

9. Горбич ЮЛ, Карпов ИА. Антибактериальная терапия инфекции, вызванной *Acinetobacter Baumannii*. *Здравоохранение*. 2013;(6):68-73.
10. Ni W et al. Tigecycline Treatment for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine*. 2016;95(11): e3126.
11. Ni W et al. Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47(2):107-16.
12. McKeage K, Keating G. Tigecycline In Community-Acquired Pneumonia. *Drugs*. 2008;68(18):2633-44.
13. Tanaseanu C et al. Integrated results of 2 phase 3 studies comparing tigecycline and levofloxacin in community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61(3):329-38.
14. Горбич ЮЛ, Карпов ИА, Соловей НВ, Левшина НН. Тигециклин (Tigecycline): возможности и перспективы применения. *Здравоохранение*. 2013;5:39-42.
15. Андреева ИВ, Стецюк ОУ, Козлов РС. Тигециклин: перспективы применения в клинической практике. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2010;12(2):127-45.
9. Gorbich YL, Karpov IA. Antibacterial therapy of infection caused by *Acinetobacter Baumannii*. *Zdravookhraniye*. 2013;(6):68-73. (In Russ.)
10. Ni W. et al. Tigecycline Treatment for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine*. 2016;95(11):e3126.
11. Ni W. et al. Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47(2):107-16.
12. McKeage K, Keating G. Tigecycline In Community-Acquired Pneumonia. *Drugs*. 2008;68(18):2633-44.
13. Tanaseanu C. et al. Integrated results of 2 phase 3 studies comparing tigecycline and levofloxacin in community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61(3):329-38.
14. Gorbich YL, Karpov IA, Solovey NV, Levshina NN. Tigecycline (Tigecycline): opportunities and prospects of use. *Zdravookhraniye*. 2013;(5):39-42. (In Russ.)
15. Andreyeva IV, Stetsyuk OU, Kozlov RS. Tigecycline: prospects for use in clinical practice. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2010;12(2):127-45. (In Russ.)

Поступила 13.04.2018

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.155.15-008.851-056.7

СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ СФЕРОЦИТОЗОМ

М. Н. Стародубцева^{1,2}, Е. Ф. Мицура³, И. А. Челнокова¹,
А. Н. Кондрачук¹, Н. И. Егоренков¹

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,
г. Гомель, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии НАН Беларуси»,

г. Гомель, Республика Беларусь

³Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»,
г. Гомель, Республика Беларусь

Цель: изучить форму эритроцитов и структуру их поверхностного слоя, включающего мембрану и цитоскелет (актин-спектриновую сеть), у пациентов детского возраста с наследственным сфероцитозом.

Материалы и методы. В работе использовали методы оптической и атомно-силовой микроскопии.

Результаты. В крови пациентов с наследственным сфероцитозом обнаружено большое разнообразие форм эритроцитов, преобладающими из которых являются дискоциты, сфероциты и эхиноциты. На поверхности некоторых клеток присутствовали микровезикулы. Выявлена пространственная неоднородность структуры карт механических свойств поверхностного слоя клеток.

Заключение. Разнообразие свойств эритроцитов пациентов с наследственным сфероцитозом имеет место как на уровне форм клеток, так и на уровне структуры карт механических свойств их поверхностного слоя.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, эритроциты, цитоскелет, наследственный сфероцитоз.

STRUCTURAL DIVERSITY OF ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH HEREDITARY SPHEROCYTOSIS

M. N. Starodubtseva^{1,2}, E. F. Mitsura³, I. A. Chelnokova¹,
A. N. Kondrachuk¹, N. I. Yegorenkov¹

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

²Institute of Radiobiology of the NAS of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

³Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Republic of Belarus

Objective: to study the shape of erythrocytes and structure of their surface layer including the membrane and cytoskeleton (actin-spectrin network) in child patients with hereditary spherocytosis.

Material and methods. The methods of optic and atomic-force microscopy were used in the study.

Results. A variety of erythrocyte shapes with such prevalent types as discocytes, spherocytes, and echinocytes were revealed in the blood of the patients. The surface of certain cells contained microvesicles. The spatial heterogeneity of the structure of mechanical property maps of the cell surface layer was detected.

Conclusion. The diversity of erythrocyte features in patients with hereditary spherocytosis is present both at the level of the cell shapes and at the level of the structure of mechanical property maps of their surface layer.

