

2. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide / D. Giustarini, I. Dalle-Donne, A. Milzani [et al.] // *Nature Protocols*. – 2013. – №8(9). – P.1660-1669. doi: 10.1038/nprot.2013.095.
3. Bansal A. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance / A. Bansal, M.C. Simon // *Journal of cell biology*. – 2018. – №217(7). – P.2291–2298. doi: 10.1083/jcb.201804161
4. Bilinsky L.M. The role of skeletal muscle in liver glutathione metabolism during ACEtaminophen overdose / L.M. Bilinsky, M.C. Reed, H.F. Nijhout // *Journal of Theoretical Biology*. – 2015. – №376. – P.118–133. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.04.006.
5. Corso C.R. Glutathione system in animal model of solid tumors: from regulation to therapeutic target / C.R. Corso, A. Acco // *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. – 2018. – №128. – P.43–57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.05.014>
6. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism / Y. Liu, A. S. Hyde, M. A. Simpson [et al.] // *Advances in Cancer Research*. – 2014. – №112. – P.69–101. doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5
7. Ethnic Difference in Hematological Toxicity in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Treated with Chemotherapy A Pooled Analysis on Asian versus Non-Asian in Phase II and III Clinical Trials / Y. Hasegawa, T. Kawaguchi, A. Kubo [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2011. – №11(6). P. 1881-1888. ISSN: 1556-0864/11/0611-1881
8. Glutathione fine-tunes the innate immune response toward antiviral pathways in a macrophage cell line independently of its antioxidant properties / M. Diotallevi, P. Checconi, A.T. Palamara [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – №8. – P.1239. doi: 10.3389/fimmu.2017.01239
9. Hollman A.L. The Association between gene-environment interactions and diseases involving the human GST superfamily with SNP variants / A.L. Hollman, P.B. Tchounwou, H.C. Huang // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2016. – №13(4). – P.1–14. doi: 10.3390/ijerph13040379
10. Increase in blood glutathione and erythrocyte proteins related to glutathione generation, reduction and utilization in african-american old women with diabetes / G. Shan, F. Yang, L. C. Zhou [et al.] // *Journal of Science, Technology and Environment Informatics*. – 2015. – №5(1). – P.1-15. PMID: 26770888
11. Kurutas E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state / E.B. Kurutas // *Nutrition Journal*. – 2016. – №15. – P.1–22. doi: 10.1186/s12937-016-0186-5
12. L-Cysteine protects intestinal integrity, attenuates intestinal inflammation and oxidant stress, and modulates NF- κ B and Nrf2 pathways in weaned piglets after LPS challenge / Z. Song, G. Tong, K. Xiao [et al.] // *Innate Immunity*. – 2016. – №22(3). – P.152–161. doi: 10.1177/1753425916632303
13. Lu S. C. Glutathione synthesis / S. C. Lu // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – №1830(5). – P.3143–3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
14. Ramsay E.E. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors / E.E. Ramsay, P.J. Dilda // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – №5. – P.1-16. doi: 10.3389/fphar.2014.00181
15. Real-Time monitoring of glutathione in living cells reveals that high glutathione levels are required to maintain stem cell function / E. M. Jeong, J. H. Yoon, J. Lim [et al.] // *Stem Cell Reports*. 2018. – №10(2). – P.600–614. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.12.007
16. Significance of polymorphisms and expression of enzyme-encoding genes related to glutathione in hematopoietic cancers and solid tumors / S. Zmorzynski, G. Uwidarska-Kobacz, D. Koczkodaj [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – P.1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/853573>
17. The concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and paraoxonase activity in blood of patients with osteoarthritis after endoprosthesis implantation / D.M. Olszewska-Slonina, D. Mątewski, R. Czajkowski [et al.] // *Medical Science Monitor*. – 2011. – №17(9). – P.498–504. doi: 10.12659/MSM.881936

Р.З. Алексеев, А.С. Гольдерова, С.Н. Мамаева,
Н.А. Николаева, М.Т. Бузинаева

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ У ЛИЦ, УМЕРШИХ ОТ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ

DOI 10.25789/YMJ.2018.64.05

УДК 612.117.6; 614.873.23

В статье представлены результаты исследования морфологии эритроцитов умерших от различных причин смерти (ранения, переохлаждение) методом растровой электронной микроскопии. Полученные данные показывают, что появление определенных форм эритроцитов трупного материала зависит от причин смерти. Так, при смерти от колото-резаной и огнестрельной ран эритроциты принимают акантоцитарные формы, а при переохлаждении – эхиноцитарные формы. В проведенном *in vitro* эксперименте при небольших отрицательных температурах в образцах крови наблюдается появление акантоцитов. Исходя из полученных в данной работе результатов, а также на основе свойства эритроцита эхиноцитарной формы, имеющего возможность восстанавливаться, можно косвенно утверждать, что вероятность восстановления жизнедеятельности организма замерзших не исключается.

Ключевые слова: эритроциты, холод, переохлаждение, электронная микроскопия.

The paper presents results of study of red blood cells (RBC) morphology of deceased from various causes (injury, hypothermia) by using scanning electron microscopy. The obtained data show that the appearance of certain forms of cadaveric erythrocytes depends on the causes of death. Therefore, when death is caused by stabbing and gunshots RBC take acanthocyte forms and in cases of fatal hypothermia – echinocyte forms. *In vitro* experiment at small negative temperatures the appearance of acanthocytes in blood samples is observed. Based on the obtained data and on the ability of echinocyte to return to normal form, it can be concluded that the probability of restoring the vital activity of the frozen organisms are possible.

Keywords: red blood cells, hypothermia, scanning electron microscopy.

АЛЕКСЕЕВ Рево Захарович – д.м.н., проф., с.н.с. ЯНЦ КМП, arzrevo@mail.ru; ФТИ СВФУ им. М.К.Аммосова: **ГОЛЬДЕРОВА Айталиа Семеновна** – д.м.н., проф., hoto68@mail.ru, **МАМАЕВА Саргылана Николаевна** – к.ф.-м.н., доцент, sargylana_mamaeva@mail.ru, **НИКОЛАЕВА Надежда Анатольевна** – ассистент кафедры; **БУЗИ-НАЕВА Мария Телектесовна** – к.м.н., зав. лаб. БСМЭ МЗ РС(Я).

Введение. Общее охлаждение и отморожения являются одними из тяжелых видов холодовой травмы, зачастую они приводят к высокому уровню инвалидизации и летальному исходу пострадавших [1]. В настоящее время в мире до конца не изучены вопросы смерти от общего охлаждения в условиях сверхнизких температур (ниже -40°C). В реальных условиях

лиц, умерших от переохлаждения (по внешним признакам), без проведения реанимационных мероприятий доставляют в морг. Однако немаловажным моментом считается, что в течение первых 2 сут пострадавшие находятся в состоянии холодового анабиоза (очень редкий пульс, низкое АД) и вероятность восстановления жизнедеятельности организма не исключается.

ется (отмечаются случаи сохранения жизнедеятельности сердца и других органов у заморозших животных). Результаты нашего метода позволяют предположить теоретическую вероятность восстановления замороженных тканей, органов, а также оживления умерших от общего переохлаждения.

В настоящее время в доступной литературе отсутствуют данные исследований клеток крови умерших от переохлаждения методами электронной микроскопии. Выявление особенностей морфологии клеток крови умерших от переохлаждения, возможно, может дополнить представление о клеточно-молекулярных механизмах процесса общего охлаждения организма и подтвердить возможность восстановления жизнедеятельности организма.

Целью данной работы является исследование морфологических изменений эритроцитов крови из трупного материала умерших от переохлаждения методом сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы исследования. Исследование с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) высокого разрешения JSM-7800F («Japanes Electron Optics Laboratory» – «JEOL», Япония) было проведено в УНТЛ «Графеновые нанотехнологии» СВФУ им. М.К. Аммосова. Объектами изучения были мазки крови из трупного материала умерших от различных причин, в том числе и от переохлаждения, подготовленные в «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения РС(Я).

