

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ СИСТЕМЫ ЭРИТРОНА В  
УСЛОВИЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ  
ЛИМФОИДНОГО И МИЕЛОИДНОГО РОСТКОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки 06.03.01 Биология  
очной формы обучения, группы 07001418  
Селиверстова Евгения Сергеевича

Научный руководитель  
д.б.н., профессор  
Скоркина М.Ю.

БЕЛГОРОД 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>8</b>
1.1. Морфофункциональная характеристика системы эритрона.....	8
1.2. Современная модель эритропоэза .....	12
1.3. Основы регуляции эритропоэза .....	25
1.3.1. Участие эритропоэтина в регуляции эритропоэза.....	26
1.3.2. Ауторегуляция в системе эритропоэза .....	29
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>33</b>
2.1. Организация эксперимента .....	33
2.2. Дифференциальный анализ эритроидного ростка гемопоэза.....	34
2.2.1. Подсчет числа эритроцитов.....	34
2.2.2. Расчет показателей эритроцитарного баланса.....	34
2.3. Методика изучения рельефа поверхности мембран ретикулоцитов методом атомно-силовой микроскопии.....	35
2.4. Методика измерения объёма и площади поверхности ретикулоцитов..	38
2.5. Методика оценки упруго-эластических свойств ретикулоцитов .....	39
2.6. Методы статистической обработки экспериментальных данных .....	40
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>41</b>
3.1. Показатели эритроцитокинетики и морфология ретикулоцитов в условиях физиологической регенерации системы крови.....	41
3.2. Показатели эритроцитокинетики при развитии острого миелобластного лейкоза в системе крови.....	43
3.3. Показатели эритроцитокинетики при развитии острого лимфобластного лейкоза в системе крови.....	45
3.4. Неэффективный эритропоэз.....	46
3.5. Морфометрия и упруго-эластические свойства ретикулоцитов при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови	48
<b>Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>51</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>54</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>55</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренкортикотропный гормон

АСМ – атомно-силовой микроскоп

АТФ – аденозинтрифосфат

БОЕ-Э – бурстобразующая единица эритроидного ряда

ГИФ-1 – гипоксией индуцируемый фактор-1

ГО-1 – гемоксигеназа-1

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ-ГЭ – колониеобразующая единица гранулоцитарного и эритроцитарного ростка

КОЕ-Э – колониеобразующая единица эритроидного ряда

МЕ – международная единица

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелобластный лейкоз

пг – пикограмм

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКК – стволовая кроветворная клетка

ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

ЭО – эритробластический островок

Да – дальтон

Нб – гемоглобин

ICAM-4 – молекула межклеточной адгезии-4

IgG – иммуноглобулин класса G

kD – килодальтон

НАВ – природные антитела человека

VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток-1

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Развитие патологических состояний в организме сопровождается рядом изменений, направленных на реализацию механизмов компенсации отклонения гомеостатических параметров, которые можно рассматривать как маркеры предпатологии [Черний, Нестеренко, 2007; Маркелова и др., 2008; Булгакова, 2009]. Одной из наиболее информативных систем является система красной крови, которая реагирует на изменения параметров внутренней среды, в том числе при развитии злокачественной пролиферации ростков кроветворения [Алгоритм исследования..., 2007; Система эритронов..., 2017; Dugai, Zhdanov, 2014]. Особая роль в оценке патологических сдвигов в организме принадлежит эритроцитам, метаболический статус которых отражает редокс-потенциал организма в целом. Система красной крови характеризуется высокой надежностью функционирования (за счет регенерации однотипных клеток) и согласованностью реакций как единого целого на возмущающие воздействия. Уровень функциональной активности эритроцитов может резко повышаться при отклонениях физиологических функций от оптимального для метаболизма уровня. В связи с этим достаточно актуальной является проблема изучения механизмов регенерации системы красной крови при развитии онкологических процессов в организме.

**Степень разработанности темы исследования.** В гематологической практике для оценки интенсивности эритропоэза проводят исследование количественных параметров и морфологии ретикулоцитов периферической крови [Болелова, 2006; Серебрякова и др., 2012; Корнеева и др., 2014]. Однако основным методом, используемым в подобных работах, является использование световой микроскопии или автоматического гемоцитометра для подсчёта относительного числа ретикулоцитов. К основным недостаткам данного метода можно отнести то, что он не позволяет проводить точную морфологическую оценку цитокинетических показателей. Это привело к то-

му, что созданная классификация ретикулоцитов не нашла применения на практике, а относительно кинетики периферического звена эритрона имеются единичные публикации, лишь констатирующие повышение или понижение числа предшественников эритроцитов при различных состояниях организма [Стуклов, 2004].

В связи с этим представляется актуальным анализ компенсаторно-приспособительных реакций системы эритрона при возникновении в системе крови процессов злокачественной пролиферации с использованием современных методов микроскопии, что позволило бы более точно оценить и обозначить изменения в морфологии и свойствах незрелых клеток эритроидного ряда.

**Цель** данного исследования – изучение механизмов физиологической регенерации системы эритрона в условиях злокачественной пролиферации лимфоидного и миелоидного ростков кроветворения.

Для достижения сформулированной цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

- 1) изучить цитокинетические показатели эритроцитарного баланса в норме;
- 2) проанализировать изменение цитокинетических показателей эритроцитарного баланса при развитии острого лимфобластного и острого миелобластного лейкозов;
- 3) выявить особенности морфологии ретикулоцитов в норме и при развитии острых пролиферативных заболеваний в системе крови;
- 4) проанализировать особенности рельефа поверхности ретикулоцитов в норме и при развитии злокачественных процессов в системе крови;
- 5) оценить упруго-эластические свойства ретикулоцитов доноров и больных острым миелобластным и острым лимфобластным лейкозами.

**Объект исследования** – периферическая кровь людей.

**Предмет исследования** – изучение механизмов регенерации системы крови в норме и при развитии злокачественных пролиферативных заболеваний в системе крови.

**Методы исследования.** В работе использованы методы исследования эритрокинетических параметров, включающие унифицированные методы приготовления и окраски мазков, а также подсчёта клеток в световом микроскопе на мазках и в камере Горяева. Модуль Юнга клеточной поверхности измерен на атомно-силовом микроскопе INTEGRA VITA (Зеленоград, 2009) в режиме силовой спектроскопии с использованием стандартного зондового датчика. Морфометрические параметры и рельеф поверхности ретикулоцитов изучен с использованием атомно-силового микроскопа в режимах контактного сканирования и регистрации сигнала рассогласования. Обработку полученных сканов и измерение морфометрических параметров ретикулоцитов осуществляли с использованием компьютерных программ Nova 1443 и Gwyddion. Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли методами вариационной статистики.

**Теоретическая и практическая значимость.** Выполненное исследование содержит новые сведения о морфологии и упруго-эластических свойствах клеточной поверхности ретикулоцитов различной степени зрелости в норме и при развитии лейкозов. Полученные данные дополняют современные представления фундаментальной физиологии об эритроцитарном балансе и показателях эритрокинетики в норме и при развитии злокачественных пролиферативных процессах в системе крови. Полученные результаты имеют важное практическое значение, связанное с изучением механизмов анемий, которые сопровождают течение онкологических заболеваний крови. Полученные данные необходимо учитывать в экспериментальной практике при разработке схем коррекции морфофункционального статуса эритроцитов у больных лейкозом.

**Структура работы.** Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Работа изложена на 64 страницах машинописного текста, включает 11 таблиц и 20 рисунков. Список литературы включает в себя 106 наименований, из которых

57 отечественных и 49 иностранных источников.

**По результатам исследования опубликовано 2 научные работы:**

1. Селиверстов Е. С. Исследование клеток крови с использованием технологий атомно-силовой микроскопии // I Молодёжная научно-практическая конференция с международным участием «Естественнонаучные, инженерные и экономические исследования в технике, промышленности, медицине и сельском хозяйстве». Белгород, 2017. С. 608–612.
2. Селиверстов Е. С., Беяева С. С. Цитокинетические показатели эритроцитарного баланса в норме и при развитии острых лимфо- и миелопролиферативных заболеваний в системе крови // Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: Тезисы докладов. Пущино, 2018. С. 364.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Морфофункциональная характеристика системы эритрона

Согласно определению, которое было дано Каслом [Castle, Minot, 1936], эритрон представляет собой всю массу эритроцитов, которые находятся в периферической крови, органах кроветворения и кровяных депо. Разрушение клеток преимущественно макрофагами в ходе эритрофагоцитоза и использование продуктов разрушения (в первую очередь – железа) на построение новых клеток обуславливает замкнутость системы эритрона. В условиях нормального протекания процессов гемопоеза число образующихся эритроцитов соответствует числу разрушившихся [Физиология..., 2003].

В соответствии с представлениями современной функциональной гематологии эритрон является совокупностью всех эритроидных клеток организма (ядерные костномозговые формы, ретикулоциты и гетерогенная система эритроцитов). Также в это понятие включают рецепторно-эффекторный комплекс, обеспечивающий поддержание стабильного состояния этой системы, и адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды [Липунова, Скоркина, 2004].

Эритроцит – это гемоглобин-содержащая клетка, циркулирующая в периферической крови, и осуществляющая доставку  $O_2$  от альвеол лёгких ко всем системам организма, и  $CO_2$  от них к лёгким. Форма двояковогнутого диска позволяет поддерживать высокий показатель отношения объёма к поверхности, что позволяет молекулам гемоглобина, находящимся внутри клетки, находиться близко к поверхности, и обеспечивает высокую скорость газообмена.

Мембраны эритроцитов отличаются высокой способностью к деформации, что позволяет клеткам в процессе циркуляции без потери функциональных свойств менять свою форму во время взаимодействия друг с другом и с эндотелием сосудов. Объём эритроцита, соответствующий модели тороида, может меняться без растяжения цитоплазматической мембраны, что



обуславливает его способность к деформируемости.

Соответственно, форма эритроцитов в некоторой степени обеспечивает стойкость клеток к осмотическому гемолизу, к аутогемолизу и к механическим повреждениям. Белки, входящие в состав цитоскелета и плазматической мембраны эритроцита (спектрин, аддуцин, анкирин, гликофорин) поддерживают его форму и обеспечивают механические свойства. При нарушениях в структуре этих белков в кровотоке обнаруживаются аномальные формы эритроцитов с укороченным сроком жизни [Леонова и др., 2017].

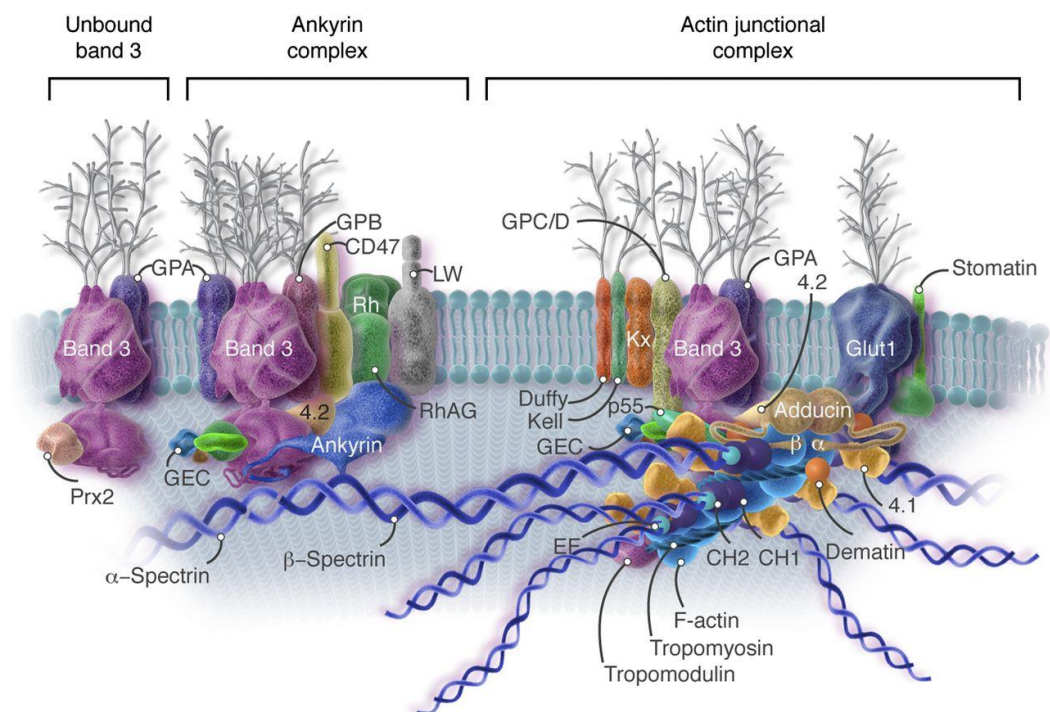


Рис. 1. Современная модель строения мембраны эритроцита [Samuel, 2016]

На сегодняшний день наиболее распространенной является жидкостно-мозаичная модель строения эритроцитарной мембраны, предложенная Сингером и Николсоном, согласно которой мембрана является подвижной мозаичной структурой, образованной двойным бислоем липидов [Sunger, Nicolson, 1972].

Цитоплазматическая мембрана эритроцитов представляет собой пластичную молекулярную мозаику из белков, липо- и гликопротеинов,

толщиной ~10 нм [Иванов, 2004].

Существует условное деление мембраны эритроцита на три слоя: наружный, средний и внутренний. Наружный слой образован гликопротеинами, и содержит комплексы концевых отделов антигенов. Поверхность мембраны эритроцита представляет собой сложную многомерную структуру, определяющуюся негомогенностью мембраны, её неоднородностью и широким спектром белкового состава [Строение и функция..., 2012].

Средний слой клеточной мембраны эритроцита образован липидным бислоем. Показана трансмембранная гетерогенность распределения различных структур в липидном матриксе, выражающаяся в том, что аминофосфолипиды расположены в цитоплазматической половине бислоя, а остальные фосфолипиды – в наружной половине бислоя. Липидные молекулы и плоскость цитоплазматической мембраны ориентированы перпендикулярно друг другу. В состав каждой молекулы фосфолипида входят два гидрофобных хвоста (остатки ненасыщенных или насыщенных жирных кислот) и гидрофильная полярная головка [Структурно-функциональная..., 2010].

Липидный состав эритроцита представлен фосфолипидами (36,3%), сфингомиелинами (29,6%), холестерином (22,2%) и гликолипидами (11,9%). Фосфатидилсерин находится во внутренней части бислоя, а фосфатидилхолин – в наружной. Холестерин, примыкая гидроксильными группами к полярным головкам фосфолипидов, является фактором, влияющим на текучесть и механическую прочность мембраны [Молекулярная биология..., 2008].

Слой мембраны, обращённый вовнутрь клетки, образован белками, связанными с гликолитическими ферментами, гемоглобином и формирующими цитоскелет белками [Трошкина и др., 2007].

Белки, входящие в состав цитоплазматической мембраны эритроцитов, принято подразделять на периферические (белки цитоскелета и

эритроцитарные ферменты) и интегральные (гликопротеины и протеолипиды), исходя из их способа расположения в мембране. Повышенное содержание неполярных остатков аминокислот за счёт сил гидрофобного взаимодействия с цепями фосфолипидного матрикса позволяет интегральным белкам удерживаться в мембране [Снегирева, 2004].

