

Таблица 2 — Системная терапия синдрома Свита

Выбор	Препарат	Доза
Первый	Преднизолон	1 мг/кг/сут. однократно per os по утрам. На протяжении 4–6 недель дозу постепенно снижают до 10 мг/сутки; однако некоторым пациентам требуется 2–3 месяца лечения.
	Метилпреднизолона сукцинат	Внутривенно (до 1000 мг/сутки) в течение одного часа ежедневно на протяжении 3–5 дней. Затем следует прием per os с постепенным снижением дозы кортикостероида или другого иммуносупрессивного препарата.
	Иодид калия	Назначают per os в форме таблеток 3 раза в день (ежедневная доза 900 мг), или в форме раствора йодида калия (1 г/мл воды), или раствор Люголя, начиная с дозы 3 капли три раза в день и увеличивая дозу на одну каплю три раза в день; окончательная доза составляет от 21 капли/день (1050 мг) до 30 капель/день (1500 мг)
Второй	Индометацин	Назначают per os в суточной дозе 150 мг в течение 7 дней, а затем 100 мг в течение 14 дней.
	Циклоспорин	Начальная доза per os составляет от 2 мг/кг/сутки до 4 мг/кг/сутки.
	Дапсон	Начальная доза per os составляет от 100 мг/кг/сутки до 200 мг/кг/сутки

Симптомы и очаги у некоторых больных с классической формой заболевания разрешаются без какого-либо лечения. У пациентов с синдромом Свита на фоне онкологического заболевания успешное лечение рака иногда приводит к разрешению дерматоза [2]. Подобным же образом отмена провоцирующего лекарства у пациентов с лекарственным синдромом Свита обычно влечет за собой разрешение синдрома [9].

Синдром Свита может рецидивировать как после спонтанной ремиссии, так и после клинического разрешения, достигнутого в результате проведенной терапии. Рецидивы синдрома Свита чаще встречаются у онкологических пациентов. Повторное возникновение дерматоза может указывать на паранеопластический синдром.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Адашкевич, В. П. Дерматозы эозинофильные и нейтрофильные / В. П. Адашкевич, О. П. Мядлец. — М.: Медицинская книга, Н. Новгород: Из-во НГМА, 2001. — С. 224–226.
2. Дерматология Фицпатрика в клинической практике / В. Клаус [и др.]. — М.: БИНОМ: Из-во Панфилова, 2012. — Т. 1. — С. 314–321.
3. Cohen, P. R. Sweet's syndrome revisited. A review of disease concepts / P. R. Cohen, R. Kurzrock // *Int J Dermatol.* — 2003. — Vol. 42. — P. 761.
4. Cohen, P. R. Sweet's syndrome revisited. A review of disease concepts / P. R. Cohen, R. Kurzrock // *Int J Dermatol.* — 2003. — Vol. 42. — P. 763.
5. Cohen, P. R. Neutrophilic dermatoses occurring in oncology patients. / P. R. Cohen // *Int J Dermatol.* — 2007. — Vol. 46. — P. 106.
6. Cohen, P. R. Sweet's syndrome: A review of current treatment options / P. R. Cohen, R. Kurzrock // *Am J Clin Dermatol.* — 2002. — Vol. 106. — P. 117.
7. Drug-induced Sweet's syndrome / M. Saez [et al.] // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* — 2004. — Vol. 18. — P. 233.
8. Адашкевич, В. П. Диагностические индексы в дерматологии / В. П. Адашкевич. — М.: Медицинская книга, 2004. — С. 222.
9. Sweet, R. An acute febrile neutrophilic dermatosis / R. Sweet // *Br J Dermatol.* — 1964. — Vol. 10, № 76. — P. 349.

