, №1, pp. 49–55. <https://doi.org/10.17238/2072-3180-2025-1-49-55>

Contribution of the authors: G.N. Gulikyan – processing and systematization of the material, selection of literature, writing of the text of the article. R.A. Pakhomova – processing and systematization of the material, selection of literature, editing of the text of the article. V.V. Kozlov – statistical data processing.

Введение

Актуальность проблемы острого панкреатита в том что, несмотря на достаточное количество информации о данном заболевании, частота заболеваемости, в том числе и тяжелыми формами, в настоящее время не только не уменьшается, но, наоборот, возрастает [1]. Это связано не только с количественным ростом заболевания. Среди острых хирургических заболеваний брюшной полости панкреатит занимает пятое место, а по смертности по некоторым источникам занимает лидирующую позицию [3]. Особенность течения острого панкреатита состоит в том, что легкие формы панкреатита могут трансформироваться в более тяжелые, в частности, в панкреонекроз (в 20 % случаев), который в 90 % случаев приводит к летальному исходу, даже при адекватном лечении [4]. Прогнозирование подобного утяжеления на современном этапе в 100 % случаев невозможно.

Развитие тяжелого течения в 40–70% сопровождается формированием гнойно-септических осложнений. И если общая летальность составляет приблизительно 7 %, то при тяжелой форме эта цифра увеличивается до 30 %, а при развитии гнойно-септических осложнений составляет 60–80 % [5].

Ранняя диагностика и прогнозирование возможности развития панкреонекроза позволит снизить частоту гнойно-некротических осложнений, летальность и сократить сроки реабилитационного периода. Это побуждает все медицинское сообщество заниматься поиском новых методов ранней диагностики панкреонекроза [6].

С внедрением в практическую медицину атомно-силовой микроскопии (АСМ) наметились новые аспекты в прогнозировании осложнений острого панкреатита. Атомно-силовая микроскопия, в отличие от обычной электронной микроскопии, позволяет проводить исследования в атмосферных условиях, кроме того можно получить данные о магнитных и адгезивных свойствах клеточной мембраны, поверхностных заряде, емкости и проводимости [7]. Таким образом, по полученным изменениям мембраны эритроцита можно косвенно судить об изменениях других клеточных мембран [8]. Эритроцит является как бы маркером изменений клеток в других тканях. При этом эритроцит – самая доступная для проведения исследований клетка. Применение методики атомно-силовой микроскопии позволяет определить состояние мембраны эритроцита и по изменениям последней

прогнозировать течение и исход заболевания [9]. Эритроцит у больных панкреонекрозом форму не меняет, но плазматическая мембрана становится «дырявой» [10].

Цель. Улучшить результаты ранней диагностики панкреонекроза путем изучения мембран эритроцитов.

Материалы и методы

Исследование мембраны эритроцитов проводилось при помощи атомно-электронной микроскопии. Дополнительно при помощи данного метода проводилось исследование нейтрофильных лейкоцитов.

Методика атомно-электронной микроскопии заключается в получении специального сигнала – DFL, который возникает при отрыве зонда от поверхности эритроцита [7]. При этом возникает адгезивное взаимодействие, которое приводит к изгибанию балки кантилевера и формированию сигнала. С помощью программы «Nova» сигнал DFL преобразуется в график.

В ходе проведения атомно-электронной микроскопии дополнительно проводят исследование упругости и вязкости клеточной мембраны эритроцита, изменения в которой, подобны изменениям в других клетках организма, возникающих при патологических состояниях [7].

В проведенное исследование включено 17 больных с панкреонекрозом.

По гендерному составу: женщин было 8, мужчин – 9. Возраст больных варьировал от 28 до 82 лет (средний возраст – $50,6 \pm 1,9$ года). Пациентов госпитализировали в сроки от 1 до 13 суток от начала заболевания с клиническими признаками ПН. В клинической картине превалировал болевой синдром, а также тошнота, рвота. У всех пациентов присутствовали признаки синдрома системного ответа на воспаление, инфильтрат в брюшной полости и асцит.