Прибор имеет термополевой эмиссионный катод Шоттки и супергибридную объективную линзу, значительно уменьшающую хроматические и сферические aberrации и существенно увеличивающую разрешение, особенно при малых ускоряющих напряжениях. Рассматриваемый РЭМ, имеющий диапазон увеличения 25 – 1 000 000, позволяет исследовать объект при ускоряющем напряжении 0,1-30 кВ. Устройство оборудовано 4 типами детекторов: верхний детектор электронов, верхний детектор вторичных электронов, детектор обратно отраженных электронов, нижний детектор вторичных электронов. В данной работе был использован нижний детектор вторичных электронов. Работа в этом режиме позволяет снизить эффект электростатического заряда на поверхности образца, что существенно улучшает качество изображения поверхности эритроцитов.

Используемый в изучении мазков

крови РЭМ JSM-7800F оснащен системой «GentleBeam», которая позволяет уменьшать скорость электронов, падающих на образец, и ускорять испускаемые им электроны, что существенно улучшает качество изображения при низких ускоряющих напряжениях.

Система «GentleBeam» позволяет проводить исследования эритроцитов в мазках крови без напыления проводящих покрытий и без повреждения исследуемых объектов в течение времени, достаточного для того, чтобы сделать необходимые снимки [2].

Исследования мазков крови проводили при ускоряющих напряжениях 1 и 2 кВ с подачей напряжения на исследуемый объект 8-10 В.

Также проводилось экспериментальное исследование клеток крови добровольца *in vitro*. Кровь, помещенную в стеклянную пробирку, постепенно охлаждали, а затем нагревали. В ходе остужения и нагревания было сделано поочередно 6 мазков крови: сразу после забора венозной крови при температуре +36,6°C; затем при температурах +8,0°C, +2,0, -1,7; +12,5 и +31,0°C. Забор крови у умерших от переохлаждения был произведен из области головного мозга, где температура была максимальной (от +6°C до +20°C) по сравнению с другими тканями и органами. Минимальная температура в мягких тканях верхних и нижних конечностей температура составляла -40°C, в легких – +12°C, в печени – +10°C.

Результаты и обсуждение. Существует проблема дифференциации форм акантоцитов и эхиноцитов, поэтому в данной работе для оценки видов эритроцитов были использованы результаты других исследований [3], где были рассмотрены характерные параметры дифференциации различных форм эритроцитов (ахантоцитов, эхиноцитов и шизоцитов) и их ассоциации с заболеваниями на основе

изображений, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) (рис.1).

Эхиноциты имеют небольшие одинаковые выступы, распределенные равномерно, в то время как акантоциты – выступы различного размера и неравномерно распределенные по поверхности клетки.

В ходе исследования мазков крови были получены РЭМ-изображения эритроцитов при различных причинах смерти. На рис.2. представлены изображения эритроцитов молодого мужчины, мазок крови которого был сделан через сутки после его смерти. Смерть наступила в течение 30 мин в результате колото-резаной раны.

В поле зрения при увеличении в 1000 раз наблюдается преобладание дисморфных эритроцитов по сравнению с нормальными. Следует отметить, что дисморфные эритроциты по форме близки к акантоцитам. Неизменные клетки образуют небольшие «монетные столбики», а измененные – плотно соединены между собой отростками. На данном изображении не наблюдаются фрагменты гемолизированных эритроцитов.

На рис.3 показаны эритроциты мужчины, умершего от огнестрельного ранения, мазок крови которого был сделан на вторые сутки после наступления смерти.

