

Зачастую медицинские работники уделяют недостаточно внимания заботе о собственном здоровье. Поэтому, одной из важнейших задач для нас в части работы по ФЗОЖ является повышение грамотности слушателей по вопросам сохранения и укрепления здоровья, формирование у слушателей престижа здоровья, мотивации к ведению здорового образа жизни.

Специалисты, обучающиеся на курсах повышения квалификации и переподготовки руководящих работников и специалистов со средним специальным образованием, отмечают, что изучение вопросов формирования здорового образа жизни способствует совершенствованию профессиональной компетенции, стимулирует к проведению информационно-образовательной работы среди населения по профилактике основных социально-значимых заболеваний.

УДК 616.155.194-008.851-053.2:537.533/.534

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЕТЕЙ ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АНЕМИЯХ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

*Стародубцева М. Н.^{1,3}, Мицура Е. Ф.², Стародубцев И. Е.⁴,
Челнокова И. А.¹, Кондрачук А. Н.¹, Егоренков Н. И.¹*

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»,

³Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»

г. Гомель, Республика Беларусь

⁴Учреждение образования

«Белорусский государственный университет»

г. Минск, Республика Беларусь

Введение

Гемолитические анемии (ГА) в структуре анемий детского возраста составляют до 15 % [1]. Главным признаком ГА является уменьшение продолжительности жизни эритроцитов (менее 120 дней). Разрушение эритроцитов может быть обусловлено как клеточными (патология мембраны, ферментов, гемоглобина), так и внеклеточными причинами [1, 2]. К наследственным ГА относят мембранопатии (чаще всего выявляется наследственный сфероцитоз), гемоглобинопатии (например, талассемия) и энзимопатии (дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). Выделяют также группу приобретенных ГА, где чаще всего встречается аутоиммунные ГА [1, 2]. Гемолиз при гемолитических анемиях может происходить из-за увеличения жесткости (уменьшения способности к деформации) поверхностного слоя эритроцитов (например, вследствие изменения его структуры). 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. С помощью АСМ изучены особенности поверхности эритроцитов при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [3], выявлены существенные изменения мембран эритроцитов при наследственном сфероцитозе после выполненной спленэктомии [4], что позволило авторам рекомендовать АСМ-метод для мониторинга эффективности лечения. Важной и малоизученной областью АСМ-исследования клеток является анализ распределения локальных значений механических свойств в поверхностном слое (карты механических свойств).

Цель

Изучение с помощью атомно-силовой микроскопии в контактном режиме сканирования структуры карт механических свойств микромасштабных участков поверхности разных форм эритроцитов детей при гемолитических анемиях.

Материал и методы исследования

В работе исследованы эритроциты периферической крови пациентов РНПЦ радиационной медицины и экологии человека с наследственным сфероцитозом (НС), наследственным сфероцитозом после гемотрансфузии (НСПГ) и приобретенной гемолитической анемии (ПГА). Венозную кровь забирали в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА. Эритроциты фиксировали глутаровым альдегидом (1 % раствор) в течение 15, 30 или 60 минут (37 °С), отмывали три раза раствором Хэнкса и два раза дистиллированной водой, затем помещали на стеклянные пластины и высушивали на воздухе при комнатной температуре. 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 %). Термостатирование образцов при АСМ-сканировании осуществляли с помощью термоплатформы ТТ-01. Сканировали участки поверхности клеток размером от 0,7 × 0,7 мкм до 10 × 10 мкм с разрешением 256 × 256 пикселей и 128 × 128 пикселей. Обработку АСМ-данных осуществляли с помощью программы «SurfaceExplore 1.3.11» («МикроТестМашины», Беларусь) и специально разработанного для этих целей программного комплекса [5]. Фрактальную размерность (D_F) карт механических свойств рассчитывали с помощью метода подсчета кубов. Оценку среднего значения D_F для участка поверхности клетки осуществляли с помощью разбиения участка на 8 участков одинаковой площади, оценки средних значений D_F для каждого из участков и расчета ее среднего значения и границ 95 % доверительного интервала для целой выборки. Зависимость D_F от коэффициента масштабирования t по оси Z ($D_F = f(t)$), которая описывает структурные свойства поверхности лучше, чем единичное значение D_F , строили на основе массива дополнительно созданных цифровых поверхностей, полученных с помощью умножения данных реального АСМ-изображения на коэффициент t , изменяемый в широком диапазоне от 0,0001 до 22027 с шагом $e = 2,71828$ [5]. Для каждой линии сканирования АСМ-изображения были построены периодограммы $R(\omega)$, используя дискретное преобразование Фурье. Сгладив полученные периодограммы окном Даниэля размером $m = 11$, получали оценки спектральной плотности $R_m(\omega)$. Усредненную для каждой частоты по всем линиям сканирования кривую оценок $R_m(\omega)$ разбивали на два отрезка и рассчитывали среднее значение спектральной плотности на них (A_1 и A_2). Парам этих значений в двумерном пространстве соответствуют точки (A_{1i} , A_{2i}), анализировали положение множеств этих точек для АСМ-изображений поверхности дискоцитов-нормоцитов и эхиноцитов 1.