Больные были обследованы по общепринятым стандартам. Для подтверждения диагноза исследовали концентрацию С-реактивного белка и уровень прокальцитонина (ПН при уровне >2 нг/мл), уровень амилазы крови и мочи, уровень трансаминаз. Всем больным при поступлении выполнили УЗИ для оценки распространенности и локализации воспалительных, жидкостных перипанкреатических скоплений и парапанкреатических отграниченных полостей. Также всем больным выполнили КТ органов брюшной полости. При комплексной оценке клинических, лабораторных, инструментальных и лу-

чевых методов обследования у всех пациентов подтвержден диагноз панкреонекроза.

Помимо традиционных методов обследования всем пациентам выполнялась атомно-силовая микроскопия эритроцитов. Для проведения исследования использовали мазок периферической крови, полученной при поступлении пациента в стационар. Исследование выполняли на атомно-силовом микроскопе Integra Aura (ЗАО «НТ-МДТ», Россия).

Для исследования поверхности мембраны эритроцита сканирование проводилось в полуконтактном режиме. Адгезивные свойства исследовались полностью в контактном режиме. Для исследования выбирались отдельные эритроциты в количестве 50–60 для каждого образца. Это позволило избежать получения искажения изображения, возникающего от воздействия близкорасположенных соседних эритроцитов. При этом проводилось двойное сканирование каждого эритроцита. При первом сканировании исследовали мембрану эритроцита, при втором – исследовалась клетка в целом.

Помимо исследования эритроцитов проводилась атомно-электронная микроскопия нейтрофильных лейкоцитов с целью оценки их архитектоники.

Полученные данные статистически обрабатывались с помощью программы Statistica 6.1. Оценка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка (W). Если распределение признака не отличалось от нормального, то для описания использовали среднее и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$), сравнение проводили с помощью параметрических методов статистики, предварительно оценивая равенство дисперсии с помощью критерия Левена.

При неравенстве дисперсий в случае нормального распределения и при распределении отличным от нормального использовали метод Краскела-Уоллисса (Kruskal-Wallis). При альтернативной гипотезе о различии групп, далее попарно сравнивали полученные данные с помощью t-критерия Стьюдента (в случае равных дисперсий при нормальном распределении) или критерия Манна-Уитни (U-test). 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

Для изучения влияния интоксикации и системного воспалительного ответа на клеточные мембраны при панкреонекрозе проводилась сравнительная атомно-силовая микроскопия эритроцитов условно здоровых людей и пациентов с подтвержденным диагнозом панкреонекроза.

Форма нормального эритроцита здоровых людей представляла собой двояковогнутый дискоцит. Около 10% эритроцитов представляли собой эхиноциты, сфероциты или стоматоциты.

Средний объем эритроцита здоровых людей составлял $44,970 \text{ мкм}^3$, а рассчитанные программой Nova ACM Integra Aura (ЗАО «НТ-МДТ», Россия) адгезивные силы эритроцита здоровых людей составили $1,74 \pm 0,03 \text{ нН}$ (рис. 1).