Периферические белки удерживаются в мембране нековалентными связями, и не вступают с липидами в гидрофобные взаимодействия. Большая их часть находится в составе цитоскелета, представляющего собой сеть, соединенную непосредственно с мембраной эритроцита через взаимодействие с интегральными белками. Также к периферическим белкам принято относить ряд эритроцитарных ферментов [Артюхов, 2000].

На цитоплазматической (внутренней) стороне клеточной мембраны находится большая часть белков, образующих сеть актиновых и промежуточных филаментов, поддерживающую нормальную форму эритроцита.

Микрофиламенты, представленные актином, состоят из двух спирально закрученных цепочек мономерного актина, ~7 нм диаметром, концентрирующихся у клеточной стенки. Промежуточные филаменты состоят из субъединиц диаметром 8–11 нм (гликофорин и спектрин). Ионные каналы в мембране эритроцитов также образуют белки гликофорин и белок полосы-3 [Shih, Rathfield, 2006].

Цитоскелет эритроцита состоит из элементарных ячеек, с центром в виде актинового протофиламента, соединенного со спектриновыми гетеродимерами. Эластичность эритроцитарной мембраны обеспечивается взаимодействием белков цитоскелета. Молекулы интегральных белков, находящихся в пределах одной актиновой ячейки, не могут ее покинуть за счет латеральной диффузии. При приближении молекул к границе ячейки ее цитоплазматическая часть вступает во взаимодействие со спектриновым филаментом, что препятствует переходу молекулы в соседнюю ячейку. Актин в виде олигомеров взаимодействует с N-концом молекулы спектрина и

белками полосы 4.1 и 4.9. Активация фосфорилирования спектрина приводит к упрочнению связей в комплексе спектрина с белками 4.1 и 4.9, что, в свою очередь, вызывает повышение стабильности мембраны [Кленова, Кленов, 2009].

Структура мембранного скелета поддерживается определенным соотношением АТФ и  $Ca^{2+}$ , так как протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование белков, являются кальцийзависимыми ферментами. Известно также, что поверхностная вязкость мембраны понижается при уменьшении содержания спектрина, сокращении мест связывания анкирина и нарушениях, вызванных изменениями белка полосы 4.1 [Молекулярные нарушения..., 2006].

Такие белки, как анкирин, белки полосы-2.1, -3, -4.1 находятся в поверхностном слое эритроцита. Многие из них представлены гликолипидами и гликопротеинами, чьи концевые олигосахаридные структуры, выступающие на поверхность, определяют групповые свойства крови [Кленова, Кленов, 2009].

## 1.2. Современная модель эритропоэза

Эритропоэз – процесс дифференциации плюрипотентной стволовой клетки по эритроидному пути развития, в ходе которого происходит её метаболическая, структурная и функциональная перестройка, заканчивающаяся формированием зрелого эритроцита (рис. 2) [Essentials of..., 2009].

Современная схема эритропоэза впервые была представлена в работах Черткова и Воробьева [Чертков, Воробьев, 1973]. Гемопоэз рассматривается как серия последовательных клеточных дифференцировок, происходящих первоначально из начальной единой стволовой клетки. В зависимости от вида образующихся конечных форменных элементов все клетки кроветворной ткани делятся «по вертикали» на кроветворные ростки [Воробьев и др., 1981].

Снижение уровня содержания  $O_2$  в тканях детектируется клетками почек, индуцирующими усиление эритропоэза за счёт секреции эритропоэтина – гормона, стимулирующего процесс кроветворения. Это вещество влияет на дифференциацию клеток-предшественниц красного кровяного ростка и их пролиферацию, вызывая тем самым ускорение эритропоэза в органах кроветворения, и увеличению числа эритроцитов, выходящих в кровь. У млекопитающих (в том числе и у человека) гемопоэз в целом, и эритропоэз в частности происходит в структурах красного костного мозга [Sherwood et al, 2005].

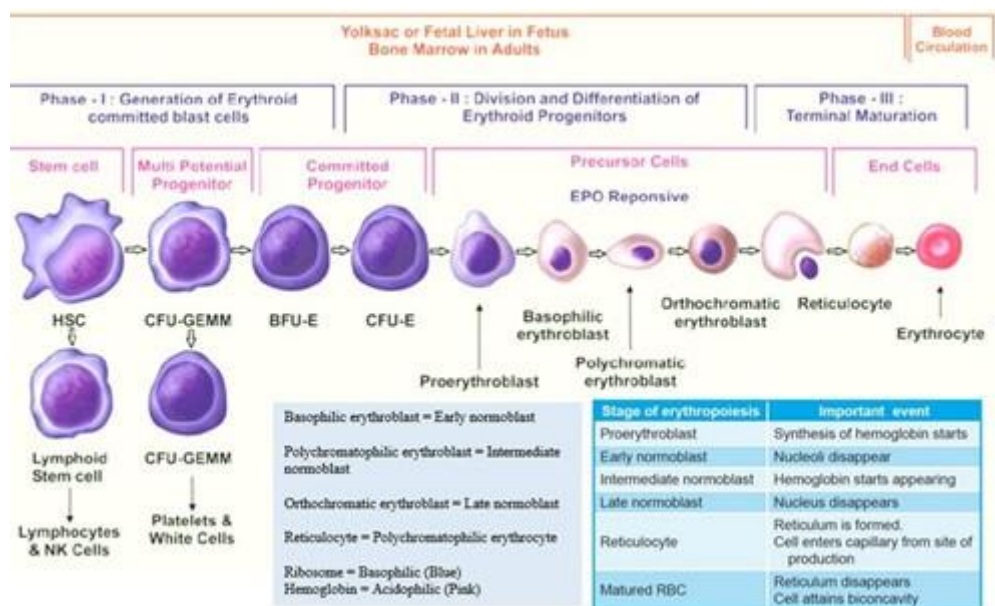


Рис. 2. Современная схема эритропоэза [The process...]

Эритропоэз у человека и других млекопитающих протекает в эритробластических островках, которые формируются после комплексации колониобразующих единиц эритроцитарного ростка или проэритробластов с макрофагами костного мозга, и являются морфофункциональными единицами эритрона [Рассохин, 1997]. Впервые эритробластические островки были описаны в работах Бессиса [Bessis, 1958].

Отмечены случаи, когда отдельные клетки эритроидного ряда не формировали эритробластических островков с макрофагами [Adherence to..., 2008] и контактировали только с другими эритроидными клетками, что

позволяет предположить, что эритроидные клетки способны к автономной регуляции эритропоэза, хоть и с более низкой эффективностью [Autonomous control..., 2013].

Образование и функционирование эритробластических островков (рис. 3) базируется на комплементарном и лиганд-рецепторном взаимодействии клеток моноцитарного ряда, эритроидных колониеобразующих клеток и клеток эритроидного ряда, при этом моноцитарные элементы играют активную структурообразующую роль, занимая центральное морфологическое и функциональное положение в островках [Захаров, Рассохин, 2002].

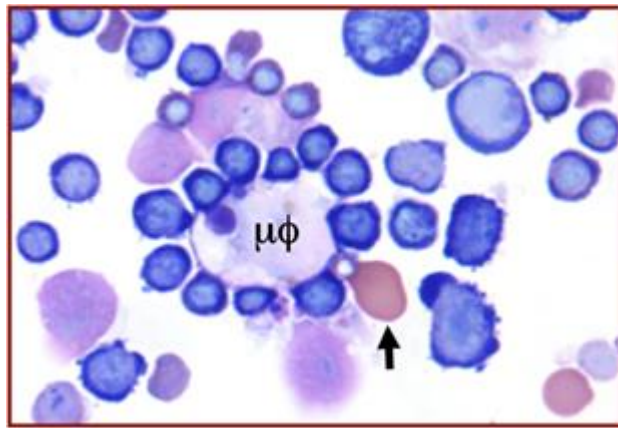


Рис. 3. Эритробластный островок с центральным макрофагом (μφ), к которому прикреплены ранние эритробласты. Стрелкой показан отделяющийся оксифильный эритробласт [Palis, 2017]

Согласно классификации, предложенной Ю.М. Захаровым, И.Ю. Мельниковым и А.Г. Рассохиним [Захаров, 2001], ЭО костного мозга человека и животных при морфологическом анализе можно разделить на 5 классов зрелости.

ЭО1 – островки первого класса зрелости: представляют собой новообразованные пролиферативные центры клеток эритробластического ряда. В их составе обнаруживаются проэритробласты, эритробласты и базофильные нормобласты, число потенциально делящихся клеток  $\leq 8$  штук.

ЭО2 – островки второго класса зрелости: в них находятся базофильные или ранние полихроматофильные нормобласты, число потенциально способных к делению клеток с ядрами от 9 до 16 штук.

ЭО3 – островки третьего класса зрелости: образованы промежуточными полихроматофильными нормобластами и поздними полихроматофильными и оксифильными нормоцитами (не способные к делению). Также в них присутствуют незрелые ретикулоциты. Общее число клеток с ядрами >16 штук.

ЭОинв – инволюцирующие островки, образованные преимущественно поздними полихроматофильными и оксифильными нормоцитами и незрелыми ретикулоцитами. Общее число клеток с ядрами <16 штук.

ЭОрек – реконструирующиеся островки: представлены скоплением клеток эритроидного ряда, находящихся на разных стадиях дифференцировки. К островкам этого типа присоединяются юные эритроидные клетки [Захаров, 2002].

Первым исключительно эритроидным предшественником является бурстобразующая единица (клетка) эритроцитарного ростка (БОЕ-Э). В результате её дифференцировки под влиянием высоких доз эритропоэтина (порядка 5 ед/мл) появляется колония эритроидных предшественников, состоящая из большого числа клеток. Более зрелой формой становится КОЕ-Э – колониобразующая единица, дающая меньшую по численности популяцию клеток. По сравнению с БОЕ-Э она реагирует на меньшие дозы эритропоэтина и превращается в эритробласты [Hemoglobin switching..., 2000].

Эритробласт – это крупного размера клетка с диаметром ~15–25 мкм, имеющая округлое ядро с ядерным хроматином (мелкозернистая субстанция), содержащее несколько крупных нуклеол. Цитоплазма отчётливо базофильна, в ряде случаев отмечается наличие нескольких выступов-«ушек». Вокруг ядра расположена перинуклеарная зона просветления. Синтез Hb начинается на этой стадии, после прохождения клеткой митоза его количество

сокращается вдвое, и восстанавливается до изначального показателя в ходе интерфазы [Гематология..., 2004].

Проэритробласт – отличается от эритробласта меньшим размером и отсутствием нуклеол в ядре. Ядро расположено в центре клетки и содержит 1–3 ядрышка. Структура хроматина ядра мелкосетчатая, образующая в пересечениях небольшие утолщения (зернистость). При окраске по Романовскому ядро окрашивается в тёмно-красно-фиолетовый цвет, цитоплазма интенсивно базофильная [Луговская, Почтарь, 2011].

Базофильный эритробласт – клетка размером 12–15 мкм. Ядро круглое, его хроматиновая структура гранулярного вида, ядрышки отсутствуют. Цитоплазма начинает насыщаться гемоглобином, который концентрируется в узкой каемке цитоплазмы вокруг ядра [Гольдберг, 2013].

Полихроматофильный эритробласт – эта стадия характеризуется тем, что данные клетки отличаются выраженным полиморфизмом из-за прохождения нескольких митотических циклов. Выделяют ранние, средние и поздние полихроматофильные эритробласты размером от 10 до 14 мкм. Ядро чаще всего располагается центрально, ядрышки отсутствуют. Грубые скопления хроматина окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет. По мере того, как количество гемоглобина в клетке начинает увеличиваться, цитоплазма начинает приобретать разные оттенки серо-сиреневого цвета. В конце этой стадии большая часть эритроидных клеток избавляется от ядра [Лабораторная диагностика..., 2009].

Оксифильный эритробласт – клетка, диаметром 7–9 мкм. Пикнотичное ядро диаметром 3–4 мкм на этой стадии выбрасывается из клетки. Зачастую это происходит при прохождении через временные поры в эндотелиальных клетках стенок синусоидов. Цитоплазма заполнена гемоглобином, что обуславливает её оксифильную окраску [Руководство по гистологии, 2011].

Оксифильный эритробласт разделяется на две дочерние структуры – ретикулоцит, к которому отходит большая часть цитоплазмы, и пиреноцит [Clearance of..., 2015], содержащий конденсированное ядро, заключенное в



тонкий цитоплазматический слой. Этот процесс называется ядерной экструзией, или энуклеацией. Он происходит во время взаимодействия эритробласта с макрофагом (рис. 4) в эритробластическом островке [Migliaccio, 2010]. Поскольку большинство пиреноцитов фагоцитируются макрофагами [Chasis, Mohandas, 2008], впервые их описали при изучении крови эмбрионов (содержащей ограниченное число макрофагов), где они появлялись после энуклеации примитивных эритробластов млекопитающих [Yolk sac-derived..., 2004].

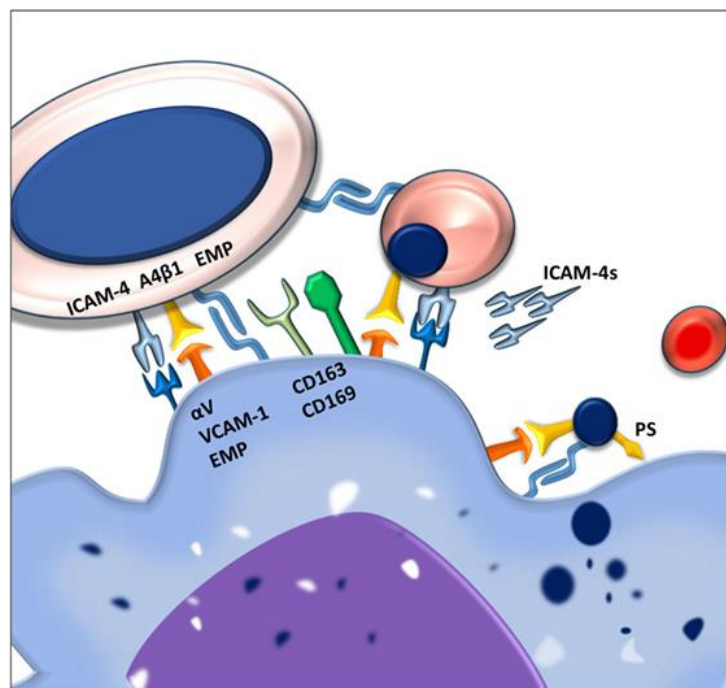


Рис. 4. Схема взаимодействия макрофага с оксифильным эритробластом [From the cradle..., 2017]

На мембране макрофагов экспрессируется несколько молекул адгезии, которые облегчают взаимодействие с эритроидными предшественниками разных стадий. Молекула межклеточной адгезии-4 (ICAM-4) и интегрин  $\alpha_4 \beta_1$  на эритробластах взаимодействует с интегрином  $\alpha_V \beta_1$  и молекулой адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1) на макрофаге. Постепенная потеря  $\alpha_4 \beta_1$  и EMP на эритробласте облегчает выход ретикулоцитов из эритробластического островка. На пиреноцитах эти молекулы адгезии сохраняются, что

способствует их фагоцитозу центральным макрофагом островка [Klei et al, 2017]. На стадии терминальной дифференцировки выдавливаемое эритробластом ядро смещает остатки гемоглобина в макрофаг при поглощении [Extruded erythroblast..., 1995]. В связи с этим считалось, что железо переносится в эритробласты из макрофага, однако более поздние исследования показали, что источником железа, необходимого для синтеза гема в костном мозге, являются старые эритроциты, гем которых катаболизируется цитозольной гемоксигеназой-1 макрофагов с выделением железа, которое потом вновь экспортируется из макрофагов в кровеносное русло с помощью ферропортина [Zhang, Enns, 2009]. Таким образом, активность макрофагов опосредована ферментом гемоксигеназой-1 (ГО-1), ответственным за катаболизм гема до железа, биливердина и монооксида углерода (СО) [Immenschuh et al, 2010].