Key words: atomic-force microscopy, erythrocytes, cytoskeleton, hereditary spherocytosis.

Введение

Гемолитические анемии (ГА) в детском возрасте по частоте распространения уступают только железодефицитным анемиям. Главным признаком ГА является уменьшение продолжительности жизни эритроцитов (менее 90 дней). Наследственный сфероцитоз (НС) является наиболее часто встречающейся формой гемолитических анемий в Европе. Распространенность НС порядка 1 случай на 5000 населения, но считается, что при учете более легких форм болезни может возрастать до 1 на 2000 [1–3]. НС встречается у большинства этнических групп и может проявиться в любом возрасте, легкие формы часто диагностируются у взрослых людей [4]. Несмотря на то, что НС в большинстве случаев протекает доброкачественно, вследствие интенсивного гемолиза с возрастом повышается риск избыточного накопления железа, что приводит к сахарному диабету, поражению печени, сердца, эндокринным аномалиям [4].

Типичными проявлениями наследственного сфероцитоза являются гемолитическая анемия, желтуха, образование камней в желчном пузыре и спленомегалия. Характерны для наследственного сфероцитоза также ретикулоцитоз и сниженная осмотическая стойкость эритроцитов. Тяжесть состояния определяется по уровням гемоглобина, билирубина, числу ретикулоцитов [5].

При НС повышено количество ретикулоцитов с или без анемии, объем эритроцитов (MCV, Mean Corpuscular Volume) в норме или снижен, а концентрация гемоглобина в них повышена (MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration). Показатель распределения эритроцитов по объему (RDW — red blood cell distribution width) увеличен [6]. Соотношение MCHC/MCV было предложено использовать для скрининга НС у новорожденных [7]. В диагностике НС используют различные модификации теста на осмотическую резистентность и основанный на проточной цитометрии тест с эозин-5-малеимидом [5, 6]. В качестве дополнительного метода исследования используют электрофорез белков мембраны в полиакриламидном геле (SDS-PAGE), который позволяет выявить дефект определенного структурного белка мембраны и цитоскелета [5, 6].

Для НС характерны дефекты структуры белков мембраны и цитоскелета и соответ-

ствующим им генов. Чаще всего имеет место нарушение структуры анкирина, спектрина (α или β), белка полос 3 и 4.2 [8]. Многие вопросы строения мембранного скелета эритроцитов еще требуют дальнейшего изучения [9].

Современным методом исследования структурно-механических свойств поверхности клеток является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Оценка с помощью атомно-силового микроскопа структуры и механических свойств отдельных клеток дает важную информацию, дополнительную к их усредненным параметрам, получаемым при изучении клеточных популяций [10]. С помощью АСМ изучены особенности поверхности эритроцитов при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [11], выявлены существенные изменения мембран эритроцитов при НС после выполненной脾эктомии [12], что позволило авторам рекомендовать АСМ-метод для мониторинга эффективности лечения.

Цель исследования

Изучить с помощью оптической микроскопии и атомно-силовой микроскопии (контактный режим сканирования) форму клеток и структуру карт механических свойств микромасштабных участков поверхности эритроцитов детей при наследственном сфероцитозе.

Материалы и методы

Образцы клеток. В работе исследованы эритроциты периферической крови 5 пациентов РНПЦ радиационной медицины и экологии человека с наследственным сфероцитозом (НС) с различными вариантами клинического течения (3 пациента с течением средней тяжести, из которых 1 обследовался после гемотрансфузии, и 2 — с тяжелым течением, из которых 1 — после脾эктомии). Венозную кровь забирали в пробирки с антикоагулянтom ЭДТА. Эритроциты фиксировали глutarовым альдегидом (1 % раствор) в течение 15 минут (37 °C), отмывали три раза раствором Хэнкса и два раза дистиллированной водой, затем помещали на стеклянные пластины и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Оптическая и атомно-силовая микроскопия.

Анализ морфологии эритроцитов проводили с помощью световой микроскопии. АСМ-исследования поверхности клеток проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («Микротестмашины», Беларусь) в режиме записи

карт рельефа и карт латеральных сил при контактном методе сканирования иглой-зондом CSC38 («MikroMasch», Эстония): уровень В, коэффициент жесткости 0,03 Н/м (22 ± 5 °С, влажность 55 ± 10 %). Сканировали участки поверхности клеток размером от $1,5 \times 1,5$ мкм до 10×10 мкм с разрешением 256×256 пикселей и 128×128 пикселей на воздухе. Обработку АСМ-данных осуществляли с помощью программы «SurfaceExplore 1.3.11» («Микротест-машины», Беларусь) [5].