Поступила 24.04.2015

## НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.155.1-076

### АСМ-ДИАГНОСТИКА ПАТОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ НА ОСНОВЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКОГО ОБРАЗА КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

М. Н. Стародубцева, Е. В. Воропаев, Д. Р. Петренёв, В. М. Мицура, Н. И. Егоренков

Гомельский государственный медицинский университет

С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) можно создавать как геометрический образ поверхности объекта, так и ее физико-механический образ, составленный из набора АСМ-параметров. Изучено изменение физико-механического АСМ-образа поверхности эритроцитов при инфекционных заболеваниях верхних дыхательных путей и циррозе печени, а также при старении эритроцитов *in vitro*. АСМ-образы поверхности клеток построены на основе данных, полученных при ее сканировании в контактном режиме, и включают

фрактальную размерность и статистические параметры распределения по клеточной поверхности латеральных сил (сил трения скольжения между острием АСМ-зонда и поверхностью образца). Полученные данные показывают эффективность использования физико-механического образа поверхности эритроцитов для раннего выявления изменения их функций и прогноза возможных нарушений в системе кровообращения.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, физико-механические свойства поверхности клетки, патология клеток крови, эритроциты.

## AFM DIAGNOSTICS OF ERYTHROCYTE PATHOLOGY BASED ON THE PHYSICAL AND MECHANICAL IMAGE OF CELL SURFACE

*M. N. Starodubtseva, E. V. Voropayev, D. R. Petrenyov, V. M. Mitsura, N. I. Yegorenkov*

**Gomel State Medical University**

Atomic force microscopy (AFM) makes it possible to create not only the geometrical image of the surface of an object but also its physical and mechanical image composed from a number of AFM parameters. Changes of the physical and mechanical AFM image of the erythrocyte surface in patients with infectious respiratory diseases and hepatocirrhosis as well as in the process of erythrocyte ageing have been studied *in vitro*. The AFM images are based on data obtained during its scanning in the contact mode and include fractal dimension and statistical parameters for the cell surface distribution of lateral forces along the cell surface (sliding friction forces between the point of the AFM probe and the cell surface). The obtained data have shown the effectiveness of the application of the physical and mechanical image of erythrocyte surface in the early detection of their function changes and prognosis of possible circulatory disturbances.

**Key words:** atomic force microscopy, physical and mechanical properties of cell surface, blood cell pathology, erythrocytes.

### **Введение**

Переход клетки в патологическое состояние сопровождается изменением многих ее свойств, включая структурные и физико-механические. Атомно-силовая (нанозондовая) микроскопия (АСМ) позволяет изучать структурные и физико-механические свойства клетки в целом и участков ее поверхности, а точнее поверхностного слоя. Создав на основе АСМ-данных физико-механический образ клетки, в который входит совокупность параметров, характеризующих физико-механические свойства клеточной поверхности, дополнив его геометрическим ее образом, можно проводить диагностику состояния клетки, установление нормы и патологии клетки.

Физико-механический образ клетки может быть создан с использованием различных методов АСМ. Так, при сканировании участков поверхности отдельных клеток в контактном режиме получают карты латеральных (боковых) сил между острием АСМ-зонда и исследуемым образцом, на основе которых можно рассчитывать параметры сил трения скольжения на микроучастках его поверхности, в том числе с исключением вклада ее рельефа. При использовании полуконтактного режима сканирования (прерывистого контакта) получают карты разности фаз механических колебаний АСМ-зонда при его взаимодействии с поверхностью, дающие информацию об упругих свойствах микроучастков поверхности клетки. При контактном режиме сканирования шероховатой (неплоской) поверхности, включая поверхность клетки, для характеристики ее микроучастков может быть