Гемоксигеназа-1 отсутствует в эритробластах, синтезирующих гемоглобин, поэтому считается, что в деградации избыточного гемоглобина участвуют ферменты центрального макрофага. Из всех ферментативных продуктов распада только молекула СО может переноситься из макрофага в окружающие эритробласты через их плотно взаимодействующие мембраны, поэтому предполагается, что СО участвует (рис. 5) в созревании эритроидных предшественников, являясь местным (на уровне эритробластических островков) индуктором клеточной дифференцировки, в отличие от эритропоэтина, оказывающего эффект на всех стадиях развития [Toobias et al, 2012].

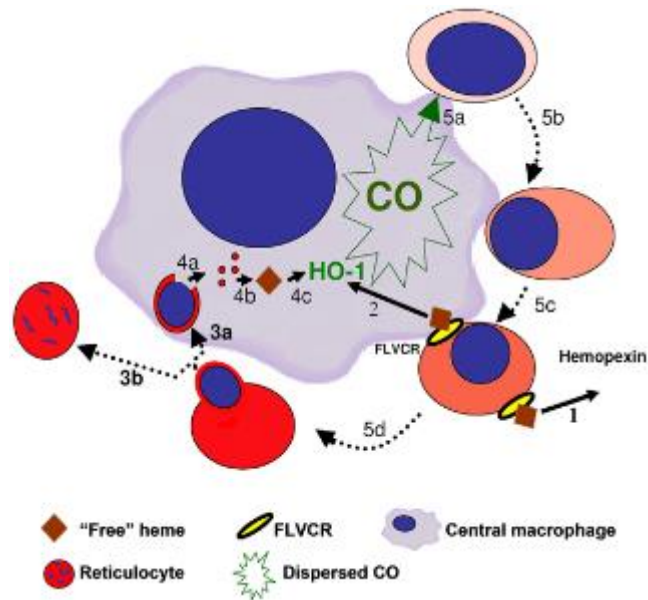


Рис. 5. Схематическое представление о продукции СО и его функции в эритробластном островке [Тообиаc et al, 2012]

Последним предшественником эритроцита является ретикулоцит – клетка неправильной формы, имеющая более крупный размер и объём по сравнению с эритроцитом, содержащая внутри себя нитчато-сетчатую субстанцию ретикулофиламентозной природы, содержащую РНК и компоненты деградировавших органелл. По мере своего созревания и удаления остатков РНК и органелл ретикулоцит последовательно проходит несколько условно выделяемых стадий (рис. 6). Согласно формуле Гельмейера по степени присутствия РНК и характера зернистости визуально различают клетки следующих классов: 0 – есть ядро, вокруг которого скапливается ретикуло-филаментозная субстанция, I – зернистость в форме клубка, II – в виде сети, распределённой по всей цитоплазме, III – в виде неполной сети, IV – в виде отдельных нитей или «пылевидных» гранул.

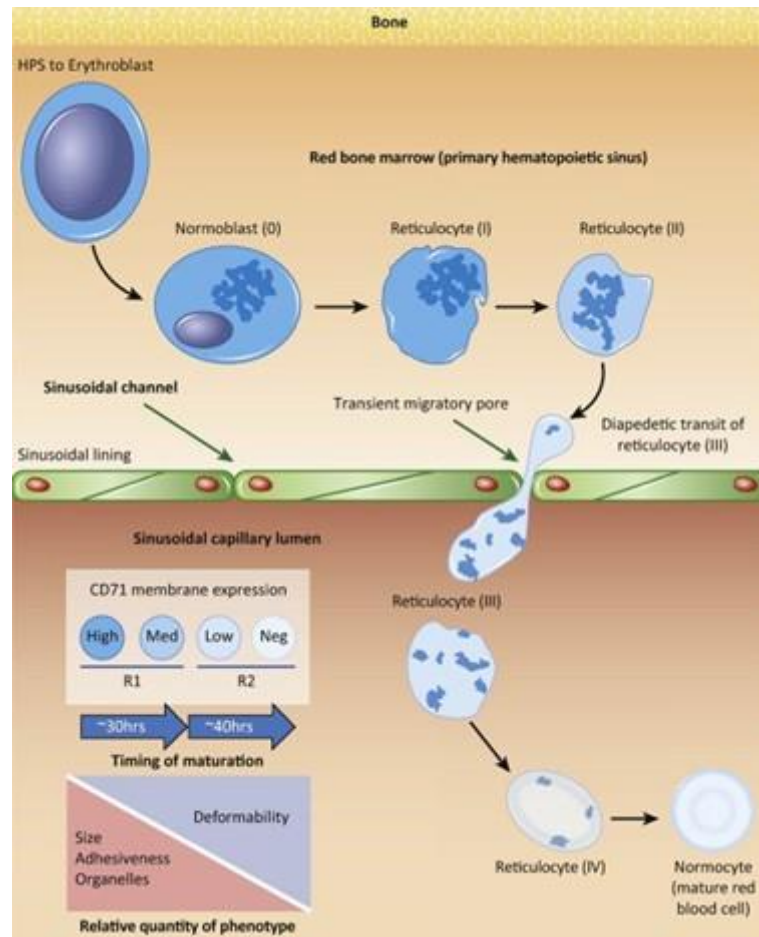


Рис. 6. Процесс созревания ретикулоцита до зрелого эритроцита  
[Russell, Cooke, 2017]

Превращение ретикулоцитов в эритроциты сопровождается обширным изменением структуры и свойств плазматической мембраны. Эти изменения включают увеличение напряжения сдвига (способность клетки сопротивляться изменению формы при сохранении объёма), уменьшение площади поверхности, и приобретение двояковогнутой формы. Показано, что тубулин и цитозольный актин исчезают полностью, а содержание в мембране миозина, тропомиозина, молекулы межклеточной адгезии-4, транспортера глюкозы-4, Na-K-АТФазы, натрий-водородного обменника-1, гликофорина А, CD47, Duffy и Kell уменьшается. За счёт повышенного фосфорилирования белка 4.1R уменьшается его взаимодействие со спектрином и актином, что приводит к ослаблению мембранно-скелетных взаимодействий

(присоединения трансмембранных белков к структурам цитоскелета), и, как следствие, меньшему напряжению сдвига в ретикулоцитах [Membrane remodeling..., 2010].

Установлено, что ретикулоциты также содержат большее количество гемоглобина, и имеют больший объём, по сравнению со зрелыми эритроцитами, в то время как соотношение площадь/объём существенно не отличается. В процессе созревания ретикулоцитов уменьшается их объём, теряется 10–14% площади поверхности и небольшая часть гемоглобина [A detailed study..., 2006].

В исследованиях *in vitro* продемонстрировано, что ретикулоциты теряют клеточные компоненты (остатки органелл) и часть мембраны за счёт процессов экзоцитоза и эндоцитоза (рис. 7).

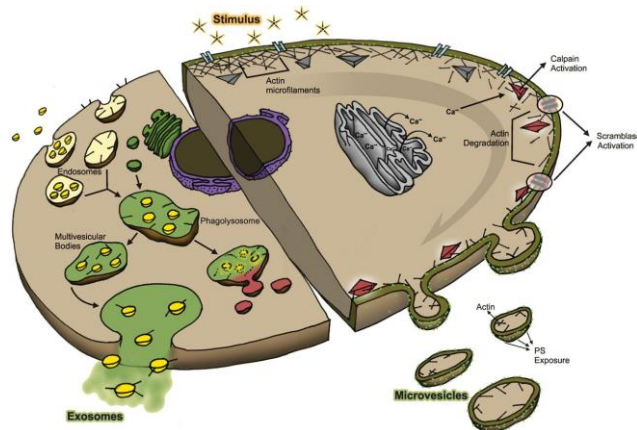


Рис. 7. Схема путей активации и образования экзосом и микровезикул [Deolindo et al, 2013]

В ходе экзоцитоза происходит образование мультивезикулярных телец с содержимым аутофагосом, превращающихся либо в лизосомы, в которых происходит деградация их содержимого, либо сливающихся с плазматической мембраной, в результате чего наблюдается выброс содержимого в виде экзосом. В ходе эндоцитоза формируются выпячивания самой

плазматической мембраны с последующим отделением образовавшейся микровезикулы [In vitro maturation..., 2005].

Экзосомы соответствуют интралюминальным везикулам (диаметром 50–100 нм) внутренних компартментов, называемых мультивезикулярными тельцами (эндосомами), секретирующими содержимое во внеклеточную среду после слияния с плазматической мембраной (рис. 8).

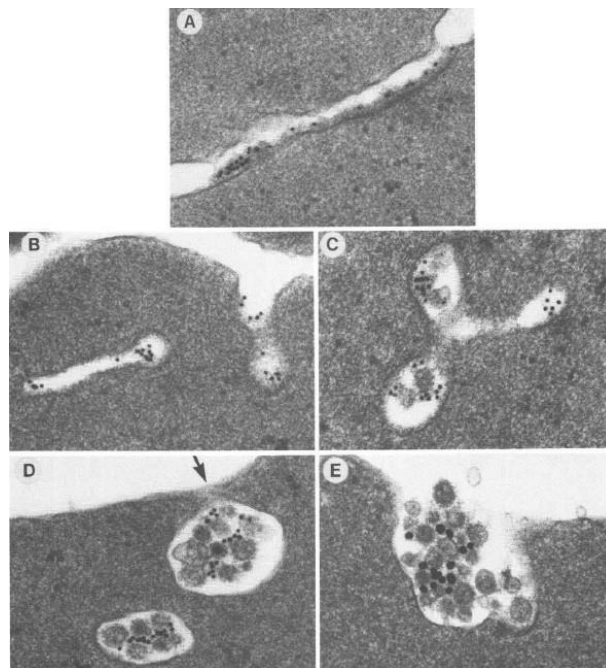


Рис. 8. Формирование экзосом на мембране ретикулоцита.

А – инкубация при 0°С, В – 15 мин при 37°С, С – 30 мин при 37°С, D – 3 часа при 37°С, Е – 18 часов при 37°С [Johnstone, 1991]

Главную функцию экзосом выделить сложно, поскольку они одновременно могут функционировать как везикулы, удаляющие ненужные белки из клеток, так и в качестве транспортных «средств» для обмена между клетками [Blanc, Vidal, 2010]. Первоначально была выяснена их роль в удалении белка трансферрина, осуществляющего транспорт ионов железа, из созревающих эритроидных клеток [Pan, Johnstone, 1983], но постепенно накопилось большое количество данных о том, что они не являются простыми «мешками с клеточным мусором». К примеру, экзосомы

опухолевых клеток могут содержать микроРНК, которая вызывает прогрессирование опухоли, влияя на другие клетки [Harding et al, 2013].

Высказывается предположение, что продолжительность жизни эритроидных клеток напрямую связана с их ограниченной способностью к образованию микровезикул с отходами жизнедеятельности клетки, накопление которых в плазматической мембране служит фокусной точкой как для сайта связывания IgG, так и для экспозиции фосфатидилсерина, что приводит к фагоцитозу клетки макрофагами. Уменьшение площади поверхности клетки (сжатие и сшивание цитоскелета) со временем ограничивает дальнейшую потерю площади мембраны, что приводит к накоплению в ней денатурированного гемоглобина, и, в конечном итоге, связыванию IgG и экспозиции фосфатидилсерина [Erythrocyte vesiculation..., 2008].

В ходе ряда исследований была показана обширная биологическая роль микровезикул, в том числе их участие в процессах межклеточной коммуникации, поддержание гомеостаза в норме, или наоборот, инициация патологических процессов. Анализ содержимого микровезикул показал, что в них содержатся молекулы мРНК, белки, регуляторные микроРНК, а на мембране экспонируются рецепторные белки (рис. 9).

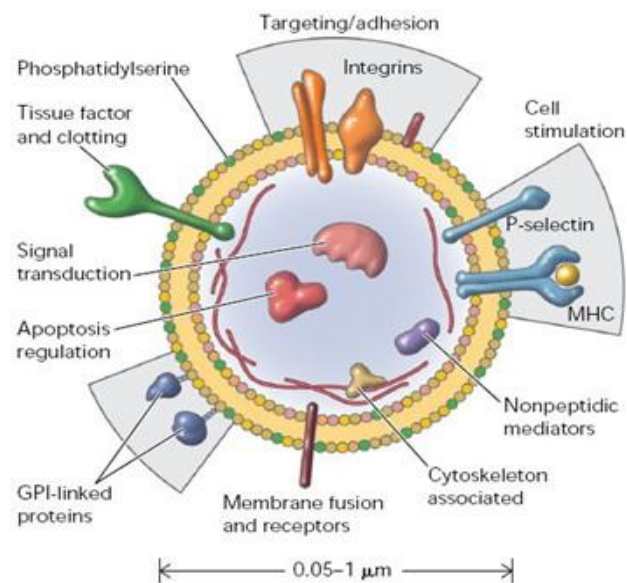


Рис. 9. Схема строения микровезикулы [Aliotta et al, 2010]

Конкретный состав зависит от клеточной популяции, производящей микровезикулы, и от функционального состояния клеток, входящих в её состав [Microvesicle entry..., 2010].

Эритрофагоцитоз части юных эритроидных клеток ещё во время их нахождения в костном мозге обозначается термином «неэффективный эритропоэз», и наблюдается у здорового человека наряду с общим эритропоэзом, в ходе которого образуется нужное число эритроидных клеток-предшественниц. Однако, обычно величина неэффективного эритропоэза не выходит за пределы 3–8%, и представляет собой физиологический механизм регуляции равновесия в системе эритрона, отвечающий меняющейся потребности организма в эритроцитах. При патологиях, в том числе при анемиях его доля доходит до 50 и выше процентов. Супрессию апоптоза эритроидных предшественников индуцирует эритропоэтин и при его малой концентрации создаются условия обширной гибели эритроидных клеток на всех стадиях дифференцировки [Жибурт, 2002].

Явление патологического перенасыщения организма железом индуцируется повышенным всасыванием данного элемента в пищеварительной системе, вызванным неэффективным эритропоэзом [Rivella, 2009].

Выделяют также терминальный путь эритропоэза, в ходе которого в небольшой популяции эритроидных клеток синтез гемоглобина осуществляется быстрее, чем в остальных, и на стадии раннего полихроматофильного эритробласта клетка подходит к митозу с концентрацией гемоглобина более 27 пг, при которой она теряет способность к делению. Дальнейшее развитие этой тетраплоидной клетки происходит без деления. Из нее образуется крупный ретикулоцит и затем макроэритроцит, содержащий более 30 пг гемоглобина. Этот тип деления эритрокариоцитов получил название терминального деления. В норме терминальный эритропоэз составляет не более 5%. Наличие его дает возможность организму осуществлять быструю регуляцию количества эритроцитов в



зависимости от различных физиологических состояний [Лабораторная диагностика..., 2009].