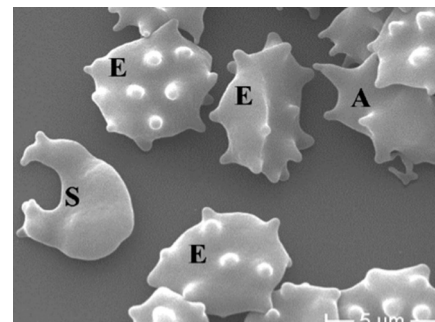


Рис.1. СЭМ-изображения характерных форм эритроцитов – акантоцитов (А), эхиноцитов (Е) и шизоцитов (S)

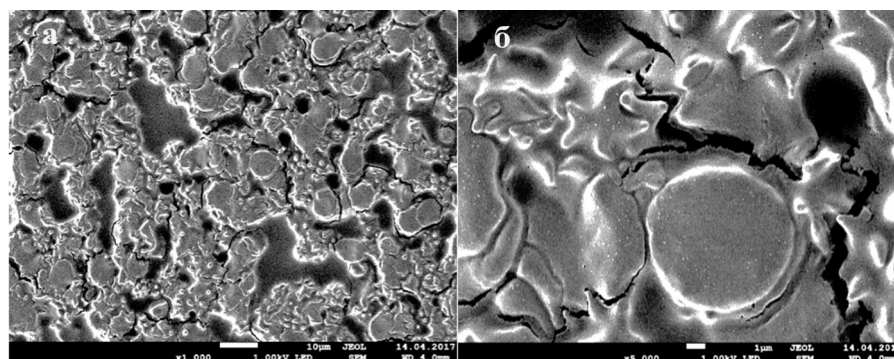


Рис.2. РЭМ-изображения эритроцитов умершего от колото-резаной раны. На рис.2-6: а) при увеличении x1000, б) при увеличении x5000

В случае огнестрельного ранения измененные эритроциты по форме похожи на акантоциты. Такие же дисморфные эритроциты наблюдаются и на рис.1 в случае колото-резаной раны. В отличие от рис.2 наблюдаются признаки гемолиза эритроцитов,

т.е. видно небольшое количество фрагментов эритроцитов, почти все клетки образуют конгломераты. В отличие от первого случая количество неизмененных эритроцитов существенно меньше, что может быть обусловлено временным фактором: мазок во втором

случае был сделан на вторые сутки после наступления смерти, в то время как в случае колото-резаной раны – через 1 сут.

На рис.4 представлены изображения эритроцитов крови 25-летнего мужчины, умершего от переохлаждения. Кровь была взята через 1 сут.

Все эритроциты здесь измененные, скорее всего их можно отнести к эхиноцитам, и при этом они равномерно распределены одним слоем. В отличие от предыдущих изображений на рис.4 все эритроциты соединены между собой очень плотно отростками и образуют небольшие группы. Отростки эритроцитов у замерзшего имеют более острую форму, чем у умерших от ранений, а также более равномерно распределены по всей поверхности эритроцитов.

Кроме исследований клеток крови из трупного материала были произведены РЭМ-исследования клеток крови молодого мужчины-добровольца (рис. 5-6). На образец крови были оказаны различные температурные воздействия.

Кровь в пробирке остужали постепенно и по мере охлаждения проводили нанесение мазков крови на предметное стекло. Очевидно, что при положительных значениях температуры крови (от $+36,6^{\circ}\text{C}$ до $+2,0^{\circ}\text{C}$) существенных изменений морфологии эритроцитов не наблюдается (рис.5). Однако при отрицательной температуре ($-1,7^{\circ}\text{C}$) появляются в небольшом количестве дисморфные эритроциты, по форме близкие к акантоцитам (рис.6), а также небольшое количество шизоцитов. Кроме этого наблюдается образование монетных столбиков и конгломератов эритроцитов. Затем постепенно кровь нагревали. Полученные по мере нагревания крови РЭМ-изображения эритроцитов не отличаются от их изображений, полученных после воздействия на них отрицательной температуры.

Полученные нами результаты показывают, что появление определенных форм эритроцитов трупного материала зависит от причин смерти. Так, при смерти от колото-резаной и огнестрельной ран эритроциты принимают акантоцитарные формы, а при переохлаждении – эхиноцитарные формы.