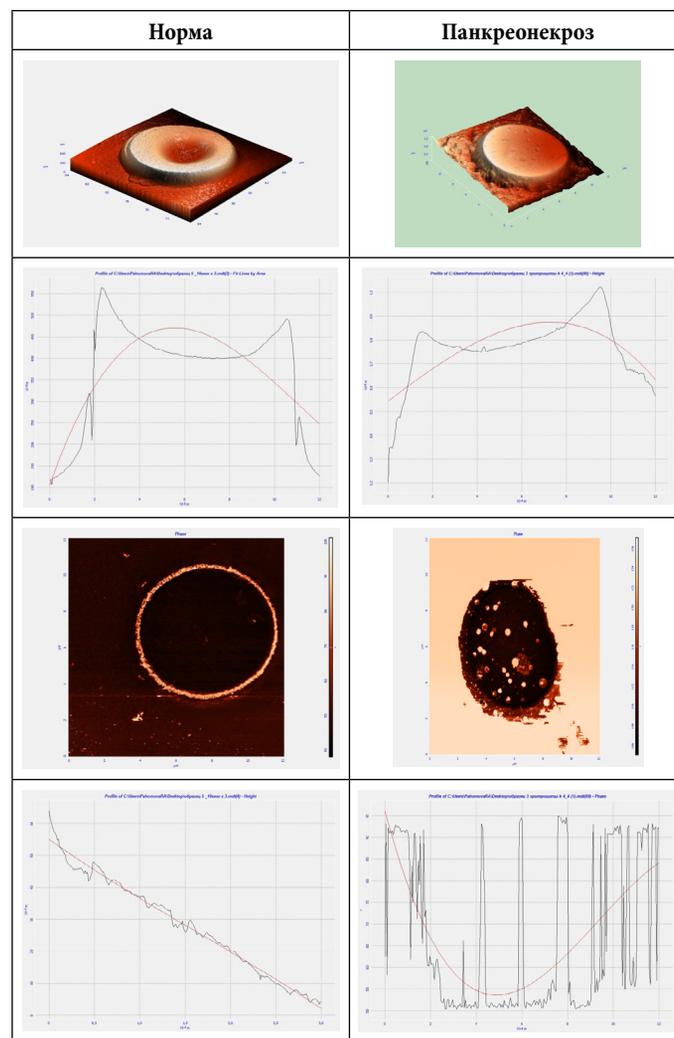


Рис. 1. Форма эритроцита и мембрана эритроцита в норме и при панкреонекрозе

Fig. 1. Erythrocyte shape and erythrocyte membrane in normal and pancreatic necrosis

Также проводилось исследование длины, ширины, высоты максимальной и минимальной и глубины впадины эритроцита (табл. 1).

Изменения длины, ширины и высоты эритроцита при панкреонекрозе были незначительными, в пределах $-0,2 + 3$. Наибольшие изменения отмечались в размерах глубины впадины эритроцита.

Таким образом, у больных с панкреонекрозом не изменяется форма эритроцита и его объем.

Аналогичным образом оценивались площадь, объем, количество эрозий мембран и их качественный анализ (табл. 2)

Таблица 1

Сравнение линейных характеристик эритроцитов у здоровых людей и пациентов с панкреонекрозом

Table 1

Comparison of linear characteristics of erythrocytes in healthy people and patients with pancreatic necrosis

	Длина эр-та, мкм/ Erythrocyte length, microns	Ширина эр-та, мкм/ Erythrocyte width, microns	h, max, нм/ h, max, nm	h, min, нм/ h, min, nm	Глубина впадины, мкм / Depression depth, microns
Здоровые/ Healthy	8,72 ±0,8	8,54 ±0,7	348 ±32,4	162,5 ±15,9	185,5 ±16,2
Панкреонекроз/ Pancreatonecrosis	8,74± 0,8	8,39 ±0,7	346,5 ±31,8	160,9 ±15,7	182,4±15,7

Таблица 2

Сравнение площади, объема и эрозий эритроцитов у здоровых людей и пациентов с панкреонекрозом

Table 2

Comparison of the area, volume, and erosions of red blood cells in healthy people and patients with pancreatic necrosis

	Площадь эр-та, мкм ² /Erythrocyte area, mm ²	Объём эр-та, мкм ³ / Erythrocyte volume, mm ³	Кол-во эрозий/ язв/ Number of erosions/ulcers	Длина эрозий/язв, мкм / Length of ero- sions/ulcers, mm	Ширина эрозий/ язв, мкм / Width of erosions/ulcers, mm
Здоровые /Healthy	44,97±2,4	9,09 ±1,2	0 ±0	0 ±0	0 ±0
Панкреонекроз/ Pancreatonecrosis	48,4 ±3,7	12,7 ±1,4	32±3,1 18±1,7	0,4 ±0,1	0,46 ±0,2

При исследовании площади и объема эритроцитов отмечено их значимое увеличение на 7,8 % и 39 % соответственно.

При визуализации эритроцитов больных с панкреонекрозом было выявлено повреждение мембраны. Адгезивные силы изменялись, что в свою очередь вызывало изменения в плазматической мембране эритроцита и она теряла свою эластичность и становилась ригидной.

Особое значение имеет изменение поверхности мембраны эритроцита, а именно появление на ней эрозий различных по протяженности и по ширине, которые отсутствуют у здоровых людей. При этом, количество эрозий прямо пропорционально тяжести течения панкреонекроза. Учитывая, что данные изменения появляются в раннем периоде развития некротических изменений клеток поджелудочной железы, когда еще нет ультразвуковых признаков панкреонекроза, данные изменения мембраны эритроцитов могут иметь важное диагностическое значение.