В ходе развития патофизиологических состояний, вызванных продолжительной нехваткой витамина В<sub>12</sub> и фолиевой кислоты происходит смена эритробластического (нормобластического) пути эритропоэза на мегалобластический. Во время этого возникает резкое снижение концентрации фолатов, участвующих в процессах синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК, связанное с закономерным торможением активности В<sub>12</sub>-зависимых ферментов. Данный процесс приводит к нарушению синтеза ДНК и РНК, проявляющемуся в клетках всех этапов созревания эритроидного ростка увеличением общего размера клетки и размера ядра в ней, сохранением нежной структуры хроматина в ядрах, большими ядрышками, несинхронным созреванием цитоплазмы и ядра. Мегалобласты морфологически напоминают незрелые клетки, и часто располагаются большими скоплениями, что может создать ошибочное впечатление клинической картины острого лейкоза [Криволапов, 2014].

Большая часть мегалобластов не созревает до зрелых форм, и погибает ещё в костном мозге. Лишь небольшое их число дозревает до стадии мегалоцита и с трудом выходят в кровеносное русло. Жизненный цикл мегалоцитов короче эритроцитарного в 3–4 раза, клетки менее устойчивы к воздействиям различного рода. В результате этого, процессы кроветворения не успевают компенсировать процессы разрушения, и в крови наблюдается резкое снижение общего числа эритроцитов, приводящее к развитию анемии [Окороков, 2001].

### **1.3. Основы регуляции эритропоэза**

Функционирование эритрона и обновление его клеток контролируется механизмами регуляции, отвечающими за поддержания динамически устойчивого эритроцитарного равновесия в организме. Под клеточной

основой эритропоэза подразумевают совокупность процессов дифференциации, пролиферации, созревания клеток-предшественниц и последующий выход молодых ретикулоцитов в периферическую кровь.

### 1.3.1. Участие эритропоэтина в регуляции эритропоэза

Эритропоэтин – почечный гормон, представленный гликопротеином с молекулярной массой ~34 kD. Большая его часть синтезируется клетками капилляров почечных клубочков, малая – секретируется в перисинусоидальных клетках печени. Кроме этого, в ходе последних исследований было установлено, что астроциты также способны к синтезу данного вещества, по-видимому, выполняющему в нервной ткани роль нейропротектора [A novel site..., 1994].

Основным фактором, стимулирующим биосинтез эритропоэтина, является гипоксия. В ходе протекания гипоксии любого генеза уровень эритропоэтина в плазме повышается в 100–1000 раз (в норме составляя около 0,01–0,03 МЕ/мкл). Регуляция синтеза гормона осуществляется как вегетативной нервной системой (симпатические нервы стимулируют его выработку, парасимпатические ингибируют), так и рядом гормонов. Соматотропин, АКТГ, пролактин, тироксин, глюкокортикоиды и тестостерон усиливают продукцию эритропоэтина и его стимулирующее действие на кроветворение. Эстрогены угнетают его образование и стимулирующее действие на гемопоэз. Следует также отметить, что эритропоэтин индуцирует не только эритроидную, но и мегакариоцитарную дифференцировку и пролиферацию [Новикова, Ходулева, 2013].

Терминальные стадии эритропоэза, происходящие в эритробластических островках, контролируются медиаторами симпатического отдела вегетативной нервной системы. Введение в культуральную среду норадреналина вызывает выраженную активацию пролиферативных процессов в ЭО в первые сутки культивирования, а

эритропоэзстимулирующий эффект адреналина начинает проявлять себя только через 72 часа [Тишевская, 2005].

Регуляция эритропоэза представляет собой сложный процесс, в котором помимо эритропоэтина на ранних стадиях развития эритроидных клеток-предшественниц участвуют и другие ростовые факторы, такие как интерлейкины-3, 6, 11 [Скобин, 2000], гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и стволовоклеточный фактор Стила. Для окончательной дифференцировки клеток требуется эритропоэтин, который оказывает наиболее сильное влияние на БОЕ-Э и КОЕ-Э, с постепенным его снижением при дальнейшей дифференцировке клеток эритроидного ряда. На всех клетках эритроидного ряда, кроме эритроцитов, выявлен рецептор к эритропоэтину [Sawyer et al, 1989].

Эритропоэтин способен предотвращать апоптоз эритроидных клеток-предшественников на поздних стадиях развития за счет подавления их фагоцитоза макрофагами [Эритропоэтин как..., 2002]. Контроль над выработкой эритропоэтина действует по принципу обратной связи, и регулируется содержанием кислорода. В физиологических условиях в ответ на уменьшение поступления кислорода к тканям происходит усиление синтеза эритропоэтина в почках (рис. 10). Выделенный гормон связывается со специфическими рецепторами на поверхности предшественников эритроцитов в костном мозге, стимулирует их пролиферацию и дифференцировку, что в конечном итоге приводит к увеличению концентрации гемоглобина [Блиндарь, Зубрихина, 2007].

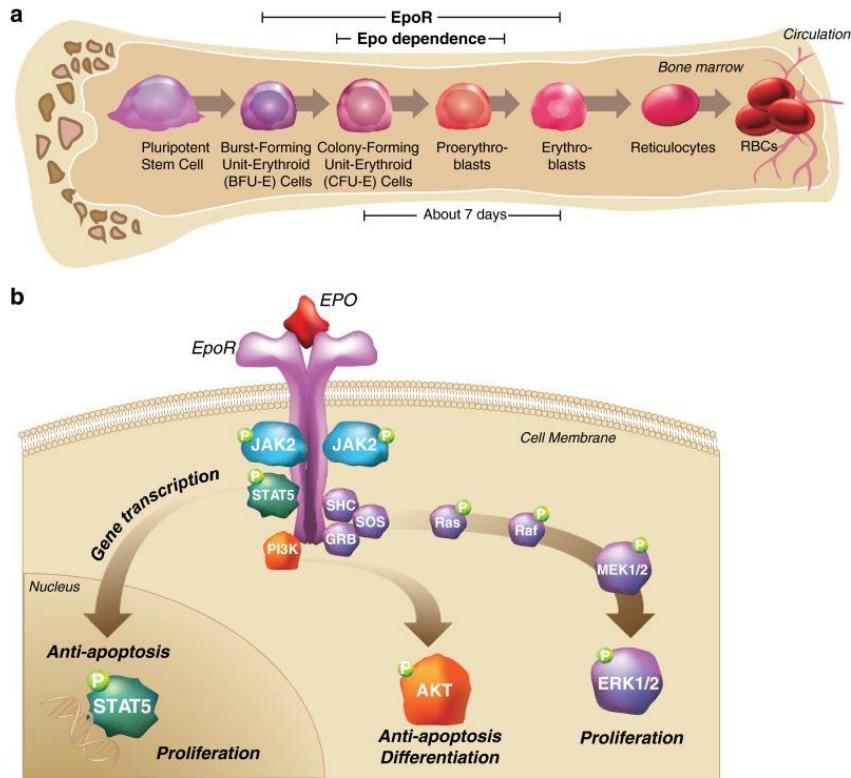


Рис. 10. Процесс эритропоэза и сигнальные пути, инициируемые связыванием молекулы эритропоэтина с рецептором EpoR [Progress in detecting..., 2014]

В условиях гипоксии клетки формируют комплекс белковых молекул ГИФ-1 (гипоксией индуцируемый фактор-1), с молекулярной массой 122000–132000 Da, который связывается с ДНК и вызывает геном-опосредованное инициирование продукции эритропоэтина за счёт транскрипции соответствующего гена (Зинчук и др., 2012). Увеличение эритропоэтической мРНК достигает максимума через 4–8 часов после начала гипоксии [Chong et al, 2002].

Непосредственно влияя на процессы развития эритроидных клеток *in vivo* и *in vitro*, эритропоэтин также осуществляет регуляцию межклеточных взаимодействий в эритробластических островках. Во время стимуляции эритропоэза этот гормон активирует секрецию макрофагами эритробластических островков сульфатированных гликозаминогликанов – дерматансульфата, гепарансульфата и хондроитинсульфата, которые

способствуют усилению секреции рецепторов к различным факторам роста на поверхности мембран клеток эритроидного ряда, принимающих участие в создании гемопоезисиндуцирующего микроокружения [Гликозаминогликаны. ..., 1995].

### **1.3.2. Ауторегуляция в системе эритропоэза**

На ранних этапах исследований систем регуляции эритропоэза была выдвинута гипотеза, что наряду с системой активации гемопоеза существует и система его негативной регуляции. Предполагалось существование помимо эритропоэтина веществ, угнетающих эритропоэз [Stohlman, Brecher, 1959].

В последующие десятилетия были найдены доказательства этой гипотезы. Современные взгляды на процессы регуляции гемопоеза предполагают наличие двух групп регуляторов, которые стимулируют и ингибируют их. Равновесное (физиологически нормальное) кроветворение характеризуется уравновешенностью сигналов от этих групп, предупреждающим пролиферацию большинства стволовых кроветворных клеток (СКК). В этом случае начало повышенной пролиферации может быть связано как с повышением уровня стимулирующего воздействия, так и со снижением влияния ингибиторов, или же с сочетанием того и другого. Доказана способность клеток, вырабатывающих стимуляторы процесса кроветворения, при воздействии определённых условий вырабатывать ингибиторы, а также возможность стимулирующего действия ингибиторов на некоторых этапах гемопоеза [Жетишев, 2003].

Фактор некроза опухоли ФНО- $\alpha$  – многофункциональный цитокин макрофагального происхождения. ФНО- $\alpha$  относят к ингибиторам эритропоэза, которые действуют на ранних стадиях развития клеток эритроидного ряда. Результатом его воздействия является полная остановка формирования КОЕ-ГЭ и БОЕ-Э. Однако в низких дозах он наоборот, стимулирует эритропоэз [Шевяков, Захаров, 2013].

Биологически активный тетрапептид AcSDKP влияет на все этапы гемопоэза, вызывая снижение числа КОЕ-ГЭ, Бое-Э и КОЕ-Э вдвое и уменьшая количество клеток в S-фазе [Ренин-ангиотензиновая..., 2017].

Показано, что сами созревающие клетки-предшественницы и зрелые эритроциты образуют систему отрицательной обратной связи, затормаживая образование новых эритроцитов [Захаров, 1970]. При изучении эритропоэзстимулирующего действия продуктов распада эритроцитов найдено, что введение лизированных клеток – ретикулоцитов и нормобластов – вызывает ингибицию эритропоэза. Продукты распада зрелых эритроцитов, вводимые животным того же вида, напротив, стимулировали эритропоэз [Меерсон, 1967]. Последующие исследования показали возможность такого действия и явились основанием для предположения о наличии ингибитора эритропоэза, образующегося в процессе созревания эритроидных клеток [Новиков, 1977].

Дальнейшие исследования установили существование кейлонов – тканево- и клеточно-специфичных гормоноподобных регуляторов клеточной пролиферации, представленных полипептидами или гликопротеидами с низкой молекулярной массой. Кейлоны продуцируются всеми клетками высших организмов, и вместе с гормонами принимают участие в регуляции численности клеточной популяций. Кейлоны ингибируют деление клеток и стимулируют их дифференцировку по принципу обратной связи [Forscher, Housk, 1973].

Кейлоны находятся и продуцируются клетками тех тканей, на которые они селективно влияют. Их действие может быть местным, путём диффузии через ткань или за счёт системы циркуляции. Кейлоны тканеспецифичны и водорастворимы. Своё действие кейлоны оказывают в поздней G1-фазе клеточного цикла, ингибируя синтез ДНК в клетках, или поздней G2-фазе, осуществляя контроль над митотической активностью. Действие кейлонов кратковременно и обратимо, они не повреждают клетки или клеточные мембраны. Кратковременность действия кейлонов объясняют присутствием

анти-кейлонов, в качестве которых предполагается действие факторов роста. Таким образом, кейлоны реализуют отрицательную обратную связь, а факторы роста – положительную в регуляции тканевого гомеостаза [Кишкун, 2008].

В кейлонной теории стволовые клетки, ещё не вступившие на путь дифференцировки, способны к непрерывному процессу деления, но этот процесс сдерживается за счёт ингибирования кейлонами, выделяющимися дифференцированными клетками. В ходе снижения количества дифференцированных клеток снижается и концентрация кейлонов, что закономерно приводит к увеличению делений стволовых клеток, способствуя обновлению клеточных пулов [Bateman, 1974].

Известно, что в процессе онтогенеза происходит непрерывная смена одних клеточных популяций другими. Старые или дегенеративно изменённые эритроциты удаляются из циркулирующей крови макрофагами. Одним из маркеров, которые распознаются макрофагами, является экспонирующийся на поверхности клеточных мембран таких клеток фосфатидилсерин, который в норме находится во внутреннем слое мембраны [Вересов, 2008].

Эритроциты и макрофаги взаимодействуют друг с другом посредством лиганд-лигандных взаимодействий. Со временем на мембранах эритроцитов накапливаются сигналы «съешь меня» (рис. 11).

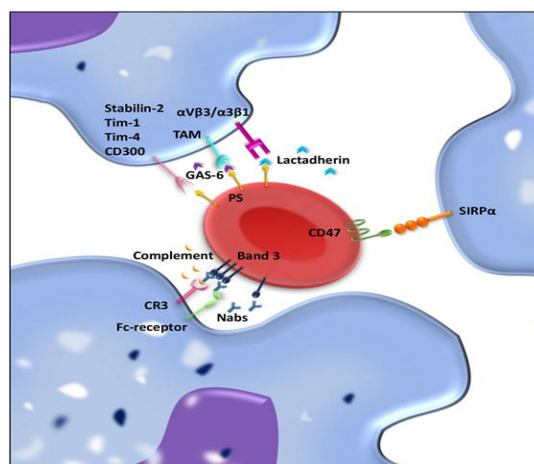


Рис. 11. Предполагаемые сигналы «съешь меня» и «не ешь меня» распознаваемые макрофагами [Klei et al, 2017]

Фосфатидилсерин, выходящий на наружный слой мембраны, может напрямую связывать рецепторы Stabilin-2 Tim-1, Tim-4 или CD300, расположенные на мембранах макрофагами и, как предполагается, давать сигнал к началу фагоцитоза. Кроме того, такие мостиковые лиганды, как GAS-6, лактатгерин могут способствовать взаимодействию между эритроцитами и макрофагами путём связывания фосфатидилсерина на эритроцитах с TAM рецепторами или  $\alpha_v\beta_3/\beta_5$  интегринами на макрофагах. Кластеризация белка полосы-3 и опсонизация с NABs (природными антителами человека) и белками системы комплемента позволяет эритроцитам связываться с макрофагом через его Fc-рецепторы, тем самым, облегчая фагоцитоз [Lutz, 2004].

Обратным по действию сигналом «не ешь меня» является взаимодействие CD47 на мембране эритроцита с макрофагальным SIRP $\alpha$  [Oldenborg et al, 2001].



## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Организация эксперимента

Экспериментальные исследования выполнены на базе НИЛ «Физиология адаптационных процессов» кафедры биологии ИИТиЕН НИУ «БелГУ». В экспериментальной части работы использовали венозную кровь доноров (n=50) из них женщин (n=26) и мужчин (n=24) в возрасте от 25 до 45 лет, проходивших диспансеризацию на базе областной клинической больницы им. Св. Иоасафа г. Белгорода. Для исследования формировали группы больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (n=41) и острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) (n=20). В обследуемых группах деление пациентов по половому признаку не проводили в связи с применяемыми схемами лечения, значительно повышающими дисперсию параметров эритроцитокинетики больных, что препятствовало адекватному делению на группы. Больные в возрасте от 17 до 74 лет находились на лечении в гематологическом отделении областной клинической больницы им. Св. Иоасафа г. Белгорода. Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинкской декларации, было получено информированное согласие всех субъектов эксперимента в соответствии с рекомендациями (Декларация по этическим принципам медицинских исследований, в которых участвуют люди, принятая 52-ой Генеральной Ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь, 2000 г).

Забор крови проводили путем венопункции с участием специализированного персонала областной клинической больницы им. Св. Иоасафа. Кровь собирали в вакуумные пробирки Vacuette К3Е, содержащие сухую ЭДТА-К3 в концентрации 2,0 мг (0,006843 моль/литр) на 1 мл крови.

## 2.2. Дифференциальный анализ эритроидного ростка гемопоэза

### 2.2.1. Подсчет числа эритроцитов

Подсчёт числа эритроцитов осуществляли с помощью счётной камеры Горяева при разведении крови с физиологическим раствором в соотношении 1:200. Число эритроцитов в 1 мкл крови рассчитывали согласно формуле 2.1:

$$\frac{(A \times 4000 \times 200)}{80}, \quad (2.1)$$

где А – число эритроцитов;

4000 – приведение к объему 1 мкл крови;

200 – степень разведения;

80 – число малых квадратов.

### 2.2.2. Расчет показателей эритроцитарного баланса

Показатели эритроцитарного баланса рассчитывал на основе числа ретикулоцитов в свежей и инкубированной крови [Некоторые методические..., 1982]. Для окраски ретикулоцитов готовили 0,1% раствор бриллиантового крезилового синего на физиологическом растворе NaCl (0,9%). Свежую цельную кровь смешивали с красителем в соотношении 1:1 (по объему), оставляли при комнатной температуре на 40 мин, после чего делали мазок на сухом обезжиренном стекле. Параллельно в другую пробирку наливали 100 мкл крови, и ставили в термостат при 37°C на 4 часа, после чего аналогичным образом красили, и делали мазок.

Используя световой микроскоп Axiostar plus (Carl Zeiss, 2010), подсчитывали число ретикулоцитов в свежей и инкубированной 4 ч крови. Подсчёт вели в поле зрения иммерсионного объектива (ув. x100) на 1000 эритроцитов.

Основываясь на формуле Гельмейера, проводили подсчёт всех классов ретикулоцитов: I – зернистость в форме клубка, II – в виде сети,

распределённой по всей цитоплазме, III – в виде неполной сети, IV – в виде отдельных нитей или «пылевидных» гранул.

Согласно формулам рассчитывали период полувыведения ретикулоцитов  $T_{1/2p}$ , обусловленный их созреванием, период полувыведения эритроцитов из кровотока  $T_{1/2эp}$  и величину суточной продукции эритроцитов на 1 мкл крови  $P_{эp/сут}$  [Некоторые методические..., 1982]:

$$\lg \frac{N_p}{N_{p0}} = -\frac{0,3010}{T_{1/2p}} \times t, \quad (2.2)$$

где  $N_p$  – число ретикулоцитов после 4 часов инкубации, шт.;

$N_{p0}$  – число ретикулоцитов до инкубации, шт.;

$t$  – время инкубации, равное 4 часам;

$T_{1/2p}$  – период полувыведения ретикулоцитов, ч.

$$T_{1/2эp} = \frac{T_{1/2p} \times 1000}{N_{p0} \times 24}, \quad (2.3)$$

где  $T_{1/2эp}$  – период полувыведения эритроцитов, сут.;

$T_{1/2p}$  – период полувыведения ретикулоцитов, ч.;

$N_{p0}$  – число ретикулоцитов до инкубации, шт.

$$P_{эp/сут} = \frac{0,693}{T_{1/2эp}} \times N_{эp}, \quad (2.4)$$

где  $P_{эp/сут}$  – величина суточной продукции эритроцитов на 1 мкл крови, тыс.;

$N_{эp}$  – число эритроцитов в 1 мкл крови, млн.;

$T_{1/2эp}$  – период полувыведения эритроцитов, сут.

### **2.3. Методика изучения рельефа поверхности мембран ретикулоцитов методом атомно-силовой микроскопии**

Особенности рельефа поверхности мембран клеток изучали на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе

инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; производитель NT-MDT, Зеленоград, 2009). Сканирование ретикулоцитов проводили в контактном режиме, и в режиме рассогласования (Contact error mode) с частотой развертки 0,6–0,8 Hz, используя кантилевер с золотым напылением серии CSG11, с жесткостью 1,1 Н/м и радиусом закругления 10 нм (NT-MDT).

Для выполнения экспериментального исследования отбирали пробы крови пациентов с острым лимфобластным лейкозом (n=10) и острым миелобластным лейкозом (n=10). В качестве контроля отбирали пробы крови доноров (здоровых людей) (n=10). Подготовку препаратов для сканирования осуществляли следующим образом: для окраски ретикулоцитов готовили 0,1% раствор бриллиантового крезилового синего на физиологическом растворе NaCl (0,9%). Свежую цельную кровь смешивали с красителем в соотношении 1:1 (по объему), оставляли при комнатной температуре на 40 мин, после чего делали мазок на сухом обезжиренном стекле, и сушили на воздухе. С каждой пробы сканировали не менее 10 клеток. Общее число исследованных клеток составило: в группе больных ОМЛ n=100, в группе больных ОЛЛ n=100, в контрольной группе n=100.

Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Nova 1443 (рис. 12).



Рис. 12. АСМ-изображение и вид профиля поверхности ретикулоцита: красная стрелка – глобулярный выступ, чёрная – впадина

С целью выявления особенностей топографии клеточной поверхности ретикулоцитов проводили подсчёт числа морфологических образований мем-

браны и измеряли их линейные размеры. Для этого на полученных сканах строили кривые профиля участков поверхности клеток, на которых измеряли габаритные размеры и подсчитывали число глобулярных выступов, и углублений. На поверхности каждой клетки сканировали участок мембраны размером 3x3 мкм, что позволило провести усреднение параметров микрорельефа. С помощью инструмента Roughness analysis (рис. 13) по каждому кадру рассчитывали значения шероховатости ( $S_z$ ), среднеарифметическую шероховатость ( $S_a$ ), среднеквадратичную шероховатость ( $S_q$ ) и максимальный перепад высот ( $S_{max}$ ). Данные параметры определяют наиболее общие свойства, отражающие состояние рельефа всех видов поверхности [Артамонова, Потатуркина-Нестерова, 2014].

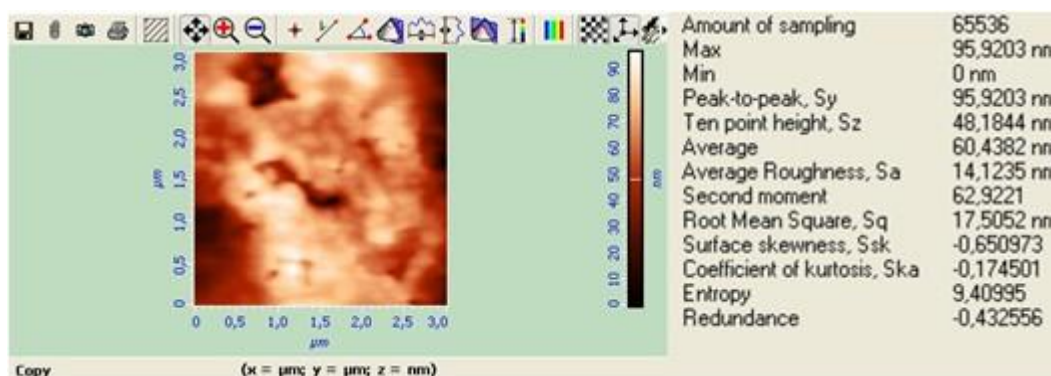


Рис. 13. Инструмент Roughness analysis в программе Nova 1443

1.  $S_z$  – шероховатость поверхности по выбранным пяти максимальным высотам и впадинам (среднее абсолютное значение пяти наивысших пиков и пяти самых глубоких впадин), нм. Параметр  $S_z$  использовали для общей оценки степени неровности рельефа поверхности.

2.  $S_a$  – средняя арифметическая шероховатость, характеризующая среднее арифметическое отклонение значений пиков и впадин на профиле от средней линии. Чем меньше значение  $S_a$ , тем ровнее поверхность.

3.  $S_q$  – среднеквадратичная шероховатость поверхности, определяющая дисперсию случайной величины и характеризующая рассеяние отдельных ее значений от центра распределения.

4.  $S_y$  – максимальный перепад высот между самой верхней и нижней точками поверхности профиля. Этот параметр соответствует толщине поверхностного слоя, заключенного между плоскостями, проходящими через самую низкую и самую высокую точки поверхности. Ниже этого слоя лежит сплошной слой. Таким образом,  $S_z$  можно рассматривать как параметр, характеризующий толщину поверхностного, возмущенного слоя, в котором происходит изменение рельефа.

Также с помощью инструмента Roughness analysis измеряли максимальную высоту клетки и среднюю высоту глобулярных выступов мембраны.

#### 2.4. Методика измерения объёма и площади поверхности ретикулоцитов

Измерение объёма ( $V$ ,  $\text{мкм}^3$ ) и площади поверхности ( $S$ ,  $\text{мкм}^2$ ) клеток проводили с использованием программного обеспечения Gwyddion (Czech Metrology Institute, 2004), предназначенном для визуализации и анализа данных, полученных методами сканирующей зондовой микроскопии (рис. 14).

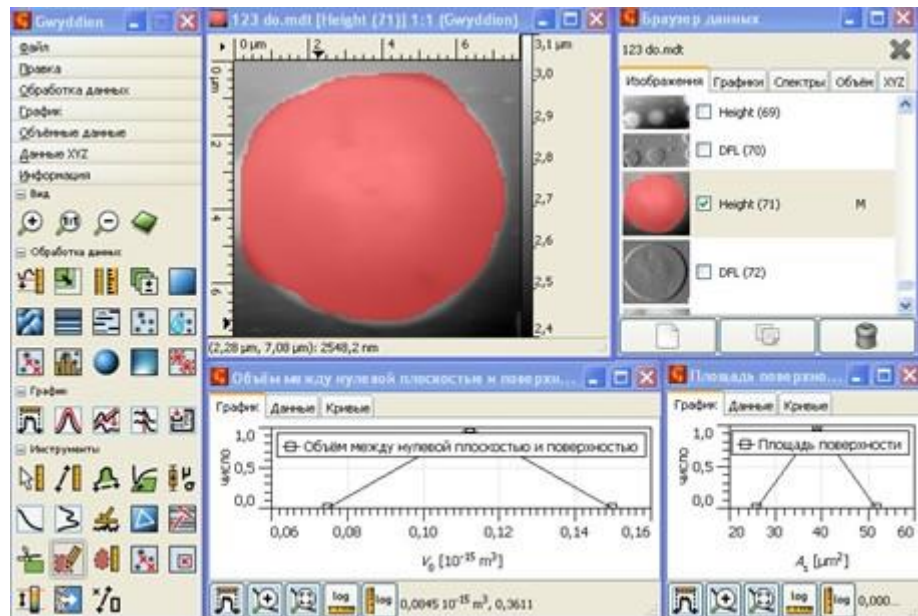


Рис. 14. Внешний вид рабочих окон Gwyddion

Объём и площадь поверхности измеряли для всех отсканированных клеток каждой пробы, таким образом, общее число исследованных клеток составило: в группе больных ОМЛ  $n=100$ , в группе больных ОЛЛ  $n=100$ , в контрольной группе  $n=100$ .

## 2.5. Методика оценки упруго-эластических свойств ретикулоцитов

Для оценки упруго-эластических свойств ретикулоцитов использовали метод атомно-силовой спектроскопии [Скоркина и др., 2012]. С целью определения модуля Юнга осуществляли сканирование клеток в режиме силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 25 локальных участках клеточной поверхности (рис. 15). Получали силовые кривые, которые использовали для вычисления силы взаимодействия зонда и образца. По каждой клетке рассчитывали среднее арифметическое значение модуля Юнга.

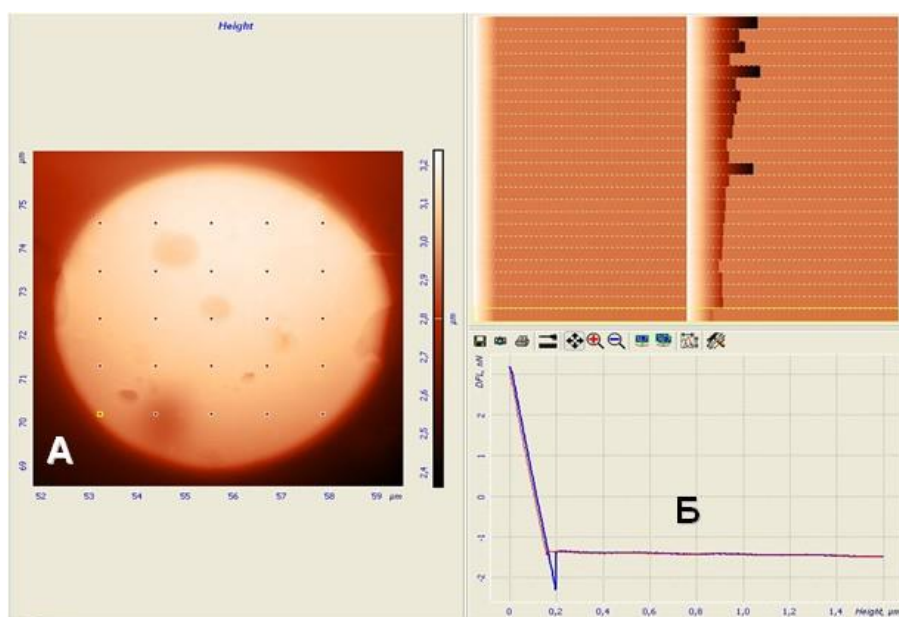


Рис. 15. Измерение модуля Юнга лимфоцитов: А – соответствующие локальные точки силового воздействия на поверхность клетки, Б – экспериментальные кривые сближения зонда с поверхностью (синяя – кривая подвода, красная – кривая отвода зонда)

Силу прижатия зонда к образцу находили исходя из закона Гука:

$$F = k \times x \quad (2.5)$$

где  $k$  – жесткость зонда (Н/м),

$x$  – глубина проникновения зонда в образец (нм).