Статистический анализ данных. Размер выборки для оптической микроскопии составлял 400–1500 клеток для каждого пациента (образца крови). Размер выборки по разным формам клеток для атомно-силовой микроскопии составлял: дискоцитов — 15, сфероцитов — 25, эхиноцитов — 5 и кодоцитов — 4. Процентное содержание различных форм эритроцитов в образце крови и диаметр различных форм эритроцитов представляли в виде границ 95 % доверительного интервала. Сравнение средних значений различных выборок прово-

дили с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок.

Результаты и обсуждение

У пяти пациентов с НС оценивались показатели общеклинического анализа крови: число эритроцитов (RBC, Ткл/л), уровень гемоглобина (HGB, г/л), гематокрит (HCT, %), средний объем эритроцитов (MCV, фл), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, пг), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC, г/л), показатель распределения эритроцитов по объему (RDW, %) и число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов (Rt, %).

Пациенты с НС различались по степени тяжести течения заболевания, которая определялась выраженностью анемического синдрома, уровнями билирубина и ретикулоцитов, а также по данным динамического наблюдения. Общие клинические показатели крови пациентов с НС, соответствующие дате взятия образцов для оптической и атомно-силовой микроскопии, представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели клинического анализа крови

Образец	RBC, Ткл/л	HGB, г/л	HCT, %	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л	RDW, %	Rt ‰
Образец 1 (легкая степень тяжести)	4,1	116	32,4	78,9	28,3	359	16,0	86
Образец 2 (средняя степень тяжести)	3,4	109	29,0	84,5	31,7	375	17,5	264
Образец 3 (средняя степень тяжести)	3,95	116	39,3	101,0	29,3	322	12,3	176
Образец 4 (после гемотрансфузии)	4,29	103	28,8	67,1	23,9	356	22,7	72
Образец 5 (после спленэктомии)	5,4	149	39,4	72,5	27,5	379	13,4	29

В таблице 2 представлено соотношение форм эритроцитов в крови пациентов по данным световой микроскопии. В крови пациентов с НС значительно снижено содержание дискоцитов-нормоцитов: ниже 60 % при средней и тяжелой степени протекания болезни и ниже 70 % после гемотрансфузии и спленэк-

томии. При этом имеет место увеличение количества сфероцитов в крови пациентов с НС свыше 20 %, а после гемотрансфузии и спленэктомии — до 20 %. По данным световой микроскопии в образцах крови пациентов с НС также увеличено содержание стоматоцитов и эхиноцитов.

Таблица 2 — Содержание (%) различных форм эритроцитов в образцах по данным световой микроскопии

Образец	Сфероцит	Стоматоцит	Дискоцит-эхиноцит	Эхиноцит	Микроцит	Нормоцит
Образец 1	$49,11 \pm 0,34$	$4,84 \pm 0,76$	$5,28 \pm 0,65$	$0,73 \pm 0,26$	$1,16 \pm 0,49$	$38,87 \pm 0,19$
Образец 2	$30,16 \pm 1,12$	$13,80 \pm 1,17$	$10,19 \pm 0,45$	$2,65 \pm 0,42$	—	$43,19 \pm 2,02$
Образец 3	$23,31 \pm 3,99$	$8,12 \pm 0,59$	$2,92 \pm 0,75$	$9,09 \pm 1,05$	$2,73 \pm 0,43$	$53,83 \pm 3,22$
Образец 4	$10,67 \pm 1,03$	$3,30 \pm 0,47$	$9,61 \pm 1,01$	$9,01 \pm 0,82$	$4,89 \pm 0,49$	$62,51 \pm 1,74$
Образец 5	$17,20 \pm 1,41$	$2,68 \pm 0,80$	$12,20 \pm 0,92$	$4,11 \pm 1,01$	—	$63,73 \pm 2,13$

При проведении исследования клеток с помощью АСМ в популяции клеток эритроцитов

выявлены их следующие основные формы: дискоциты-нормоциты, сфероциты с различными

морфологическими индексами, эхиноциты с различными морфологическими индексами, кодоци-

ты, микроциты. Трехмерные АСМ-изображения форм эритроцитов представлены на рисунке 1.