Для диагностики панкреонекроза и прогнозирования развития гнойно-септических осложнений проводились исследования цитоархитектоники нейтрофильных гранулоцитов с помощью метода атомно-силовой микроскопии. Нейтрофильные лейкоциты пациентов с панкреонекрозом сравнивались с лейкоцитами здоровых пациентов.

При проведении атомно-силовой микроскопии нейтрофильных лейкоцитов были выявлены сканировании нейтрофилов на АСМ получены отдельно лежащие клетки (рис. 2).

У здоровых людей, входивших в контрольную группу, обнаружено, что нейтрофилы имеют правильную округлую форму, ядро четко визуализируется, правильно сегментировано.

С увеличением степени тяжести острого панкреатита нейтрофил приобретает выпуклую форму, количество сегментов ядра уменьшается, они становятся размытыми, мембрана клетки неровной. На мембране появляется большое количество пор со средними ориентированными значениями диаметров и глубин равными 520 и 340 нм.

Величина площади сегментоядерных нейтрофилов у пациентов с деструктивным панкреонекрозом не изменяется (табл. 3), однако объем его статистически значимо увеличивается при панкреонекрозе, причем, как по сравнению с контрольной группой, так и в зависимости от тяжести протекания процесса.

Исследование нейтрофильных лейкоцитов методом атомно-электронной микроскопии у пациентов с панкреонекрозом позволяет выявить ранние изменения в отсутствие клинических проявлений и спрогнозировать возможность развития

гнойно-септических осложнений. Это позволит своевременно применить адекватную терапию или решить вопрос о необхо-

димости оперативного лечения, что в конечном итоге улучшит результаты лечения.