Модуль Юнга системы образец-игла рассчитывали исходя из известной формулы [Capella, Diestler, 1999]:

$$F = \frac{4\sqrt{3}}{3} E \Delta h^{\frac{3}{2}} \quad (2.6)$$

где  $F$  – сила, с которой зонд действует на образец (Н),

$R$  – радиус закругления зонда (мкм),

$E$  – модуль Юнга (мПА),

$\Delta h$  – глубина погружения зонда в образец (нм).

## 2.6. Методы статистической обработки экспериментальных данных

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 и электронных таблиц «Microsoft Excel 2003» с надстройкой AtteStat на персональном компьютере. Рассчитывали средние арифметические, средние квадратичные (для объема и площади) величины, стандартное отклонение, коэффициент вариации. Экспериментальные данные представлены в виде среднеарифметических и среднеквадратичных величин с их стандартными ошибками. Проверку гипотезы о нормальности распределения эмпирических данных проводили с использованием модифицированного критерия Колмогорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием  $t$ -критерия Стьюдента ( $p < 0,05$ ), в случае ненормального распределения использовали  $U$ -критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).



### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Показатели эритроцитокинетики и морфология ретикулоцитов в условиях физиологической регенерации системы крови

В результате проведенного исследования достоверных различий между показателями эритроцитокинетики в группах мужчин и женщин в норме не выявлено (табл. 1).

Таблица 1

##### Параметры эритроцитокинетики в норме

Параметры	Мужчины (n=24)	Женщины (n=26)
$N_{эр}$ , млн/мкл	3,63±0,10	3,85±0,12
$N_{p0}$ , штук	16,87±1,78	16,88±2,10
$N_{p4}$ , штук	10,12±1,23	9,73±1,50
$N_{p0}/N_{p4}$	0,59±0,04	0,61±0,05
$T_{1/2p}$ , часов	8,01±1,74	7,66±1,07
$T_{1/2эр}$ , суток	20,11±4,23	27,32±5,50
$P_{эр/сут}$ , тыс/(мкл•сут)	201,98±24,35	202,39±32,76

Примечание:  $N_{эр}$  – число эритроцитов в одном микролитре крови, млн,  $N_{p0}$  – число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов до инкубации, штук,  $N_{p4}$  – число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов после инкубации, штук,  $N_{p0}/N_{p4}$  – соотношение между числом ретикулоцитов до и после инкубации,  $T_{1/2p}$  – период полувыведения ретикулоцитов, обусловленный их созреванием, ч.,  $T_{1/2эр}$  – период полувыведения эритроцитов, обусловленный их разрушением, сут.,  $P_{эр/сут}$  – величина суточной продукции эритроцитов на 1 мкл крови, тысяч.

Различий в морфологии ретикулоцитов между мужчинами и женщинами не выявлено. Высота клетки составила 978,7±43,9 нм, площадь поверхности – 70,0±3,9 мкм<sup>2</sup>, объем клетки 29,1±2,3 мкм<sup>3</sup>.

Анализ распределения ретикулоцитов по степени зрелости согласно формуле Гельмейера (рис. 16) показал, что в группе мужчин распределение имеет следующий вид: I класс – 0,74%, II класс – 1,96%, III класс – 17,78%, IV класс – 79,55%. В группе женщин: I класс – 0%, II класс – 2,20%, III класс – 18,02%, IV класс – 79,78%.

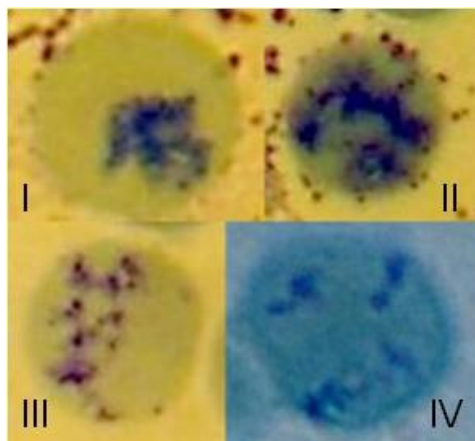


Рис. 16. Классы зрелости ретикулоцитов (ув. x100)

Рельеф поверхности ретикулоцитов был представлен глобулярными образованиями, округлыми инвагинациями и инвагинациями неправильной формы (рис. 17).

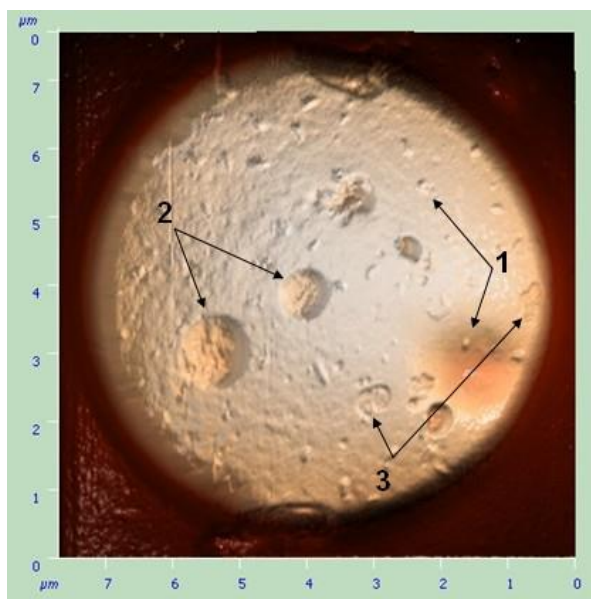


Рис. 17. Поверхность ретикулоцита в норме

1 – глобулы, 2 – округлые инвагинации, 3 – инвагинации неправильной формы

В среднем, микрорельеф был представлен  $26,33 \pm 5,31$  выступами, высотой  $98,05 \pm 12,76$  нанометров. Среднее число впадин составило  $13,01 \pm 2,16$  штук, шириной  $464,21 \pm 27,93$  нанометров и глубиной  $26,60 \pm 4,53$

нанометров (табл. 3).

Таблица 3

### Микрорельеф поверхности ретикулоцитов в норме

Число выступов, шт.	Высота выступов, нм	Число впадин, шт.	Ширина впадин, нм	Глубина впадин, нм
26,33±5,31	98,05±12,76	13,01±2,16	464,21±27,93	26,60±4,53

Средний максимальный перепад высот клеточной поверхности составил 156,84±20,00 нанометров, общая степень неровности рельефа цитоплазматической мембраны – 79,55±9,79 нанометров, средняя арифметическая шероховатость – 17,19±2,90 нанометров, значение среднеквадратичной шероховатости – 22,49±3,61 нанометров (табл. 4).

Таблица 4

### Особенности цитоархитектоники поверхности ретикулоцитов в норме

Sy, нм	Sz, нм	Sa, нм	Sq, нм
156,84±20,00	79,55±9,79	17,19±2,90	22,49±3,61

Примечание: Sy – максимальный перепад высот, нм, Sz – общая степень неровности рельефа поверхности, нм, Sa – средняя арифметическая шероховатость поверхности, нм, Sq – среднеквадратичная шероховатость поверхности, нм.

Жёсткость поверхности ретикулоцитов, оцененная по показателю модуля Юнга, в норме составила 6,85±1,90 мПа.

## 3.2. Показатели эритроцитокинетики при развитии острого миелобластного лейкоза в системе крови

В связи со схемой лечения пациентов дисперсия параметров эритроцитокинетики в группах мужчин и женщин возрастала, что не позволяло провести адекватное сравнение между группами, поэтому в качестве контроля аналогично брали среднее значение по всем пробам.

В результате проведённых исследований достоверных различий

значениями параметров эритроцитокинетики между контрольной (доноры) и опытной (пациенты с ОМЛ) группами не выявлено. Тем не менее, прослеживалась общая тенденция к увеличению показателей, за исключением соотношения между созревающими клетками и прибывающими (табл. 5).

Таблица 5

### Параметры эритроцитокинетики у больных ОМЛ

Параметры	Группы	
	контроль	ОМЛ
$N_{эр}$ , млн/мкл	3,75±0,08	4,05±0,33
$N_{p0}$ , штук	16,88±1,37	27,44±11,02
$N_{p4}$ , штук	9,92±0,97	16,56±5,20
$N_{p0}/N_{p4}$	0,60±0,03	0,67±0,07
$T_{1/2p}$ , часов	7,83±0,99	11,64±3,32
$T_{1/2эр}$ , суток	23,86±3,51	41,13±11,84
$P_{эр/сут}$ , тыс/(мкл•сут)	202,19±20,45	236,72±127,42

Примечание: ОМЛ – острый миелобластный лейкоз,  $N_{эр}$  – число эритроцитов в одном микролитре крови, млн,  $N_{p0}$  – число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов до инкубации, штук,  $N_{p4}$  – число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов после инкубации, штук,  $N_{p0}/N_{p4}$  – соотношение между числом ретикулоцитов до и после инкубации,  $T_{1/2p}$  – период полувыведения ретикулоцитов, обусловленный их созреванием, ч.,  $T_{1/2эр}$  – период полувыведения эритроцитов, обусловленный их разрушением, сут.,  $P_{эр/сут}$  – величина суточной продукции эритроцитов на 1 мкл крови, тысяч.

При анализе ретикулоцитарной формулы было отмечено увеличение в крови числа незрелых ретикулоцитов I класса на 4750% ( $p < 0,05$ ) и ретикулоцитов II класса на 1231,2% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (рис. 18).

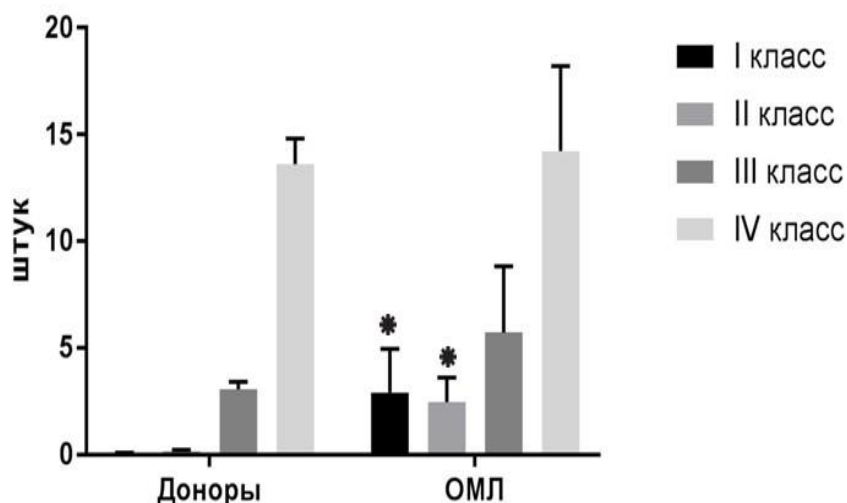


Рис. 18. Ретикулоцитарная формула в группе пациентов больных ОМЛ

Достоверного изменения числа ретикулоцитов III и IV классов не установлено.

### 3.3. Показатели эритроцитокинетики при развитии острого лимфобластного лейкоза в системе крови

Параметры эритроцитокинетики при злокачественной пролиферации лимфоидного ростка кроветворения представлены в таблице 6.

Таблица 6

#### Параметры эритроцитокинетики при ОЛЛ

Параметры	Группы	
	контроль	ОЛЛ
Нэр, млн/мкл	3,75±0,08	3,85±0,19
Нр <sub>0</sub> , штук	16,88±1,37	22,19±3,85
Нр <sub>4</sub> , штук	9,92±0,97	14,62±3,11
Нр <sub>0</sub> /Нр <sub>4</sub>	0,60±0,03	0,59±0,05
T <sub>1/2p</sub> , часов	7,83±0,99	9,64±2,38
T <sub>1/2эп</sub> , суток	23,86±3,51	23,81±6,36
Р эр/сут, тыс/(мкл•сут)	202,19±20,45	237,15±35,46

Примечание: ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз, Нэр – число эритроцитов в одном микролитре крови, млн, Нр<sub>0</sub> – число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов до инкубации, штук, Нр<sub>4</sub> – число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов после инкубации, штук, Нр<sub>0</sub>/Нр<sub>4</sub> – соотношение между числом ретикулоцитов до и после инкубации, T<sub>1/2p</sub>

– период полувыведения ретикулоцитов, обусловленный их созреванием, часов,  $T_{1/2}$  эр – период полувыведения эритроцитов, обусловленный их разрушением, суток,  $P$  эр/сут – величина суточной продукции эритроцитов на 1 мкл крови, тысяч.

Достоверных различий в параметрах эритроцитокинетики между контрольной (доноры) и опытной (пациенты с ОЛЛ) группами не выявлено, однако прослеживалась общая тенденция к их увеличению, за исключением периода полувыведения эритроцитов, обусловленного их старением, и соотношения между созревающими клетками и прибывающими.

При анализе ретикулоцитарной формулы было отмечено увеличение в крови числа незрелых ретикулоцитов I класса на 1933,3% ( $p < 0,05$ ), ретикулоцитов II класса на 1668,7% ( $p < 0,05$ ) и ретикулоцитов III класса на 120,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (рис. 19).

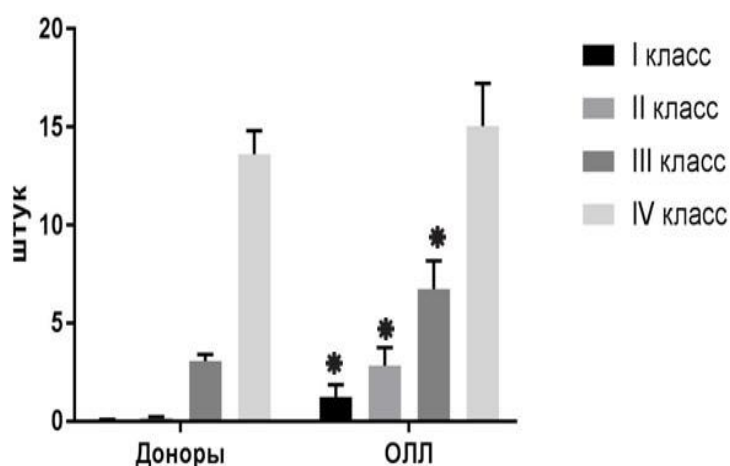


Рис. 19. Ретикулоцитарная формула у доноров и больных ОЛЛ

Достоверного изменения числа ретикулоцитов IV класса не наблюдалось.

### 3.4. Неэффективный эритропоэз

В выполненном исследовании установлены случаи протекания неэффективного эритропоэза – приблизительно в 50% случаев при развитии ОМЛ и в 39% у пациентов с диагнозом ОЛЛ. Неэффективный эритропоэз

характеризуется тем, что эритроидные предшественники разрушаются ещё в костном мозге, не успевая выйти в периферическую кровь. В таких пробах ретикулоциты в подсчёте на 1000 эритроцитов не обнаруживались, либо же были представлены единичными крупными незрелыми ретикулоцитами I класса, обнаруживающимися на число эритроцитов  $> 1000$ .

В группах больных ОМЛ и ОЛЛ, не демонстрирующих протекание эритропоэза по неэффективному пути, повышалось общее число эритроцитов в 1 мкл крови по сравнению с контролем (табл. 7).