В результатах эксперимента, проведенного *in vitro*, при небольших отрицательных температурах в РЭМ-изображениях наблюдается появление акантоцитов, как и в случаях смерти от ранений. У умерших от переохлаждения и от других причин пробы

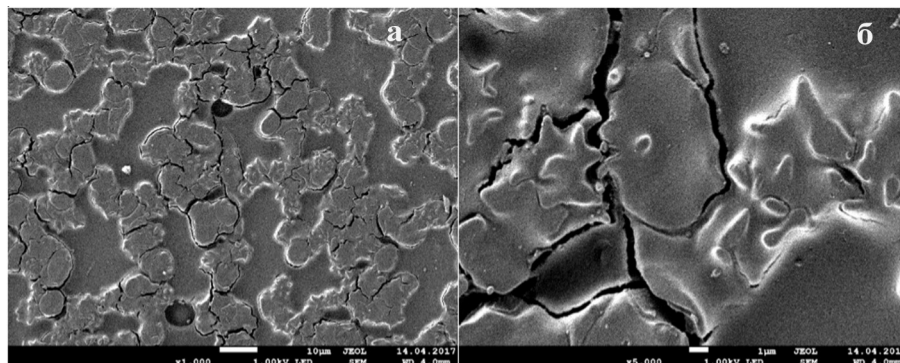


Рис.3. РЭМ-изображения эритроцитов умершего от огнестрельного ранения

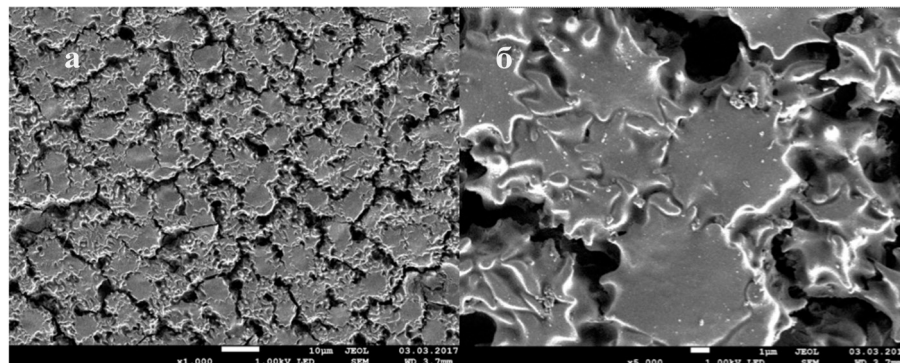


Рис.4. РЭМ-изображения эритроцитов умершего от переохлаждения

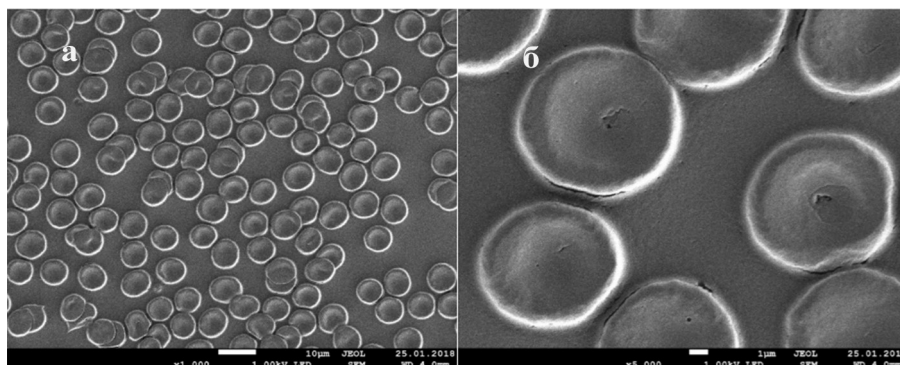


Рис.5. РЭМ-изображения эритроцитов добровольца при температуре $+2^{\circ}\text{C}$