использована такая количественная характеристика, как фрактальная размерность. Вторым основным режимом АСМ-тестирования механических свойств клеточной поверхности является силовая спектроскопия. Она может проводиться в статическом и динамическом режимах. С помощью силовой спектроскопии оценивают локальные (относящиеся к микро- и нанообластям поверхности) модули упругости и силы неспецифической адгезии (АСМ-зонда и поверхности клетки). Таким образом, механический образ поверхности клетки может включать широкий набор параметров ее физико-механических свойств. Эти параметры по-разному характеризуют физико-механические свойства клеточной поверхности и не являются взаимозаменяемыми. В эксперименте часто достаточно использовать не весь набор этих параметров, а лишь часть их. Все эти параметры отражают способность материала клеточной поверхности отвечать на внешнее механическое воздействие, характеризуют ее механический отклик, поэтому их значения зависят как от состава и структуры материала, так и условий осуществления тестирующего механического воздействия. При этом основной вклад в механические свойства поверхности клетки, а точнее ее поверхностного слоя, вносит кортикальный цитоскелет как опорный элемент клетки [1, 2].

Для использования методов АСМ с целью диагностики патологии клеток необходимо, в первую очередь, стандартизировать условия проведения тестирования механических свойств клеточной поверхности. Стандартизировать необходимо способ подготовки клеток для АСМ-

диагностики и условия проведения АСМ-эксперимента. К основным требованиям относится поддержание температуры и влажности воздуха в помещении. Если сканирование ведется в контактном режиме, то контролировать температуру и влажность воздуха необходимо в пространстве между острием АСМ-зонда и клеточной поверхностью. Нагрузка на консоль с зондом, тип АСМ-зонда, скорость сканирования или индентирования (например, в силовой спектроскопии) также важны для интерпретации результатов анализа АСМ-данных и должны быть одинаковыми для всех исследуемых клеточных препаратов.

При АСМ тестируются, как правило, свойства отдельных клеток. При анализе популяции клеток вначале используют световую микроскопию с целью выявления видимых аномалий структур клеток, затем клетки, характерные для той или иной патологии, исследуют методами АСМ.

#### **Цель работы**

Установить различия физико-механических образов поверхности эритроцитов для пациентов с инфекционными заболеваниями верхних дыхательных путей, циррозом печени и здоровых добровольцев, а также изменения этого образа при старении эритроцитов *in vitro*.

#### **Материалы и методы**

Исследования эритроцитов лиц с инфекционными заболеваниями верхних дыхательных путей проводили на 20 образцах, полученных из венозной крови пациентов Гомельской областной инфекционной клинической больницы (опытная группа — Г2). При этом 12 пациентов были с диагнозом «Бронхит», 6 — «Пневмония» и 2 — «Респираторно-синцитиальная (РС)-инфекция». Среди 20 обследованных было 14 женщин и 6 мужчин (средний возраст —  $37,6 \pm 10,6$  года). Контрольная группа (Г1) была сформирована из образцов крови 7 студентов 6 курса Гомельского государственного медицинского университета без признаков респираторных заболеваний. В исследовании эритроцитов лиц с циррозом печени опытная группа (Ц) включала образцы, полученные из венозной крови 15 пациентов (средний возраст —  $53 \pm 4$  года) Гомельской городской клинической больницы № 3. Контрольная выборка была сформирована из образцов, полученных из венозной крови 15 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) без патологии печени (средний возраст —  $57 \pm 4$  года). В исследовании старения эритроцитов *in vitro* эритроцитарная масса, приготовленная из венозной крови донора на Гомельской областной станции переливания крови, хранилась в течение 7 недель в стерильных условиях при температуре  $+4$  °С. Образцы клеток для АСМ-исследования готовили на 7, 21, 28, 36 и 48-й дни хранения эритроцитарной массы. Парал-