Таблица 7

Число эритроцитов в крови у больных ОМЛ и ОЛЛ при неэффективном эритропоэзе

Группы	$N_{эр}$ , млн/мкл	$N_{эр}$ , млн/мкл (неэфф.эритропоэз)
Контроль	$3,75 \pm 0,08$	–
ОЛЛ	$4,08^{**} \pm 0,22$	$3,48 \pm 0,33$
ОМЛ	$4,50^{**} \pm 0,47$	$3,62 \pm 0,45$

Примечание: \*\* – статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольных пробах по t-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

В группе больных ОЛЛ число эритроцитов повысилось на 8,8% ( $p < 0,05$ ), в группе больных ОМЛ – на 20% ( $p < 0,05$ ). В группах больных ОМЛ и ОЛЛ, при развитии неэффективного эритропоэза, число эритроцитов достоверно не изменилось. Таким образом, острые пролиферативные злокачественные заболевания в системе крови часто сопровождаются развитием неэффективного эритропоэза.

### 3.5. Морфометрия и упруго-эластические свойства ретикулоцитов при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови

Согласно данным морфометрических исследований было установлено, что в группе больных ОЛЛ площадь поверхности ретикулоцитов увеличилась на 18,7% ( $p < 0,05$ ), а объём – на 7,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 8).

Таблица 8

Морфометрические параметры ретикулоцитов при развитии злокачественных пролиферативных процессов

Группы	Высота, нм	Площадь поверхности, мкм <sup>2</sup>	Объём, мкм <sup>3</sup>
Контроль	978,73±43,88	70,01±3,86	29,12±2,27
ОЛЛ	910,62±38,40	83,14**±3,59	31,43*±1,07
ОМЛ	1047,19±55,80	78,44±5,32	32,96±2,04

Примечание: \* – статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольных пробах по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ), \*\* – статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольных пробах по t-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

В группе больных ОМЛ также прослеживалась тенденция к увеличению площади поверхности и объема, однако достоверных различий не выявлено.

Рельеф поверхности ретикулоцитов был представлен глобулярными образованиями, многочисленными мелкими инвагинациями и отдельными обширными инвагинациями на поверхности мембраны (рис. 20).



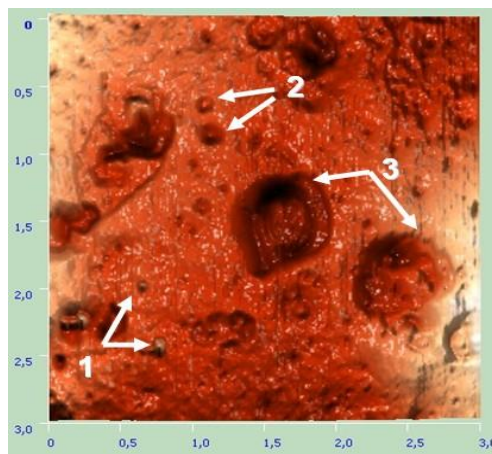


Рис. 20. Скан участка поверхности ретикулоцита  
(3x3 мкм; атомно-силовая микроскопия, контактный режим)  
1 – глобулярные образования, 2 – мелкие инвагинации,  
3 – обширные инвагинации

Среди изученных проб крови, только в группе больных ОМЛ установлено достоверное увеличение ширины (на 19,3%) и глубины (на 25,4%) инвагинаций по сравнению с контролем (табл. 9).

Таблица 9

Структура микрорельефа поверхности ретикулоцитов

Структуры микрорельефа	Контроль	ОЛЛ	ОМЛ
Число глобул, шт.	26,33±5,31	19,18±1,91	25,41±3,91
Высота глобул, нм	98,05±12,76	109,24±7,81	135,37±15,44
Число впадин	13,01±2,16	10,69±1,17	10,42±1,50
Ширина инвагинаций, нм	464,21±27,93	551,32±41,47	553,76*±41,66
Глубина инвагинаций, нм	26,60±4,53	27,54±2,21	33,36*±2,93

Примечание: \* – статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольных пробах по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Анализируя перепад высот на участке поверхности ( $S_y$ ), в группе больных ОМЛ установлено его увеличение на 44,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл. 10).

## Особенности цитоархитектоники поверхности ретикулоцитов

Параметры микрорельефа	Контроль	ОЛЛ	ОМЛ
Sy, нм	156,84±20,00	179,46±6,07	226,70**±23,31
Sz, нм	79,55±9,79	100,90±6,34	121,47**±12,24
Sa, нм	17,19±2,90	21,31±0,72	25,99±3,72
Sq, нм	22,49±3,61	27,38±0,94	33,74±4,39

Примечание: \*\* – статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольных пробах по t-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ), Sy – максимальный перепад высот, нм, Sz – общая степень неровности рельефа поверхности, нм, Sa – средняя арифметическая шероховатость поверхности, нм, Sq – среднеквадратичная шероховатость поверхности, нм.

Для ретикулоцитов больных ОМЛ установлено увеличение неровности клеточной поверхности (Sz) на 52,7% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контрольной группой. При этом значения среднеарифметической (Sa) и среднеквадратической (Sq) шероховатости поверхности также повысились.

У ретикулоцитов из группы больных ОЛЛ наблюдали тенденцию к увеличению значений морфометрических параметров клеточной поверхности.

Достоверных различий в значениях модуля Юнга ретикулоцитов, характеризующего жёсткость поверхности, не установлено. Тем не менее, отмечали тенденцию к двукратному снижению жёсткости мембраны (табл. 11).

Таблица 11

## Модуль Юнга поверхности ретикулоцитов

Группы	Модуль Юнга, мПа
Контроль	6,85±1,90
ОЛЛ	3,74±0,78
ОМЛ	3,46±0,86

Следовательно, ретикулоциты больных острыми лимфо- и миелопролиферативными заболеваниями характеризуются сниженной жёсткостью цитоплазматической мембраны, и имеют большую площадь поверхности и объём по сравнению с контролем.

#### **Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В выполненном исследовании изучены параметры эритроцитарного баланса в норме и при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови. В результате проведённых исследований было установлено, что при развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови в кровотоке циркулируют ретикулоциты, объём и площадь поверхности которых увеличены по сравнению с контролем. Эти предположения подтверждаются данными подсчёта ретикулоцитарной формулы, свидетельствующими о том, что система регуляции эритропоэза в условиях развития ОЛЛ и ОМЛ перестраиваются, повышая число ретикулоцитов за счёт выхода более незрелых клеток I и II классов, сохраняя при этом соотношение созревающих и прибывающих клеток.

По данным литературы [Типовая реакция..., 2002] в условиях крайней стимуляции, каковой можно считать разрастание опухолевого клона, и появление в крови бластов, продуцирующих цитокины, угнетающие пролиферацию здоровых клеток, в систему эритрона вовлекается всё больше стволовых элементов, происходит интенсивная пролиферация самых юных форм эритроидного ряда. В случае необходимости быстрой регуляции числа эритроцитов повышается вклад терминального эритропоэза в общий процесс, в ходе которого в небольшой популяции эритроидных клеток синтез гемоглобина осуществляется быстрее, и на стадии раннего полихроматофильного эритробласта клетка подходит к митозу с концентрацией гемоглобина более 27 пг, при которой она теряет способность к делению, и в дальнейшем образует крупный ретикулоцит с повышенной кислородной ёмкостью [Лабораторная диагностика..., 2009].

Сравнивая данные по площади поверхности и объёму ретикулоцитов в норме полученные нами, и аналогичные данные, представленные в работе Шона Гиффорда [A detailed study..., 2006] можно заметить, что данные литературы завышены по сравнению с нашими результатами. Мы связываем это с различными методологическими подходами, поскольку авторы статьи

использовали для измерения размеров клеток микроканальное устройство, позволяющее не проводить пробоподготовку перед использованием. В нашем же исследовании непосредственно перед сканированием на атомно-силовом микроскопе проводилось высушивание мазков крови, что приводило к потере клетками ~60–70% своей массы за счёт испарения воды [Моделирование морфологии..., 2015], а, следовательно, и к уменьшению их размеров, с сохранением формы.

Установленное нами увеличение числа эритроцитов в 1 мкл крови в группах с эффективным эритропозом согласуется с данными литературы. Повышение абсолютного числа эритроцитов в единице объёма крови обозначается как эритроцитоз [Руководство по гематологии, 2002]. Термином «вторичный эритроцитоз» обозначается увеличение показателей эритроцитоза, связанное с реактивным раздражением гемопоэза. Вторичные эритроцитозы делятся на относительные и абсолютные. В случае повышенной продукции эритропоэтина клетками юктагломерулярного аппарата почек, возникающей в ответ на гипоксию, отмечающуюся при различных заболеваниях, в группу которых входят также и злокачественные пролиферативные заболевания системы крови, начинается мобилизация гемопоэтических стволовых клеток в направлении эритропоза, что приводит к появлению абсолютного эритроцитоза [Галеева, Гайнуллина, 2009].

Падение числа ретикулоцитов вплоть до их полного отсутствия на мазке крови, наблюдаемое нами в ~50% случаев ОМЛ и ОЛЛ может быть связано с несколькими факторами, влияющими прямо или опосредованно. При развитии лейкозов в ряде случаев наблюдается явление спленомегалии, выражающееся в проявлении компенсаторной гиперплазии костного мозга именно тех клеточных линий, уровень которых снизился в циркуляции, с преобладанием незрелых предшественников эритроцитов. В норме селезенка задерживает ретикулоциты на 1–2 суток, но при спленомегалии может происходить усиленное разрушение клеток крови, в том числе эритроидных, благодаря увеличению времени нахождения клеток в среде, бедной

питательными веществами и богатой макрофагами [Кулешова, Кизунова, 2017].

Установленные в ходе эксперимента особенности рельефа поверхности ретикулоцитов, в частности, увеличение линейных размеров впадин на поверхности и выраженная шероховатость, указывают на усиление процессов эндо- и экзоцитоза, за счёт которых незрелые клетки созревают в эритроциты, теряя часть своей мембраны и остатки внутриклеточных органелл [A detailed study of..., 2006; In vitro maturation..., 2005]. Согласно данным литературы, более молодые ретикулоциты демонстрируют повышенную способность к экстррузии окисленных отходов через процессы экзо- и эндovesикуляции [Dumaswala, Greenwalt, 1984].

Снижение жёсткости мембраны ретикулоцитов, установленное в обеих опытных группах больных острыми лимфо- и миелобластными лейкозами, вероятно, выступает ключевым компенсаторно-приспособительным механизмом, позволяющим клеткам легче мигрировать сквозь эндотелий сосудов. Согласно данным ряда авторов опухолевый клон и/или противоопухолевая терапия нарушают нормальную сосудистую функцию. Так, имеются данные о повышенной встречаемости заболеваний сердечно-сосудистой группы у лиц, выживших после острого лимфобластного лейкоза по сравнению со здоровой группой [Ruble et al, 2015; Arterial stiffness..., 2017]. В качестве дополнительных факторов, обуславливающих повышение жёсткости и эндотелиальную дисфункцию, исследователи указывают некоторые схемы химиотерапии, подразумевающие использование препаратов антрациклинового ряда (доксорубицин, дауномицин и другие), в том числе распространённая доксорубицин-винкристин-дексаметазон терапия [Anthracycline causes..., 2012]. Доказано, что действие препаратов вызывает эндотелий-зависимую релаксацию, оказывает цитотоксическое действие на клетки эндотелия сосудов, особенно в сосудах небольшого диаметра [Aortic stiffness..., 2010].

## ВЫВОДЫ

1. В условиях физиологической регенерации системы крови цитокинетические показатели эритроцитарного баланса между мужчинами и женщинами существенно не различались. Суточная величина костномозговой продукции эритроцитов у женщин составила  $202,39 \pm 32,76$  тыс./ $(\text{мкл} \cdot \text{сут})$ , у мужчин –  $201,98 \pm 24,35$  тыс./ $(\text{мкл} \cdot \text{сут})$ .

2. Значения цитокинетических показателей эритроцитарного баланса при развитии острого лимфобластного и острого миелобластного лейкозов увеличиваются, соотношение между созревающими клетками и прибывающими остаётся неизменным. Распределение ретикулоцитов смещается в сторону увеличения процентной доли незрелых ретикулоцитов за счёт появления клеток I и II классов.

3. При развитии злокачественных пролиферативных процессов в системе крови циркулируют ретикулоциты, объём и площадь поверхности которых увеличены по сравнению с контролем.

4. Поверхность цитоплазматической мембраны ретикулоцитов больных острым миелобластным лейкозом характеризуется выраженной шероховатостью, ширина и глубина инвагинаций увеличена по сравнению с контролем. Рельеф поверхности клеток больных острым лимфобластным лейкозом характеризуется наличием инвагинаций с увеличенной шириной.

5. Ретикулоциты больных ОМЛ и ОЛЛ характеризуются сниженной жёсткостью цитоплазматической мембраны.

## Список литературы

1. Алгоритм исследования адаптационных возможностей эритрона / Т. П. Бондарь [и др.] // Веснік МДПУ імя І. П. Шамякіна. 2007. Т. 17, № 2. С. 30–35.
2. Артамонова М. Н., Потатуркина-Нестерова Н. И. Исследование топографии поверхности *Bacillus subtilis* в условиях гипотермии // Фундаментальные исследования. 2014. № 11-5. С. 1035–1039.
3. Артюхов В. Г., Наквасина Н. А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж: Изд-во Воронежского гос. ун-та, 2000. 296 с.
4. Блиндарь В. Н., Зубрихина Г. Н. Диагностическая значимость определения уровня эритропоэтина в клинической практике (обзор литературы) // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2007. Т. 18, № 1. С. 10–16.
5. Болелова С. М. Особенности кислотной резистентности эритроцитов у беременных с бронхиальной астмой на фоне герпесвирусной инфекции // Бюл. физ. и пат. дых.. 2006. № S23. С. 21–24.
6. Булгакова В. А. Клиническое значение изучения маркеров активации и апоптоза иммунокомпетентных клеток при атопической бронхиальной астме у детей // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. 2009. Т. 87, № 2. С. 12–18.
7. Вересов В. Г. Структурная биология апоптоза. Минск: Белорусская наука, 2008. 398 с.
8. Воробьёв А. И., Бриллиант М. Д., Чертков И. Л. Современная схема кроветворения и возможные мишени гемобластозов // Терапевтический архив. 1981. Т. 53, № 9. С. 3–14.
9. Галеева А. В., Гайнуллина Э. А. Клинический анализ крови в практике врача-педиатра // Практическая медицина. 2009. Т. 39, № 7. С. 16–21.
10. Гематология: Новейший справочник / под ред. К. М. Абдулкадырова. Москва: Эксмо, 2004. 928 с.