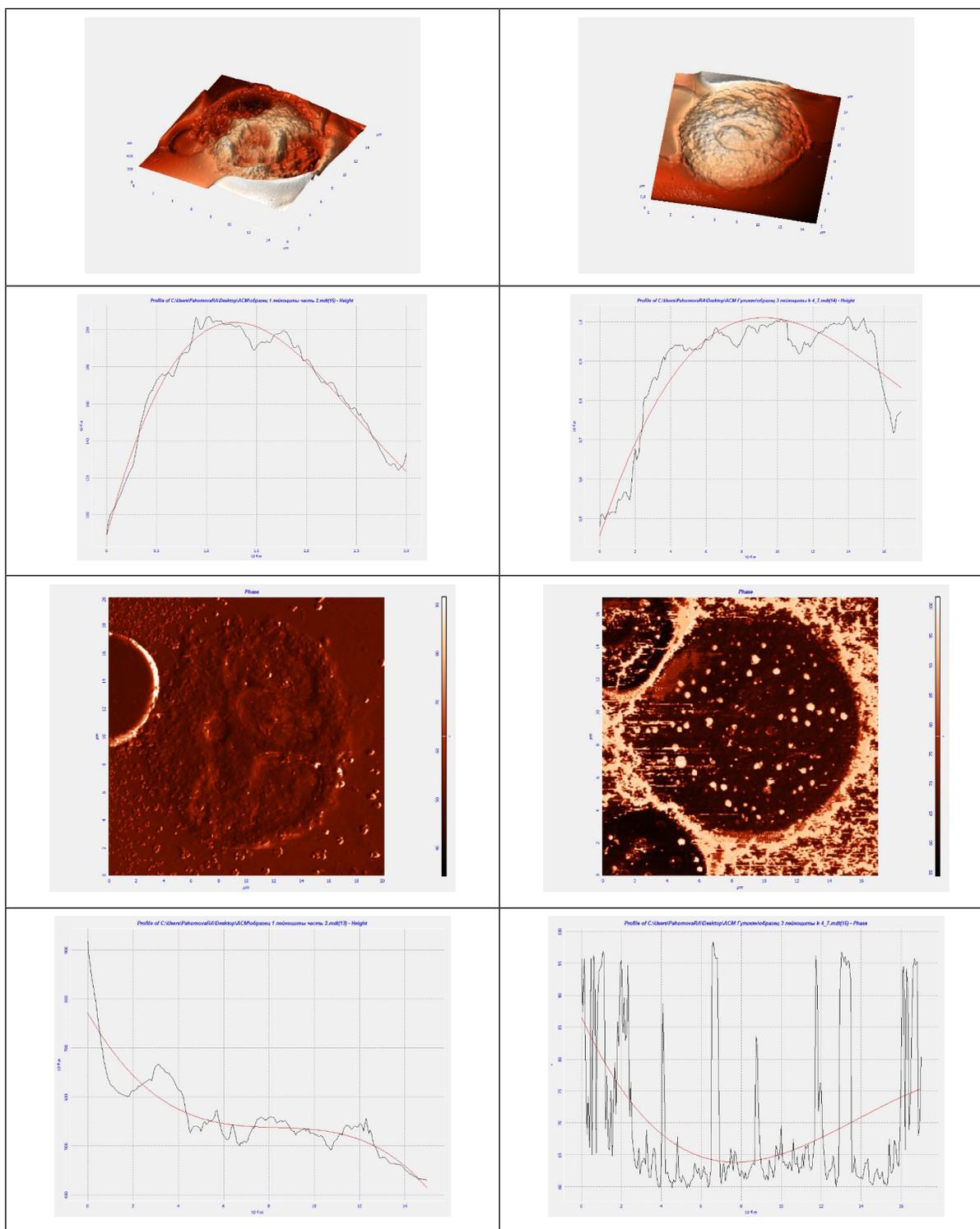


Рис. 2. АСМ сегментоядерных нейтрофилов при панкреонекрозе

Fig. 2. AFM of segmented neutrophils in pancreatic necrosis

Таблица 3

**Средние значения основных измеряемых величин
нейтрофилов больных ДП**

Table 3

**Average values of the main measured values of neutrophils in DP
patients**

Степень тяжести ОП/Severity of OP	S, мкм ² (M±σ)/ S, mm ² (M±σ)	V, мкм ³ (M±σ)/ V, mm ³ (M±σ)	F±ΔF, nH по пробе (M±σ)/ F±ΔF, nN by sample (M±σ)
Норма/ Standard	129,21±9,23	51,00±5,00	1,07±0,02
Панкреонекроз/ Pancreatonecrosis	128,74±5,23	64,56±5,11	0,67±0,01

Примечание: S – площадь нейтрофилов, V – объем нейтрофилов, F_{cp} ± ΔF – сила адгезии

Выводы

У больных с панкреонекрозом плазматическая мембрана клеток крови становится «дырявой». При панкреонекрозе впадины на мембране клетки превращаются в глубокие дефекты, нарушающие целостность билипидного слоя мембраны эритроцита.

Атомно-силовая микроскопия является одним из наиболее современных и информативных методов для проведения исследований на молекулярном уровне. Главное отличие АСМ от рентгеноструктурного анализа заключается в том, что при её проведении нет необходимости в жесткой фиксации и сложной подготовке препаратов для исследования, поэтому значимость метода многократно возрастает при изучении плазматических мембран живых тканей, в том случае, когда необходимо исследовать объект в его исходном состоянии.

Метод атомно-силовой микроскопии клеток крови можно рекомендовать для ранней диагностики панкреонекроза и прогноза развития гнойно-некротических изменений поджелудочной железы.

Список литературы:

1. Галеев Ш.И., Рубцов М.А. *Деструктивный панкреатит*. М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2019. 188 с.
2. *Острый панкреатит*. Под редакцией Э.В. Недашковского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 272 с.
3. Синенченко Г.И. *Гнойно-некротический панкреатит и парапанкреатит*. М.: Элби, 2019. 229 с.
4. Питер А. Бэнкс. *Панкреатит*. М.: Медицина, 2019. 208 с.