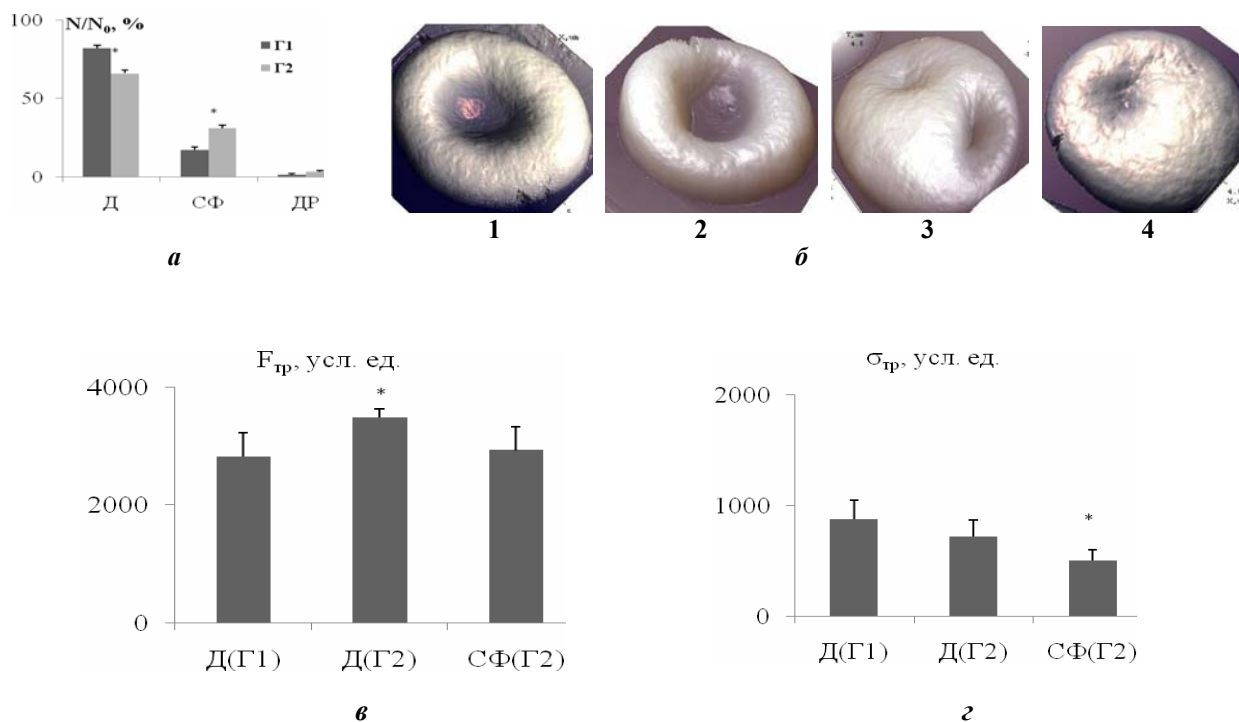
лельно с АСМ-оценкой физико-механических свойств эритроцитов был проведен анализ их устойчивости к осмотическому гемолизу. Относительную концентрацию гемолизированных эритроцитов в гипотонических солевых растворах определяли как отношение оптической плотности ( $\lambda = 680$  нм) исследуемой суспензией эритроцитов в гипотонических солевых растворах (20 минут инкубации) к оптической плотности суспензией эритроцитов в изотоническом (153 мМ) растворе NaCl. При этом для АСМ-исследований был использован стандартный метод подготовки эритроцитов венозной крови, включающий обработку крови 1 % глутаровым альдегидом в течение 1 часа, отмывку клеток буферно-солевыми средами и дистиллированной водой, нанесение на предметные стекла и высушивание клеток при комнатной температуре. АСМ-исследования клеток зондами CSC-38 (уровень В) (MicroMash, Эстония) в контактном режиме сканирования проводили на атомно-силовом микроскопе НТ-206 (Микротестмашины, Беларусь). С использованием программы SurfaceXplo3e (Микротестмашины, Беларусь) рассчитывали фрактальную размерность ( $D_F$ ), среднюю силу трения ( $F_{тр}$ ) и среднее квадратическое отклонение для сил трения ( $\sigma_{тр}$ ) для участков поверхности клеток размером  $1,5 \times 1,5$  мкм. Данные представлены в виде средних значений и верхних границ 95 % доверительных интервалов. Сравнение выборочных характеристик проведено с использованием t-критерия Стьюдента или критерия Фишера. На рисунках знак «\*» соответствует  $p < 0,05$  в сравнении с параметрами контрольной выборки.