11. Гликозаминогликаны эритробластических островков при угнетении и последующей стимуляции эритропоэза / М. Ф. Харченко [и др.] // Физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 1995. Т. 81, № 7. С. 141–144.
12. Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д. Справочник по гематологии с атласом микрофотограмм. Томск: ТГУ, 1965. 273 с.
13. Жетищев Р. А. Ранняя анемия недоношенных детей (механизмы регуляции эритропоэза, кроветворение плода и новорожденного, патофизиология анемии, методы её терапии). Нальчик: Каб.-Балк. ун-т, 2003. 57 с.
14. Жибурт Е. В. Трансфузиология: учебник. Санкт-Петербург: Питер, 2002. 736 с.
15. Захаров Ю. М. О факторах, регулирующих эритроцитарную картину крови // Бюллетень экспериментальной биологии. 1970. Т. 70, № 11. С. 40–43.
16. Захаров Ю. М., Рассохин А. Г. Эритробластический островок. Москва: Медицина, 2002. 280 с.
17. Захаров Ю. М., Тишевская Н. В. Динамика клеточного состава эритробластических островков при культивировании *in vitro* // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2001. Т. 87, № 1. С. 84–89.
18. Зинчук В. В., Глуткин С. В., Шульга Е. В. Эритропоэтин и кислородтранспортная функция крови // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. Т. 75, № 1. С. 39–42.
19. Иванов В. П., Полоников А. В., Солодилова М. А. Белки клеточных мембран и сосудистые дистонии у человека / под ред. В. П. Иванова. Курск: КГМУ, КМИ, 2004. 280 с.
20. Кишкун А. А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции: руководство для врачей. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 973 с.
21. Кленова Н. А., Кленов Р. О. Строение, метаболизм и функциональная



- активность эритроцитов человека в норме и патологии. Самара: изд-во Самарского университета. 2009. 116 с.
22. Корнеева И. Т., Поляков С. Д., Маянский Н. А. Ретикулоциты и их субпопуляции у юных пловцов различной спортивной квалификации // Российский педиатрический журнал. 2014. Т. 17, № 4. С. 20–22.
  23. Криволапов Ю. А. Биопсии костного мозга. Москва: Практическая медицина, 2014. 528 с.
  24. Кулешова Е. В., Кизунова Ю. В. Первичная диагностика острого лимфобластного лейкоза // Смоленский медицинский альманах. 2017. № 3. С. 1–10.
  25. Лабораторная диагностика анемий: пособие для врачей / Долгов В. В. [и др.]. Тверь: каф. КЛД РМАПО, 2009. 147 с.
  26. Леонова Е. В., Чантурия А. В., Висмонт Ф. И. Патофизиология системы крови. Минск: Вышэйшая школа, 2013. 144 с.
  27. Липунова Е. А., Скоркина М. Ю. Система красной крови: сравнительная физиология. Белгород: изд-во БелГУ, 2004. 216 с.
  28. Луговская С. А., Почтарь М. Е. Гематологический атлас. Москва; Тверь: Триада, 2011. 368 с.
  29. Маркелова Е. В., Костюшко А. В., Красников В. Е. Патогенетическая роль нарушений в системе цитокинов при инфекционно-воспалительных заболеваниях // Тихоокеанский медицинский журнал. 2008. № 3. С. 24–29.
  30. Меерсон Ф. З. Пластическое обеспечение функций организма (роль взаимосвязи генетического аппарата и физиологической функции клетки в приспособительных реакциях здорового и больного человека). Москва: Наука, 1967. 318 с.
  31. Моделирование морфологии эритроцита и расчет внутриклеточного давления по данным атомно-силовой микроскопии / Ю. С. Нагорнов [и др.] // Российский журнал биомеханики. 2015. Т. 19, № 4. С. 398–408.
  32. Молекулярная биология клетки: в 3-х томах. Т. 1 / Б. Альбертс [и др.]. М.; Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт

- компьютерных исследований. 2013. 808 с.
33. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / В. В. Новицкий [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. 2006. Т. 5, № 2. С. 62–68.
34. Некоторые методические вопросы исследования эритроцитарного баланса по данным подсчета инкубированных ретикулоцитов / А. В. Илюхин [и др.] // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1982. Т. 16, № 3. С. 86–88.
35. Новиков Н. М. Ингибция эритропоэза при полицитемии, вызванной трансфузией взвеси нормобластов и ретикулоцитов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1977. Т. 21, № 1. С. 53–58.
36. Новикова И. А., Ходулева С. А. Клиническая и лабораторная гематология. Минск: Вышэйшая школа, 2013. 446 с.
37. Окорочков А. Н. Диагностика болезней внутренних органов. Диагностика болезней системы крови. Москва: Мед. литература, 2001. 512 с.
38. Пат. 2466401 Российская Федерация G01N33/49 Способ определения упругости клеток крови / М. Ю. Скоркина, Е. А. Сладкова, Н. А. Забиняков – заявитель и патентообл. БелГУ, № 2011109741, дата приоритета от 15.03.2011.
39. Рассохин А. Г. Эритробластические островки костного мозга и их место в эритроците в норме, и при изменении состояния эритропоэза в организме: Автореф. дис... докт. медиц. наук. Челябинск, 1997. 52 с.
40. Ренин-ангиотензиновая система в регуляции гемопоэза / Канаева М. Л. [и др.] // Онкогематология. 2017. Т. 12, № 4. С. 50–56.
41. Руководство по гематологии Т. 3 / под ред. А. И. Воробьева. Москва: Ньюдиамед, 2002. 300 с.
42. Руководство по гистологии. Т. 1 / под ред. Р. К. Данилова. СПб.: СпецЛит, 2011. 832 с.
43. Серебрякова Е. Н., Волосников Д. К., Рыжкова А. И. Оценка эритропоэза

- у новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности // Рос. вестн. перинатол. и педиат. 2012. Т. 57, № 2. С. 12–17.
44. Система эритрона и выраженность миелофиброза при хроническом миелолейкозе, множественной миеломе и хроническом лимфолейкозе после химиотерапии / Т. Ю. Долгих [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 5. 196 с.
45. Скобин В. Б. Ингибирующее действие факторов некроза опухолей на синтез эритропоэтина // Материалы VII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва, 2000. С. 430.
46. Снегирева Л. В. Реологические свойства эритроцитов в их онтогенезе: Автореф. дис... канд. биолог. наук. Курск, 2004. 167 с.
47. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях / В. В. Мороз [и др.] // Общая реаниматология. 2012. Т. 8, № 1. С. 52–60.
48. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М. К. Боровская [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. 2010. № 3. С. 334–354.
49. Стуклов Н. И. Компьютерная морфометрия ретикулоцитов в норме и при анемических состояниях: Автореф. дис... канд. мед. наук. Москва, 2004. 95 с.
50. Типовая реакция периферического звена эритрона при патологических процессах / Н. В. Рязанцева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. 2002. Т. 1, № 1. С. 29–35.
51. Тишевская Н. В. Экспериментальные исследования регуляции эритропоэза в культуре эритробластических островков: Автореф. дис... докт. мед. наук. Курган, 2005. 261 с.
52. Трошкина Н. А., Циркин В. И., Дворянский С. А. Эритроцит: строение и функции его мембраны // Вятский медицинский вестник. 2007. №2–3. С. 32–40.
53. Физиология человека / под ред. В. М. Покровского, Г. Ф. Коротько. Москва: Медицина, 2003. 656 с.

54. Черный В. И., Нестеренко А. Н. Нарушения иммунитета при критических состояниях: Особенности диагностики // Внутренняя медицина. 2007. № 4. С. 16–28.
55. Чертков И. Л., Воробьев А. И. Современная схема кроветворения // Проблемы гематологии и переливания крови. 1973. Т. 18, № 10. С. 3–13.
56. Шевяков С. А., Захаров Ю. М. Исследование роли фактора некроза опухоли-альфа в регуляции эритропоэза в культуре эритробластических островков // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2013. Т. 99, № 8. С. 994–1001.
57. Эритропоэтин как модулятор цитокин-синтезирующей активности клеток эритроидного ряда / С. В. Сенников [и др.] // Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1, № 1. С. 25–28.
58. A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence / Gifford S. C. [et al.] // British Journal of Haematology. 2006. Vol. 135, № 3. Pp. 395–404.
59. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes / S. Masuda [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269, № 30. Pp. 19488–19493.
60. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin / M. M. Rhodes [et al.] // Blood. 2008. Vol. 111, № 3. Pp. 1700–1708.
61. Anthracycline causes impaired vascular endothelial function and aortic stiffness in long term survivors of childhood cancer / Z. Jenei [et al.] // Pathology & Oncology Research. 2012. Vol. 19, № 3. Pp. 375–383.
62. Aortic stiffness increases upon receipt of anthracycline chemotherapy / N. Chaosuwannakit [et al.] // Journal of Clinical Oncology. 2010. Vol. 28, № 1. Pp. 166–172.
63. Arterial stiffness in hematologic malignancies / I. Mozos [et al.] // OncoTargets and Therapy. 2017. Vol. 10. Pp. 1381–1388.

64. Autonomous control of terminal erythropoiesis via physical interactions among erythroid cells / H. S. Choi [et al.] // *Stem Cell Research*. 2013. Vol. 10, № 3. Pp. 442–453.
65. Bateman A. E. Cell specificity of chalone-type inhibitors of DNA synthesis released by blood leucocytes and erythrocytes // *Cell Proliferation*. 1974. Vol. 7, № 5. Pp. 451–461.
66. Bessis M. Erythroblastic islands, functional unity of bone marrow // *Revue d'hematologie*. 1958. Vol. 13, № 1. Pp. 8–11.
67. Blanc L., Vidal M. Reticulocyte membrane remodeling: contribution of the exosome pathway // *Current Opinion in Hematology*. 2010. Vol. 17, № 3. Pp. 177–183.
68. Capella B., Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy // *Surface Science Reports*. 1999. Vol. 34, № 1. Pp. 1–3.
69. Castle W. B., Minot G. R. Pathological physiology and clinical description of the anemias. New York: Oxford University Press, 1936. 205 p.
70. Chasis J. A., Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis // *Blood*. 2008. Vol. 112, № 3. Pp. 470–478.
71. Chong Z. Z., Kang J-Q., Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2002. Vol. 22, № 5. Pp. 503–514.
72. Clearance of apoptotic cells and pyrenocytes / S. Toda [et al.] // *Current Topics in Developmental Biology*. 2015. Vol. 114. Pp. 267–295.
73. Deolindo P., Evans-Osses I., Ramirez M. I. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication // *Biochemical Society Transactions*. 2013. Vol. 41, № 1. Pp. 252–257.
74. Dumaswala U. J., Greenwalt T. J. Human erythrocytes shed exocytic vesicles in vivo // *Transfusion*. 1984. Vol. 24, № 6. Pp. 490–492.
75. Dygai A. M., Zhdanov V. V. *Theory of Hematopoiesis Control*. Switzerland: Springer, 2014. 93 p.
76. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? / F. L. A. Willekens [et

- al.] // *British Journal of Haematology*. 2008. Vol. 141, № 4. Pp. 149–156.
77. *Essentials of stem cell biology* / edit. R. P. Lanza [et al.] San Diego, USA; London, UK: Academic Press, 2009. 605 p.
78. Extruded erythroblast nuclei are bound and phagocytosed by a novel macrophage receptor / L. B. Qui [et al.] // *Blood*. 1995. Vol. 85, № 6. Pp. 1630–1639.
79. Forscher B. K., Houck J. C. *Chalones: concepts and current researches*. Washington: U.S. National Cancer Institute, 1973. 233 p.
80. From the cradle to the grave: the role of macrophages in erythropoiesis and erythrophagocytosis / T. R. L. Klei [et al.] // *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. Pp. 1–13.
81. Harding C. V., Heuser J. E., Stahl P. D. Exosomes: looking back three decades and into the future // *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 200, № 4. Pp. 367–371.
82. Hemoglobin switching in unicellular erythroid culture of sibling erythroid burst-forming units: kit ligand induces a dose-dependent fetal hemoglobin reactivation potentiated by sodium butyrate / M. Gabbianelli [et al.] // *Blood*. 2000. Vol. 95, № 11. Pp. 3555–3561.
83. Immenschuh S., Baumgart-Vogt E., Mueller S. Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance // *Current Drug Targets*. 2010. Vol. 11, № 12. Pp. 1541–1550.
84. In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes / M. J. Koury [et al.] // *Blood*. 2005. Vol. 105, № 5. Pp. 2168–2174.
85. Johnstone R. M. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins // *Biochemistry and Cell Biology*. 1991. Vol. 70, № 3–4. Pp. 179–190.
86. Lutz H. U. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance // *Cellular and Molecular Biology*. 2004. Vol. 50, № 2. Pp. 107–116.
87. Membrane remodeling during reticulocyte maturation / G. Liu [et al.] // *Blood*. 2010. Vol. 115, № 10. Pp. 2021–2027.

88. Microvesicle entry into marrow cells mediate tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription / J. M. Aliotta [et al.] // *Experimental Hematology*. 2010. Vol. 38, № 3. Pp. 233–245.
89. Migliaccio A. R. Erythroblast enucleation // *Haematologica*. 2010. Vol. 95, № 12. Pp. 1985–1988.
90. Oldenborg P-A., Gresham H. D., Lindberg F. P. CD47-signal regulatory protein  $\alpha$  (Sirp $\alpha$ ) regulates Fc $\gamma$  and complement receptor-mediated phagocytosis // *Journal of Experimental Medicine*. 2001. Vol. 193, № 7. Pp. 855–862.
91. Palis J. Interaction of the macrophage and primitive erythroid lineages in the mammalian embryo // *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 7. Pp. 1–8.
92. Pan B-T., Johnstone R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor // *Cell*. 1983. Vol. 33, № 3. Pp. 967–978.
93. Progress in detecting cell-surface protein receptors: the erythropoietin receptor example / S. Elliott [et al.] // *Annals of Hematology*. 2014. Vol. 93, № 2. Pp. 181–192.
94. Rivella S. Ineffective erythropoiesis and thalassemias // *Current Opinion in Hematology*. 2009. Vol. 16, № 3. Pp. 187–194.
95. Ruble K., Davis C. L., Han H-R. Endothelial health in childhood acute lymphoid leukemia survivors: pilot evaluation with peripheral artery tonometry // *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2015. Vol. 37, № 2. Pp. 117–120.
96. Russell B. M., Cooke B. M. The rheopathobiology of *Plasmodium vivax* and other important primate malaria parasites // *Trends in Parasitology*. 2017. Vol. 33, № 4. Pp. 321–334.
97. Samuel E. L. IV. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions // *Blood*. 2016. Vol. 127, № 2. Pp. 187–199.
98. Sawyers S. T., Krantz S. B., Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta // *Blood*. 1989. Vol. 74, № 1. Pp. 103–109.
99. Sherwood L., Klandorf H., Yancey P. H. *Animal physiology*. Belmont, USA:

- Brooks/Cole, 2005. 896 p.
100. Shih Y–J., Rothfield L. The bacterial cytoskeleton // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006. Vol. 70, № 3. Pp. 729–754.
101. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science*. 1972. Vol. 175, № 4023. Pp. 720–731.
102. Stohlman F. J., Brecher G. Humoral regulation of erythropoiesis V. Relationship of plasma erythropoietine level to bone marrow activity // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1959. Vol. 100, № 1. Pp. 40–43.
103. The process of erythropoiesis. URL: <http://epomedicine.com/medical-students/erythropoiesis-simplified/> (дата обращения: 10.01.2018).
104. Toobiac S., Shaklai M., Shaklai N. Carbon monoxide induced erythroid differentiation of K562 cells mimics the central macrophage milieu in erythroblastic islands // *PloS one*. 2012. Vol. 7, № 3. Pp. 1–8.
105. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis / P. D. Kingsley [et al.] // *Blood*. 2004. Vol. 104, № 1. Pp. 19–25.
106. Zhang A-S., Enns C. A. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284, № 2. Pp. 711–715.