Результаты исследования и их обсуждение

Общие клинические показатели крови, касающиеся свойств эритроцитов пациентов, приведены в таблице 1. В таблице 2 представлено соотношение форм эритроцитов в крови пациентов по данным световой микроскопии.

Таблица 1 — Показатели клинического анализа крови

Образец	RBC, Ткл/л	HGB, г/л	HCT, %	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л	RDW, %	Rt, ‰	СОЭ, мм/ч
Образец 1 (НСПГ)	4,29	103	28,8	67,1	23,9	356	22,7	72	13
Образец 2 (НС)	4,19	118	31,3	74,7	28,1	376	21,9	193	15
Образец 3 (ПГА)	4,73	120	37,3	78,8	25,4	322	21,4	45	5

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

Образец	Макроцит	Микроцит	Сфероцит	Стоматоцит	Эхиноцит 1	Эхиноцит 2	Нормоцит
Образец 1 (НСПГ)	3,3 ± 0,8	4,9 ± 0,5	10,7 ± 1,0	3,3 ± 0,5	9,6 ± 1,0	9,0 ± 0,8	59,2 ± 1,7
Образец 2 (НС)	1,0 ± 0,2	3,9 ± 0,9	6,1 ± 0,8	2,1 ± 0,1	28,8 ± 3,4	14,9 ± 1,6	43,2 ± 5,3
Образец 3 (ПГА)	2,7 ± 0,3	1,4 ± 0,1	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,3	5,4 ± 0,6	6,7 ± 0,9	78,8 ± 2,1

В крови пациентов с анемиями наблюдается уменьшение содержания дискоцитов-нормоцитов за счет, в основном, увеличения содержания сфероцитов и эхиноцитов. Причем, эхиноциты более характерны для образцов 1 и 2 с наследственным сфероцитозом. На рисунке 1 представлены полученные с помощью АСМ трехмерные изображения форм эритроцитов (топография) и карты латеральных сил микромасштабных участков поверхности клеток. Большинство кренированных форм эритроцитов — это эхиноциты-дискоциты с индексами 1 и 2. Как известно, трансформация дискоцитов-нормоцитов в эхиноциты-дискоциты имеет место при изменении состава липидного бислоя и структуры цитоскелетных белков. Увеличение степени асимметрии липидного бислоя запускает процесс образования выпуклостей (локальных выпячиваний) на поверхности клетки, который идет при участии цитоскелета [6]. В дальнейшем процесс ведет к везикулизации мембраны и формированию сфероподобной формы клеток с меньшим объемом. Этому способствует и повышенная в сравнении с дискоцитами-нормоцитами жесткость поверхности эхиноцитов, обусловленная ростом упругих свойств как липидного бислоя, так и цитоскелета [6]. Повышенное содержание эхиноцитов в крови типично для наследственного сфероцитоза с нарушениями структуры β -субъединицы спектрина [7].