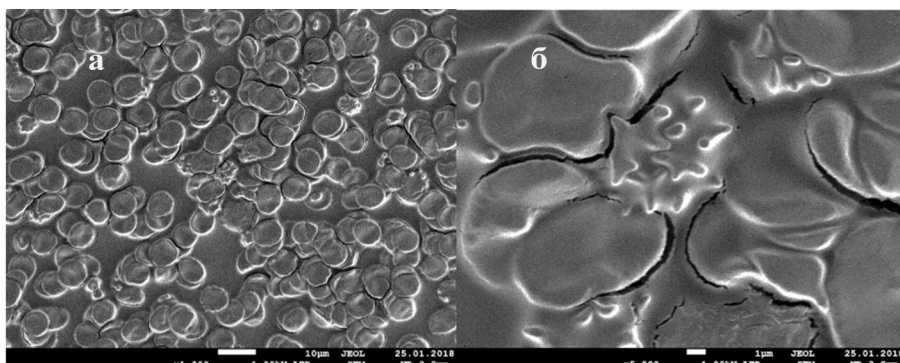


Рис.6. РЭМ-изображения эритроцитов добровольца при температуре $-1,7^{\circ}\text{C}$

крови были взяты примерно при одинаковых небольших положительных температурах. Следует отметить, что в исследовании *in vitro* эритроциты не меняли форму до +2,0°C. Этот факт свидетельствует о том, что появление акантоцитов в крови у умерших от переохлаждения возможно только при длительном пребывании трупа в среде с отрицательной температурой, т.е. при условии понижения температур внутренних жизненно важных органов до отрицательных значений.

По результатам данного исследования, сравнение дисморфных эритроцитов при переохлаждении и при охлаждении образцов крови *in vitro* показывает, что механизмы изменения форм эритроцитов в этих случаях разные.

Известно, что акантоцитарные формы эритроцитов определяются дефектом структурной мембраны [4,5], тогда как эхиноцитарные формы могут быть вызваны и отменены с помощью pH, осмолярности, биохимических и даже электрических изменений [6-9]. Необратимость изменений форм акантоцитов подтверждается в экспериментах *in vitro*: акантоциты, появившиеся вследствие понижения температуры исследуемого образца крови до отрицательных значений, при повышении температуры крови не исчезают и не уменьшаются в количестве в поле

зрения РЭМ-изображений. В отличие от акантоцитов эритроциты эхиноцитарной формы, которые наблюдаются у лиц, умерших от переохлаждения, могут быть восстановлены.

Закключение. Таким образом, полученные нами результаты РЭМ-исследования указывают на то, что формы эритроцитов у лиц, умерших от разных причин, отличаются, а именно, при переохлаждении эритроциты принимают эхиноцитарную форму, а при ранениях — акантоцитарную. Данный факт позволяет предположить, что процесс умирания при переохлаждении имеет свои особенности. Необходимо дальнейшее углубленное изучение данной патологии на молекулярно-клеточном уровне для поиска путей решения задачи восстановления жизнедеятельности организма в первые сутки после смерти от переохлаждения.

Литература

1. Предупреждение развития некроза при отморожениях с оледенением тканей / Р.З. Алексеев, М.И. Томский, А.С. Гольдерова [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2015. — №8-1. — С.35-41.
2. Prevention of the development of necrosis during frostbite with icing of tissues / R.Z. Alekseev, M.I. Tomsij, A.S. Gol'derova [et al.] // International Journal of Applied and Fundamental Research. — 2015. — V. 8-1. — P. 35-41.

3. Измерение морфологии эритроцитов методом электронной микроскопии для диагностики гематурии / Г.В. Максимов, С.Н. Мамаева, С.Р. Антонов [и др.] // Метрология. — 2016. — №1. — С.47-52.

Measurement of erythrocyte morphology by electron microscopy for the diagnosis of hematuria / G.V. Maksimov, S.N. Mamaeva, S.R. Antonov [et al.] // Metrology. Quarterlynexto J. Measuringequipment. — 2016. — V.1. — P. 47-52.

3. Foglia A. The Acanthocyte-Echinocyte differential / A. Foglia // Swiss Medical Weekly, 2010, V.140 (03-04). — P. 1-3; DOI:https://doi.org/10.4414/smw.2010.12963.