#### **Результаты и их обсуждение**

Физико-механический образ поверхности эритроцитов при инфекционных заболеваниях верхних дыхательных путей. По данным световой микроскопии в крови пациентов с инфекциями верхних дыхательных путей выявлен пойкилоцитоз эритроцитов: в крови уменьшается процентное содержание дискоцитов-нормоцитов за счет увеличения процентного содержания, в основном, сфероцитов и «спущенных мячей» (рисунок 1, а). Трехмерные АСМ-изображения основных форм эритроцитов представлены на рисунке 1, б. При анализе физико-механических свойств поверхности эритроцитов пациентов с инфекционными заболеваниями обнаружены изменения параметров сил трения ( $F_{тр}$ ,  $\sigma_{тр}$ ) как для нормоцитов-дискоцитов, морфологически идентичных нормоцитам контрольной группы, так и эритроцитов, трансформированных в сфероциты (рисунок 1, в и г). Анализ физико-механического образа поверхности эритроцитов и их морфологии показал существование значительной неоднородности в популяции эритроцитов пациентов с инфекциями. Эрит-

роциты без видимых признаков изменения формы (дискоциты-нормоциты) становятся менее жесткими ( $F_{тр}$  увеличивается), а трансформи-

руемые в сфероциты-дискоциты — более жесткими ( $\sigma_{тр}$  уменьшается) в сравнении с нормоцитами-дискоцитами крови здоровых людей.



**Рисунок 1** — Изменение морфологии и физико-механических свойств эритроцитов при инфекционном заболевании верхних дыхательных путей:

**а** — Процентное соотношение форм эритроцитов в крови контрольной группы (Г1) и пациентов с инфекциями (группа Г2); Д — дискоциты; СФ — сфероциты и «спущенные мячи»; ДР — другие формы эритроцитов, среди которых – эхиноциты, стоматоциты, дегенеративные формы; **б** — АСМ-изображения топографии дискоцитов группы Г1 (1) и группы Г2 (2), сфероцитов группы Г2: «спущенногомьяча» (3) и сфероцита (4). Размеры области сканирования — 1,5 мкм × 1,5 мкм (256 пикселей × 256 пикселей); **в, г** — Параметры сил трения между острием АСМ-зонда и поверхностью эритроцитов:  $F_{тр}$  (в) и  $\sigma_{тр}$  (г). n = 10 (Г1), n = 15–25 (Г2)