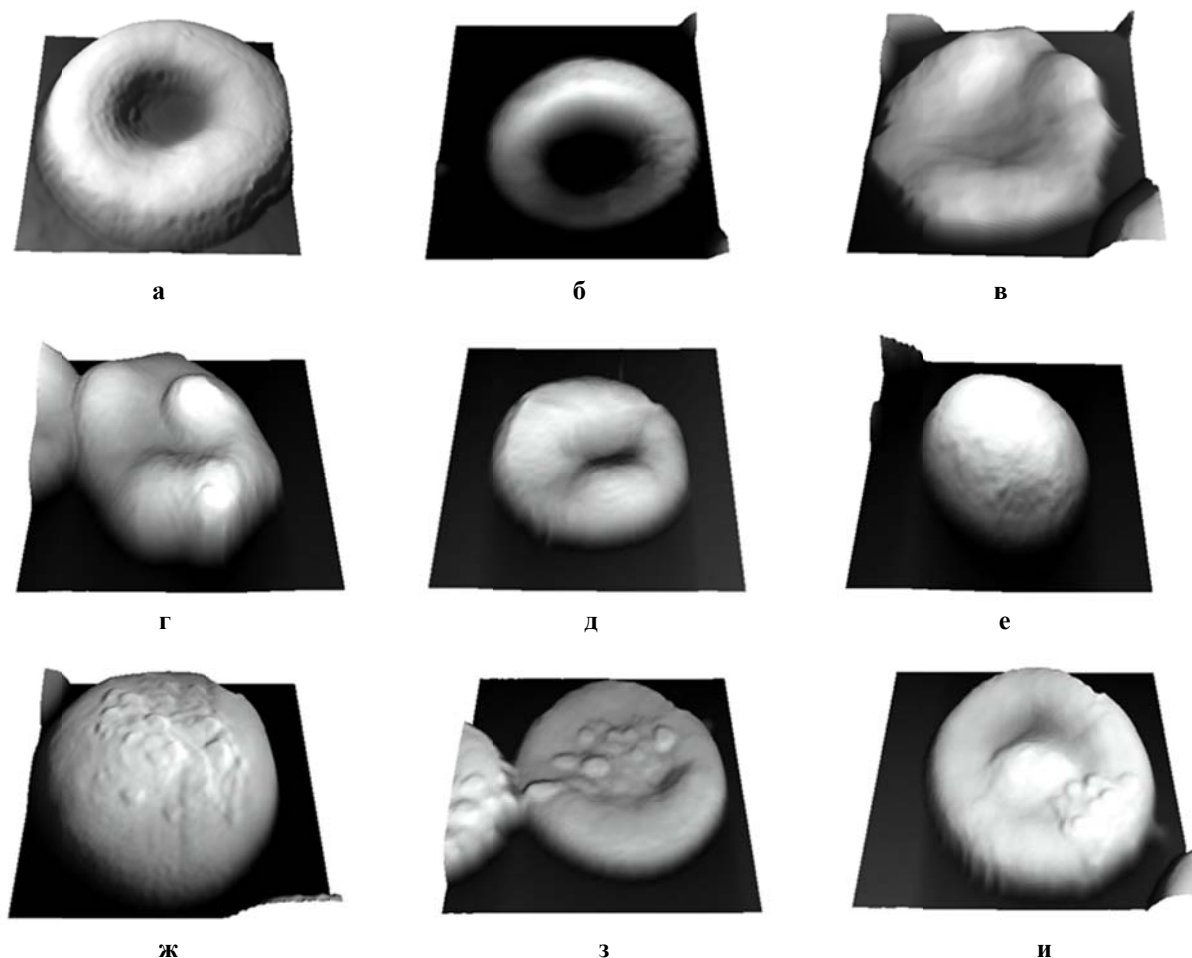


Рисунок 1 — АСМ-изображения (топография) эритроцитов разных форм:
 а — дискоцит-нормоцит (7,4×7,8 мкм), б — стоматоцит (10,7×10,7 мкм); в — дискоцит-эхиноцит (9,4×9,4 мкм), г — эхиноцит (7,2×7,2 мкм); д — микроцит-стоматоцит (7,6×7,6 мкм), е — сфероцит (7,6×7,6 мкм), ж — сфероцит с гранулами на поверхности (8,9×8,9 мкм), з — дискоцит с гранулами на поверхности (10,4×10,4 мкм), и — кодоцит (10,2×10,2 мкм), разрешение 128×128 пикселей