4. Bosman G.J. Erythrocyte membrane abnormalities in neuroacanthocytosis. Evidence for a neuron-erythrocyte axis? / G.J. Bosman, M.W. Horstink, W.J. De Grip // Neuroacanthocytosis Syndromes. Springer Verlag. — 2005. — P.153-159.

5. Acanthocyteset hypercholesterolemia / J. Perrin, A. Georges, A. Morali, [et al.] // Ann Biolo Clin., 2008, V.66 (5), P. 56972.

6. Reinhart W.H. Red Cell Rheology in Stomatocyte-Echinocyte Transformation: Roles of Cell Geometry and Cell Shape / W.H. Reinhart, S.Chien // Blood., 1986. — V.4. — P. 1110-1118.

7. Wong P.A. Basis of Echinocytosis and Stomatocytosis in the Disc-sphere Transformations of the Erythrocyte. J Theor Biol., 1999, V.196(3), pp. 343-361.DOI:10.1006/jtbi.1998.0845

8. Mrowietz C, Hiebl B, Franke RP, et al. Reversibility of Echinocyte Formation after Contact of erythrocytes with various Radiographic Contrast Media. Clin. Hemorheol. Microcirc., 2008, V.39(1-4), pp. 281-286.

9. Schwarz S, Deuticke B, Haest CW. Passive Transmembrane Redistributions of Phospholipids as a Determinant of Erythrocyte Shape Change. Studieson Electroporated Cells .Mol. Membr. Biol., 1999, V.16(3), pp. 247-55.

Г.А. Усенко, Д.В. Васендин, А.Г. Усенко

ГАММА-ФОН СРЕДЫ В ПЕРИОД МАГНИТНЫХ БУРЬ И СОДЕРЖАНИЕ КАЛИЯ И НАТРИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАМЕНТА И ВАРИАНТА АНТИГИПЕРТЕНЗИВНОЙ ТЕРАПИИ

DOI 10.25789/YMJ.2018.64.06

УДК 550.382.3:612.014.4

Проведено обследование мужчин, здоровых и страдающих артериальной гипертензией (АГ), с целью установления и анализа взаимосвязи между динамикой γ -фона внешней среды, уровнем утилизации кислорода тканями и содержанием калия и натрия в эритроцитах у больных АГ с различными темпераментом и уровнем тревожности, получающих различные варианты антигипертензивной терапии — нецеленаправленный и целенаправленный на купирование психосоматических особенностей темперамента, а также определения наиболее эффективного варианта лечения.

УСЕНКО Геннадий Александрович — д.м.н., проф. ФГБОУ ВО «Новосибирский ГМУ», usenko1949@mail.ru; **ВАСЕНДИН Дмитрий Викторович** — к.м.н., доцент ФГБОУ ВО «Сибирский ГУ геосистем и технологий», доцент Новосибирского ГМУ, vasendindv@gmail.com; **УСЕНКО Андрей Геннадьевич** — к.м.н., врач функциональной диагностики «Новосибирский областной госпиталь №2 ветеранов войн», h2vv@mail.ru.

Выявлено, что в отличие от нецеленаправленного, при лечении, направленном на купирование особенностей темперамента, значения показателей были существенно ближе, а сроки возвращения к исходным (до магнитной бури) значениям и степень корреляционной связи между γ -фоном, коэффициентом утилизации кислорода тканями и содержанием изученных электролитов совпали с таковыми у здоровых высоко- и низкотренированных лиц соответствующего темперамента. Следовательно, антигипертензивная терапия, направленная на купирование особенностей психосоматического статуса пациентов, может быть признана как более эффективный вариант лечения больных артериальной гипертензией.

Ключевые слова: гипертония, солнечная активность, γ -фон, эритроциты, калий, натрий, корреляция.

A survey of healthy and hypertensive men was conducted with the aim of establishing and analyzing the relationship between the dynamics of γ -background of the environment, the level