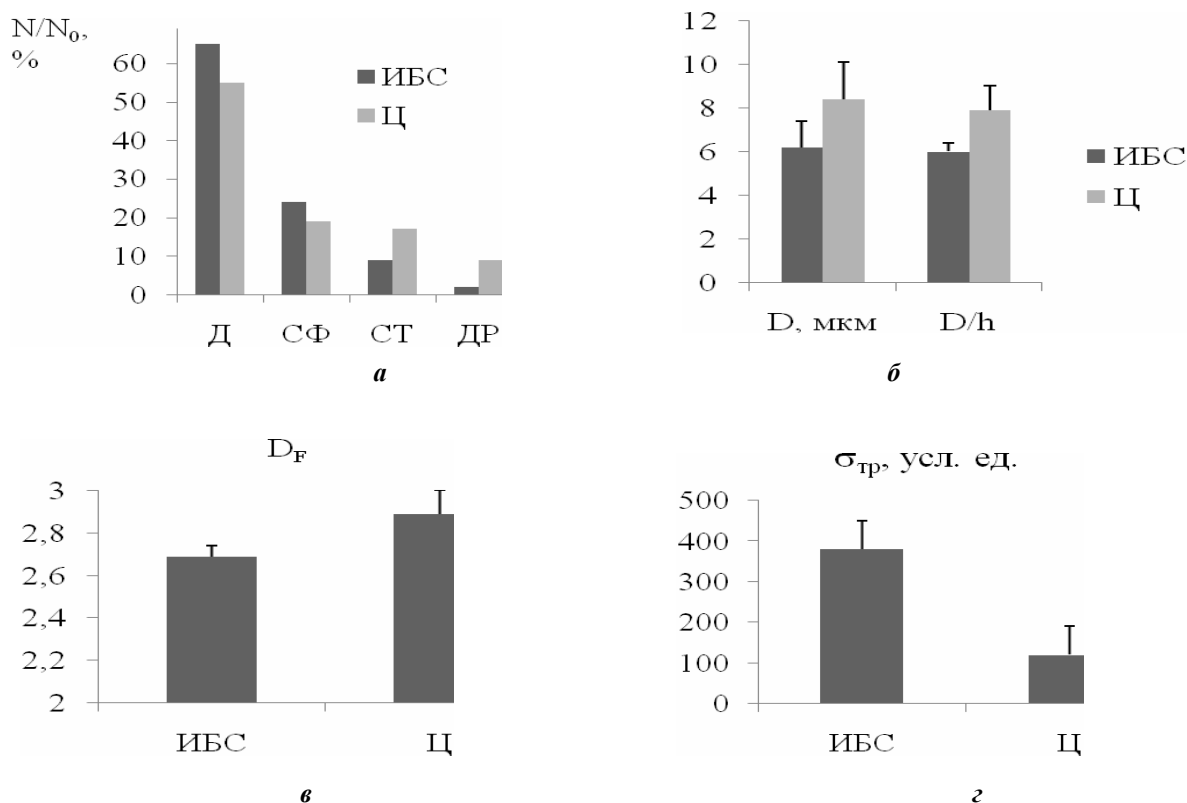
Физико-механический образ поверхности эритроцитов при циррозе печени. По данным общего анализа крови выявлено повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) ( $31,0 \pm 14,4$  мм/ч) для пациентов с циррозом печени в сравнении с СОЭ пациентов с ИБС ( $1,0 \pm 0,6$  мм/ч,  $p < 0,01$ ). В сравнении с пациентами с ИБС у пациентов с циррозом печени уменьшено относительное процентное содержание дискоцитов-нормоцитов и сфероцитов за счет увеличения процентного содержания стоматоцитов и других дегенеративных форм эритроцитов (рисунок 2, а). В результате АСМ-исследования в популяции эритроцитов лиц с циррозом печени обнаружены макроциты, стоматоциты и овалоциты, диаметр и отношение диаметра к высоте которых были больше соответствующих величин для эритроцитов больных ИБС. Как известно из литературных источников, для пациентов с циррозом печени в связи с изменениями в составе и структуре мембран эритроцитов характерен анизоцитоз с появлением «тонких» макроцитов [3]. Изменения, обнару-

женные в пространственном распределении латеральных сил (рисунок 2, в) и значений среднеквадратического отклонения для сил трения (рисунок 2, г) участков поверхности аномальных форм эритроцитов в сравнении с дискоцитами-нормоцитами, свидетельствуют об увеличении жесткости и уменьшении деформируемости аномальных форм эритроцитов пациентов с циррозом печени.

Физико-механический образ эритроцитов при их старении in vitro. Изменение механических свойств и морфологии клеток при хранении крови является одним из важных факторов развития посттрансфузионных осложнений. Эти изменения происходят в результате ряда химических процессов, вызванных нарушениями нормальных для форменных элементов крови условий функционирования (физиологических условий), обусловленными изъятием крови и изоляцией ее от организма и включающими истощение эритроцитов по АТФ, перекисное окисление липидов, потерю асимметрии липидного бислоя и потерю части фосфолипидов

в результате везикуляции, реорганизацию мембранного скелета и др. Например, изменение механических свойств эритроцитов включает изменение их деформируемости (оценивается по изменению отношения площади поверхности к объему клетки при механическом воздействии или модуля упругости мембраны), вязкости цитоплазмы, осмотической резистент-

ности клеток и способности их к агрегации [5]. Изменение морфологии эритроцитов включает трансформацию нормоцитов-дискоцитов (легко деформируемой формы эритроцитов) в эхиноциты с морфологическим индексом I (слабо деформируемую форму эритроцитов) или в сфероэхиноциты (форму эритроцитов, практически не способную к деформациям в кровотоке) [6–8].