5. Ромашенко П.Н., Струков Е.Ю. *Острый панкреатит. Аспекты диагностики и лечения*. М.: ЭЛБИ-СПб, 2020. 671 с.
6. Савельев В. С., Буянов В.М., Огнев Ю.В. *Острый панкреатит*. М.: Медицина, 2020. 240 с.
7. Владимиров В. Г. *Острый панкреатит. Экспериментально-клинические исследования*. М.: Медицина, 2020. 240 с.
8. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Быстрицкий Л.Д., Ткаченко С.Б. *Атлас Клинический патоморфоз эритроцита*. М.: «ГЭОТАР-МЕД», 2003. 208 с.
9. Михайлова О.Д., Былинкина Н.М., Щепина Т.П., Булычев В.Ф. Электрокинетические реакции эритроцитов при хроническом панкреатите. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2009. № 7. С. 55–60.
10. Пахомова Р.А., Винник Ю.С., Кочетова Л.В., Нагорнов Ю.С. Морфофункциональное состояние эритроцитов при доброкачественной механической желтухе. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*, 2017. № 4. С. 22–26.
11. Пахомова Р.А., Гуликян Г.Н. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов больных панкреонекрозом. *Сибирское медицинское обозрение*, 2022. № 2. С. 49–55.

References:

1. Galeev Sh.I., Rubtsov M.A. *Destructive pancreatitis*. M.: LAP Lambert Academic Publishing, 2019, 188 p. (In Russ.)
2. *Acute pancreatitis*. Edited by E.V. Nedashkovsky. M.: GEOTAR-Media, 2019, 272 p. (In Russ.)
3. Sinenchenko G.I. *Purulent-necrotic pancreatitis and parapancreatitis*. M.: Elbi, 2019, 229 p. (In Russ.)
4. Peter A. Banks. *Pancreatitis*. M.: Medicine, 2019, 208 p. (In Russ.)
5. Romashchenko P.N., Strukov E.Yu. *Acute pancreatitis. Aspects of diagnosis and treatment*. M.: ELBI-SPb, 2020, 671 p. (In Russ.)
6. Savelyev V. S., Buyanov V.M., Ognev Yu.V. *Acute pancreatitis*. M.: Medicine, 2020, 240 p. (In Russ.)
7. Vladimirov V. G. *Acute pancreatitis. Experimental and clinical research*. M.: Medicine, 2020, 240 p. (In Russ.)
8. Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Bystritsky L.D., Tkachenko S.B. *Atlas of clinical pathomorphosis of the erythrocyte*. M.: GEOTAR-MED, 2003, 208 p. (In Russ.)
9. Mikhailova O.D., Bylinkina N.M., Shchepina T.P., Bulychev V.F. Electrokinetic reactions of red blood cells in chronic pancreatitis. *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2009. No. 7. pp. 55-60. (In Russ.)
10. Pakhomova R.A., Vinnik Yu.S., Kochetova L.V., Nagornov Yu.S. Morphofunctional state of erythrocytes in benign obstructive jaundice. *Bulletin of Surgery named after I.I. Grekov*, 2017, № 4, pp. 22–26. (In Russ.)
11. Pakhomova R.A., Gulikyan G.N. Atomic force microscopy of erythrocytes of patients with pancreatic necrosis. *Siberian Medical Review*, 2022, № 2, pp. 49–55. (In Russ.)

Сведения об авторах:

Гуликян Гарен Нораирович – к.м.н. доцент кафедры пластической хирургии «Росбиотех». 660058, г. Красноярск, ул. Ломоносова, д.47, e-mail: PRA5555@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1549-0319>,

Пахомова Регина Александровна – д.м.н., заведующая кафедрой пластической хирургии «Росбиотех». 125080, г. Москва, Волоколамское ш., д.11., e-mail: PRA5555@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3681-4685>

Козлов Василий Владимирович – к.м.н., доцент кафедры ОЗиЗ МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. 119991, г. Москва, ул. Трубцкая, д. 8, стр. 2. <https://orcid.org/0000-0003-3941-2742>

Information about the authors:

Gulikyan Garen Norayrovich – PhD, Associate Professor of Plastic Surgery at Rosbiotech. 47 Lomonosova St., Krasnoyarsk, 660058, e-mail: PRA5555@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1549-0319>,

Pakhomova Regina Alexandrovna – MD, Head of the Department of Plastic Surgery at Rosbiotech. 11, Volokolamsk Highway, Moscow, 125080, e-mail: PRA5555@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3681-4685>

Kozlov Vasily Vladimirovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Occupational Diseases at the I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. 8 Trubetskaya str., building 2, Moscow, 119991. <https://orcid.org/0000-0003-3941-2742>