Методом АСМ мы изучили структуру карт латеральных сил микромасштабных участков поверхности эхиноцитов-дискоцитов (эхиноцитов 1) и дискоцитов-нормоцитов.

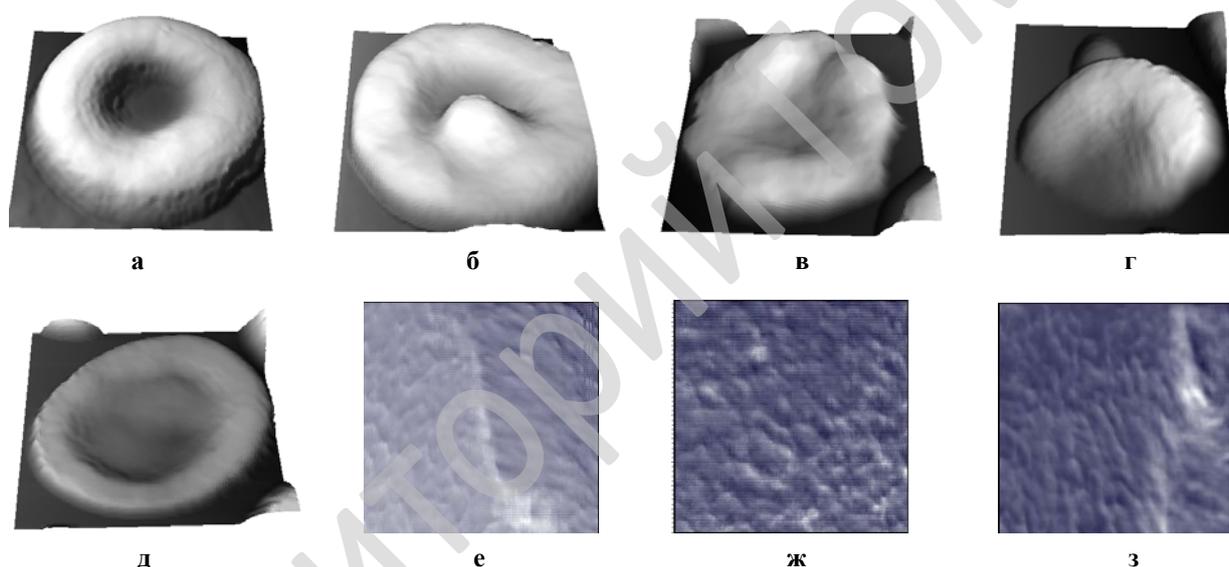


Рисунок 1 — АСМ-изображения (топография) эритроцитов (а-д) и карты латеральных сил микромасштабных участков поверхности эритроцитов разных форм (е-з): а — дискоцит-нормоцит (7,4 × 7,8 мкм); б, в — эхиноциты 1 (7,0 × 7,4 мкм, 9,4 × 9,4 мкм); г — сфероцит (7,6 × 8,0 мкм); макроцит (9,5 × 10,7 мкм), разрешение 128 × 128 пикселей; е — дискоцит-нормоцит; ж — эхиноцит 1, з — макроцит, размеры — 995 × 995 нм, 256 × 256 пикселей

Карты латеральных сил содержат информацию, связанную не только с механическими свойствами вещества поверхностного слоя клетки, которые обусловлены, в основном, структурой прилегающего к плазматической мембране коркового слоя цитоскелета (актин-спектриновой сети), но и с рельефом поверхности. Установлено, что структура карт латеральных сил микромасштабных участков поверхности эритроцитов различается для дискоцитов-нормоцитов и эхиноцитов 1. Так, имеются различия зависимостей D_F от коэффициента масштабирования по оси Z ($D_F = f(t)$) и спектральных плотностей $R_m'(\omega)$ АСМ-изображений. При малых значениях коэффициента t D_F карт латеральных сил участков поверхности дискоцитов-нормоцитов выше, чем у карт латеральных сил эхиноцитов, а при больших значениях этого параметра D_F карт эхиноцитов больше, чем у дискоцитов-нормоцитов (таблица 3). Этот факт свидетельствует о том, что для дискоцитов-нормоцитов характерны мелкомасштабные особенности структуры цитоскелета в сравнении с эхиноцитами-дискоцитами, для которых типичны более крупномасштабные структурные элементы. Этот факт подтверждают и дан-