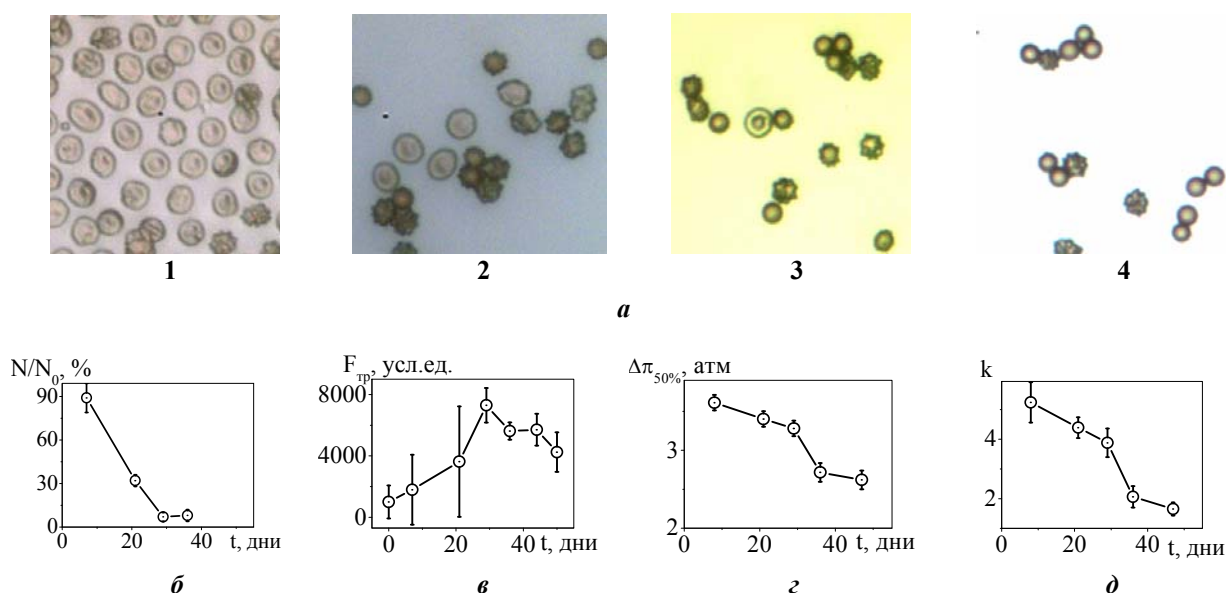


**Рисунок 2 — Изменение морфологии и физико-механических свойств эритроцитов при циррозе печени:**

**а** — Процентное соотношение форм эритроцитов в крови контрольной группы (ИБС) и группы пациентов с циррозом печени (Ц); Д — дискоциты; СФ — сфероциты; СТ — стоматоциты; ДР — другие формы эритроцитов. **б**) Диаметр (D) и отношение диаметра к высоте (D/h) клеток двух групп по АСМ-данным; **в, г** — Параметры сил трения между острием АСМ-зонда и поверхностью фиксированных 1 % глутаровым альдегидом эритроцитов:  $D_F$  (**в**) и  $\sigma_{тр}$  (**г**)

С помощью световой микроскопии выявлено уменьшение процентного содержания дискоцитов-нормоцитов и обратимо изменяемых форм (эхиноциты I) в популяции клеток с увеличением времени хранения эритроцитарной массы (рисунок 3, а, б). Существенные изменения параметров осмотической резистентности ( $\Delta\pi_{50\%}$  и  $k$  при аппроксимировании кривых осмотического гемолиза логистической функцией  $N/N_0 = a / (1 + \exp(-k * (x - \Delta\pi_{50\%})))$ ) наблюдались во временном интервале, когда практически все обратимые формы эритроцитов трансформировались в необратимые (после 28 дней хранения) (рисунок 3, г, д). Значительные же изменения физико-механических свойств кле-