На поверхности некоторых клеток выявлены гранулоподобные структуры (рисунок 1, ж-и). Размер гранул равен 258 ± 32 нм ($n = 50$). На картах механических свойств (картах латеральных сил) поверхности гранул проявляется рисунок, характерный для поверхности эритроцитов, и который обусловлен структурой и свойствами мембранного скелета эритроцитов — актин-спектриновой сети (рисунок 2, е). Предположительно гранулами являются микровезикулы, образованные при отшнуровании от клетки части плазматической мембраны с подлежащим под ней цитоскелетом. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что диаметр сфероцитов с гранулами на поверхности ($D = 6,39 \pm 0,20$ мкм, $n = 58$), то есть в процессе везикуляции, существенно больше диаметра сфероцитов без гранул ($D = 5,88 \pm 0,16$ мкм, $n = 19$, $p < 0,05$), когда возможности для везикуляции исчерпаны.

Качественный анализ карт механических свойств микромасштабных участков поверхности различных форм клеток показывает разнообразие структур, что обусловлено пространственным разнообразием структур актин-спектриновой сети эритроцитов пациентов с НС (рисунок 2). Карта распределения механических свойств поверхности клеток может быть как мелко-зернистой, так и крупнозернистой как для разных форм эритроцитов, так и для форм эритроцитов, визуально не отличимых по световым фотографиям (рисунок 2, б, в, с). Неоднородность структуры цитоскелета эритроцитов пациентов с НС способствует образованию при механических воздействиях и стрессах локальных областей мембраны, способных отделяться от клетки с образованием микровезикул. Это согласуется с общепринятой гипотезой, согласно которой сфероциты при сфероцитозе образуются в результате отделения

части мембраны от клетки при прохождении ею селезенки, что уменьшает соотношение объема

к площади поверхности клетки, приближая форму клетки к идеальному шару [1].

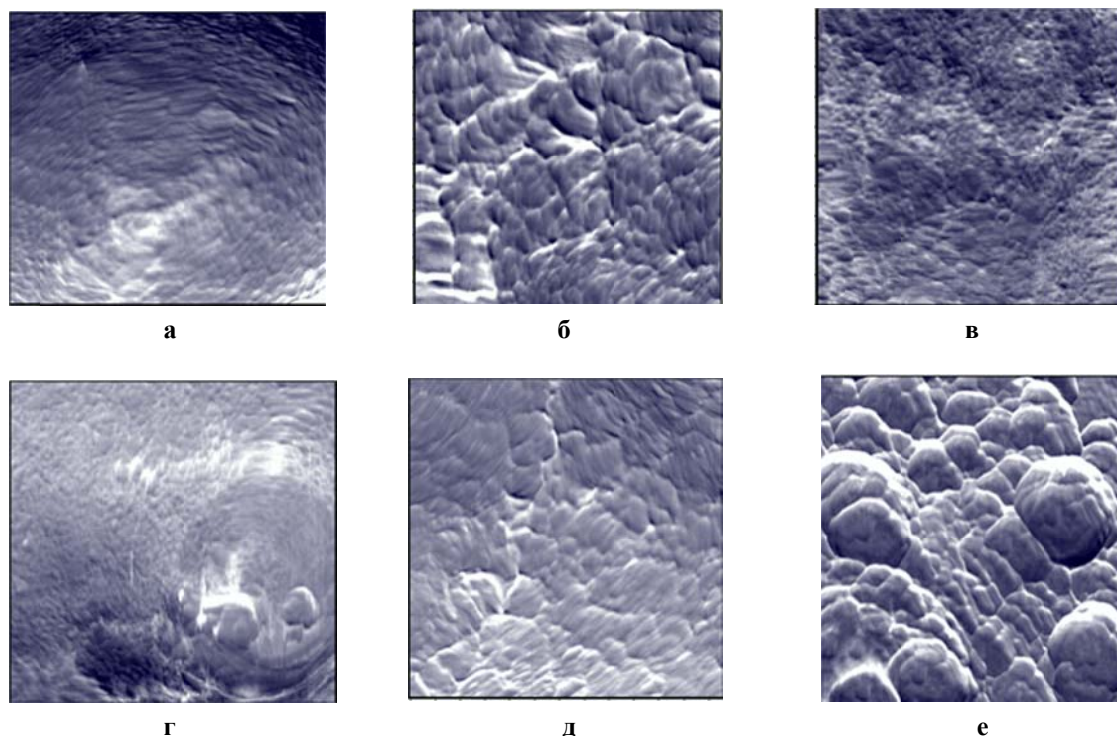


Рисунок 2 — Типичные карты латеральных сил участков поверхности эритроцитов пациентов с наследственным сфероцитозом:

а — дискоцит; б, в — сфероцит; г — эхиноцит 2; д — дискоцит-эхиноцит; е — сфероцит с гранулами. 2×2 мкм, 256×256 пикселей

Визуально неразличимые по структуре на световых микрофотографиях формы клеток отличаются по данным АСМ пространственной структурой карт механических свойств микромасштабных участков поверхности, при этом выявляется не только различие в размерах структурных элементов, но и их пространственная неоднородность (структура подмем-

бранного скелета — актин-спектриновой сети) в пределах одной клетки. Методом АСМ на поверхности клеток выявлены микровезикулы, образование которых сопровождается трансформацию дискоцитов в сфероциты при механических воздействиях на структурно-неоднородную сеть подмембранного скелета эритроцитов при НС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008Oct;372(9647):1411-26.
2. Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol*. 2004 Apr;41(2):118-41.
3. Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus*. 2011 Jul;9(3):274-7.
4. Mahajan V, Jain SK. Hereditary Spherocytosis. *NeoReviews*. 2016 Dec;17 (12) e697-e704.
5. King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. International Council for Standardization in Haematology. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol*. 2015 Jun;37(3):304-25.
6. Gallagher PG. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Dec;60(6):1349-62.
7. Christensen R, Yaish H, Henry E, Baer V, Bennett S. A simple method of screening newborn infants for hereditary spherocytosis. *J Appl Hematol*. 2013 Jun;4:27-32.
8. Andolfo I, Russo R, Gambale A, Iolascon A. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*. 2016 Oct; 101(11):1284-1294.
9. Lux SE 4th. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016 Jan 14;127(2):187-99.

REFERENCES

1. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008Oct;372(9647):1411-26.
2. Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol*. 2004 Apr;41(2):118-41.
3. Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus*. 2011 Jul;9(3):274-7.
4. Mahajan V, Jain SK. Hereditary Spherocytosis. *NeoReviews*. 2016 Dec;17 (12) e697-e704.
5. King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. International Council for Standardization in Haematology. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol*. 2015 Jun;37(3):304-25.
6. Gallagher PG. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Dec;60(6):1349-62.
7. Christensen R, Yaish H, Henry E, Baer V, Bennett S. A simple method of screening newborn infants for hereditary spherocytosis. *J Appl Hematol*. 2013 Jun;4:27-32.
8. Andolfo I, Russo R, Gambale A, Iolascon A. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*. 2016 Oct; 101(11): 1284-1294.
9. Lux SE 4th. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016 Jan 14;127(2):187-99.

10. Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim CT, Suresh S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull.* 2010 May;35(5):382-388.

11. Tang J, Jiang C, Xiao X, Fang Z, Li L, Han L, et al. Changes in red blood cell membrane structure in G6PD deficiency: anatomic force microscopy study. *Clin Chim Acta.* 2015 Apr 15;444:264-70.

12. Li Y, Lu L, Li J. Topological structures and membrane nanostructures of erythrocytes after splenectomy in hereditary spherocytosis patients via atomic force microscopy. *Cell Biochem Biophys.* 2016 Sep;74(3):365-71.

10. Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim CT, Suresh S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull.* 2010 May;35(5):382-388.

11. Tang J, Jiang C, Xiao X, Fang Z, Li L, Han L, et al. Changes in red blood cell membrane structure in G6PD deficiency: anatomic force microscopy study. *Clin Chim Acta.* 2015 Apr 15;444:264-70.

12. Li Y, Lu L, Li J. Topological structures and membrane nanostructures of erythrocytes after splenectomy in hereditary spherocytosis patients via atomic force microscopy. *Cell Biochem Biophys.* 2016 Sep;74(3):365-71.

Поступила 23.04.2018