ные анализа спектральных плотностей. Кроме того, сравнительное изучение фрактальных свойств структуры цитоскелета эритроцитов с помощью АСМ-изображений (карт латеральных сил) разного размера от $0,7 \times 0,7$ мкм до 5×5 мкм показало, что для дискоцитарного цита норма цита форма зависимости $D_F = f(t)$ зависит от масштаба (размера скана) в меньшей степени, чем это имеет место для образцов эхиноцитов, что также можно рассматривать как аргумент в пользу более мелкомасштабной структуры их цитоскелета.

Таблица 3 — Фрактальная размерность D_F карт латеральных сил участков поверхности эритроцитов при различных значениях коэффициента масштабирования по оси Z (t)

Клетки	$t = 0,0498$	$t = 0,3679$	$t = 2,7183$	$t = 7,3891$
Дискоциты-нормоциты	$2,06 \pm 0,03$	$2,06 \pm 0,02$	$2,11 \pm 0,04$	$2,09 \pm 0,05$
Эхиноциты	$2,02 \pm 0,03$	$2,03 \pm 0,03$	$2,13 \pm 0,03$	$2,12 \pm 0,04$

Заключение

Кровь пациентов-детей с наследственным сфероцитозом содержит большое количество сфероцитов и начальных форм кренированных клеток-эхиноцитов с морфологическим индексом 1 и 2. С помощью АСМ выявлено различие пространственного распределения механических свойств по поверхности эхиноцитов с морфологическим индексом 1 в сравнении с распределением механических свойств, характерных для дискоцитов-нормоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патологическая гемолитическая анемия у детей: учеб.-метод. пособие / Н. Н. Климович [и др.]. — Минск: БелМАПО, 2012. — 79 с.
2. Новикова, И. А. Клиническая и лабораторная гематология: учеб. пособие / И. А. Новикова, С. А. Ходулева. — Минск: Выш. шк., 2013. — 446 с.
3. Changes in red blood cell membrane structure in G6PD deficiency: An atomic force microscopy study / J. Tang [et al.] // Clin. Chim. Acta. — 2015. — Vol. 444. — P. 264–270.
4. Li, Y. Topological structures and membrane nanostructures of erythrocytes after splenectomy in hereditary spherocytosis patients via atomic force microscopy / Y. Li, L. Lu, J. Li // Cell Biochem. Biophys. — 2016. — Vol. 74. — P. 365–371.
5. Starodubtseva, M. N. Novel fractal characteristic of atomic force microscopy images / M. N. Starodubtseva, I. E. Starodubtsev, E. G. Starodubtsev // Micron. — 2017. — Vol. 96. — P. 96–102.
6. Elastic energies and morphologies of the first stages of the discoechinocyte transition / G. R. L'azaro [et al.] // Soft Matter. — 2013. — Vol. 9. — P. 6430–6441.
7. Eber, S. Hereditary spherocytosis - defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer / S. Eber, S. E. Lux // Semin. Hematol. — 2004. — Vol. 41. — P. 118–141.

УДК 796.332(476)

СТРАТЕГИЯ РАЗВИТИЯ ФУТБОЛА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Субботин С. В., Гаврилович Н. Н., Василец А. Н.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Стратегия развития футбола в Республике Беларусь до 2020 г., обозначенная «Видение 2020» (Стратегия) призвана определить миссию, главные приоритеты и основные цели развития футбола в РБ, а также задачи, решение которых позволит их достичь. В ней проводится краткий итог деятельности Ассоциации Белорусской Федерации Футбола (АБФФ) за последние годы, анализируется текущее положение дел, дается оценка отношений между всеми участниками футбольной среды, определяются цели, к которым надо стремиться в различных направлениях деятельности [1].

Цель

Изучение информации предыдущих лет для реализации Стратегии развития футбола в Республике Беларусь.