ток (увеличение  $F_{тр}$ ) зафиксированы до этого момента (рисунок 3, в), а характер этих изменений подобен тому, который наблюдается для эритроцитов, подвергшихся действию окислительного агента (например, пероксинитрита). После 30 дней хранения практически все эритроциты необратимо трансформировались в аномальные формы с одновременным уменьшением характеризующих их сил трения (рисунок 3, в). Таким образом, при хранении эритроцитарной массы (старении клеток *in vitro* в течение 21 дня) имеет место изменение физико-механического образа поверхности клеток, сопровождающееся изменением морфологии клеток и их устойчивости к осмотическому стрессу.



**Рисунок 3 — Изменение морфологии и физико-механических свойств эритроцитов при старении эритроцитов *in vitro*:**  
**а** — Изображения эритроцитов, полученные с помощью световой микроскопии (×800) на 7 (1), 21 (2), 28 (3) и 36-е (4) сутки хранения суспензии *in vitro*;  
**б** — Относительное количество ( $N/N_0$ ) нормоцитов и обратимых форм эхиноцитов (эхиноциты I) в суспензии;  
**в** — Значение силы трения ( $F_{тр}$ ) между острием АСМ-зонда и поверхностью эритроцитов в зависимости от срока хранения суспензии;  
**г, д** — Параметры осмотического гемолиза:  $\Delta\pi_{50\%}$  (г) и  $k$  (д) для суспензии эритроцитов. Осмотические кривые аппроксимированы логистической функцией  $N/N_0 = a / (1 + \exp(-k \cdot (x - \Delta\pi_{50\%})))$

**Заключение**

На основе результатов АСМ-исследований изменений в структурно-механических свойствах поверхностного слоя эритроцитов предложено использовать формируемый на основе АСМ-данных физико-механический образ поверхности клеток для диагностики их патологии. Продемонстрирована возможность использования физико-механического образа поверхности эритроцитов для раннего выявления изменения их функций и прогноза возможных нарушений в системе кровообращения.

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований РБ «Медицина и фармация».

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1 Atomic force microscopy probing of cell elasticity // T. G. Kuznetsova [et al.] // Micron. — 2007. — Vol. 38, № 8. — P. 824–833.

2. Starodubtseva, M. N. Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy / M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, I. A. Nikitina // Micron. — 2012. — Vol. 43, № 12. — P. 1232–1238.  
 3. Variations of erythrocyte morphology in different pathologies / V. Turchetti [et al.] // Clin. Hemorheol. Microcircul. — 1997. — Vol. 17. — P. 209–215.  
 4. Roback, J. D. Vascular effects of the red blood cell storage lesion / J. D. Roback // Hematology. — 2011. — Vol. 20. — P. 475–4791  
 5. Berdyayeva, T. K. Human epithelial cells increase their rigidity with ageing *in vitro*: direct measurements / T. K. Berdyayeva, C. D. Woodworth, I. Sokolov // Phys. Med. Biol. — 2005. — Vol. 50, № 1. — P. 81–92.  
 6. Bessis, M. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale / M. Bessis // Nouv. Rev. Fr. Hemat. — 1972. — Vol. 12, № 6. — P. 721–746.  
 7. Kor, D. J. Red blood cell storage lesion / D. J. Kor, C. M. Van Buskirk, O. Gajic // Bosnian J. Basic Med. Sciences. — 2009. — Vol. 9, Suppl. 1. — P. 21–27.  
 8. Chaudhary, R. Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage / R. Chaudhary, R. Katharia // Blood Transfus. — 2012. — Vol. 10. — P. 59–62.

Поступила 05.05.2015