

Морфологическое исследование костного мозга при врожденной дизэритропоэтической анемии: селективное обогащение популяций клеток для световой и электронной микроскопии с помощью биочипа и центрифугирования в градиенте плотности

С.И. Обыденный¹, О.С. Федянина^{1, 2}, А.Н. Хвастунова^{1, 2}, А.О. Закирова¹, М.А. Пантелеев^{1, 2, 3}, И.И. Киреев³, С.А. Кузнецова^{1, 2}, Н.С. Сметанина^{1, 4}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁴ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Контактная информация:

Кузнецова Софья Алексеевна,
ученый секретарь ВШМЭМ, НИИЦ
детской гематологии, онкологии и
иммунологии им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570
E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com

Врожденные дизэритропоэтические анемии – группа редких наследственных заболеваний, характеризующихся неэффективным эритропоэзом и многочисленными морфологическими нарушениями в эритроблестах. Их дифференциальная диагностика требует морфологического исследования популяций клеток костного мозга, которые зачастую присутствуют в незначительных количествах и требуют селективного обогащения. В работе представлен опыт использования различных (в том числе разработанных авторским коллективом) методов для выделения и концентрирования редких клеток костного мозга при дизэритропоэтической анемии с целью их морфологического анализа методами световой и электронной микроскопии.

Ключевые слова: врожденная дизэритропоэтическая анемия, морфология, электронная микроскопия, клеточный биочип.

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-104-107

Bone marrow cell morphology in congenital diserythropoietic anemia: selective enrichment of the studied cell population for light and electron microscopy using a microarray and centrifugation in a density gradient

S.I. Obyedennyi¹, O.S. Fedyanina^{1, 2}, A.N. Khvastunova^{1, 2}, A.O. Zakirova¹, M.A. Panteleev^{1, 2, 3}, I.I. Kireev³, S.A. Kuznetsova^{1, 2}, N.S. Smetanina¹

¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

² Centre for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Moscow

³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Correspondence:

Sofiy A. Kuznetsova, Academic
secretary of High school of Molecular
and Experimental Medicine, Dmitriy
Rogachev National Medical Research
Center of Pediatric Hematology,
Oncology, Immunology Ministry of
Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow,
Samory Mashela st., 1
Tel.: +7 (495) 287-6570
E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.
comu

Congenital diserythropoietic anemias are a group of rare inherited diseases causing ineffective erythropoiesis and multiple morphological changes in erythroblasts. Their differential diagnosis involves a study of the morphology of minor bone marrow cell populations that requires a selective cell enrichment. Here we describe two methods of the population enrichment by erythroid cells (including the self-developed cell-binding microarray) for their subsequent study by methods of light and electron microscopy.

Key words: congenital diserythropoietic anemia, morphology, electron microscopy, cell-binding microarray.

Врожденные дизэритропоэтические анемии – группа редких наследственных заболеваний, характеризующихся неэффективным эритропоэзом и многочисленными морфологическими нарушениями в эритроблестах, препятствующими образованию нормально функционирующих эритроцитов. Несмотря на то что многие гены, мутации в

которых связаны с врожденными дизэритропоэтическими анемиями (ВДА), определены, первым этапом в дифференциальной диагностике между ВДА и другими типами гемолитических анемий и между ВДА I–IV типов является морфологическое и электронно-микроскопическое исследование эритроидных предшественников в костном мозге пациентов.

Значительное изменение соотношения между мие-лоидными и ядерными эритроидными предшественниками (0,3–1,1 – для ВДА типа I и 0,1–1,1 [1] – для ВДА типа II при 95%-м доверительном интервале для нормального костного мозга 1,1–4,1 [2]) и морфологические дефекты эритробластов, характерные для ВДА (наличие двуядерных или многоядерных эритробластов, не полностью разделившихся ядер, хроматиновых мостиков между ядрами), хотя и не являются специфичными для различных типов дизэритропоэтической анемии, могут служить надежным указанием на ее возможное присутствие. Поэтому первый обязательный этап в дифференциальной диагностике ВДА – подробный морфологический анализ незрелых эритроидных клеток в костном мозге [3]. Эритроидные предшественники при ВДА имеют также характерные морфологические нарушения, выявляемые методом электронной микроскопии (гетерохроматин со структурой «швейцарского сыра», характерный для эритробластов ВДА типа I; двойная плазматическая мембрана эритробластов при ВДА типа II, проникающие в гетерохроматин выросты цитоплазмы при ВДА типа III) [4].

Основная проблема исследования морфологических дефектов эритробластов в костном мозге – их сравнительно невысокая концентрация. Анализ эритроидных предшественников при дифференциальной диагностике ВДА с помощью электронной микроскопии проводится в лейкоконcentратах, полученных при естественном осаждении клеток в пунктате костного мозга (*buffy coat*), а морфологический анализ – в мазках.

Ранее было показано, что морфологическое исследование малочисленных подгрупп лейкоцитов крови и костного мозга может быть существенно упрощено при использовании клеточного биочипа – прозрачной подложки с иммобилизованными на ней антителами к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов [5, 6]. При инкубации суспензии лейкоцитов с биочипом клетки специфически связываются в тех областях биочипа, где иммобилизованы антитела к присутствующим на их поверхности антигенам. После отмывки биочипа от неспецифически связавшихся клеток на биочипе остаются области, заполненные клетками, несущими определенный поверхностный антиген. Было также показано, что после высушивания и окрашивания по Паппенгейму связавшиеся с биочипом лейкоциты, выделенные из периферической крови [5] или пунктата костного мозга [6], морфологически идентичны лейкоцитам того же типа, исследуемым в мазках. Поэтому использование биочипа с антителами к линейно-специфичным поверхностным антигенам позволяет выделить чистую популяцию клеток данного типа для последующего морфологического исследования.

В данной работе описаны варианты выделения и концентрации эритроидных предшественников из пунктата костного мозга для исследования их морфологии с помощью световой и электронной микроскопии при дифференциальной диагностике врожденной дизэритропоэтической анемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изготовление биочипов. Биочипы изготавливали в соответствии с ранее опубликованными протоколами [5, 6]. Для выделения эритроидных предшественников на биочип наносили антитела к CD235a (eBioscience, USA) и панлейкоцитарному антигену CD45 (eBioscience, USA).

Выделение мононуклеарной фракции из пунктата костного мозга производили методом центрифугирования в градиенте *Histopaque* 1077 в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ лейкоцитов при помощи клеточного биочипа. Анализ мононуклеарной фракции, выделенной из пунктата костного мозга, при помощи клеточного биочипа был выполнен в соответствии с описанием [6] с использованием окраски по Паппенгейму. Морфологию лейкоцитов на биочипе анализировали при помощи светового микроскопа *Nikon Eclipse Ni* в светлом поле на увеличении $\times 1000$ и камеры *Nikon DS-Ri1*.

Электронная микроскопия. Клетки из пунктата красного костного мозга фиксировали 2,5%-м глутаровым альдегидом, отмывали от фиксирующего раствора и постфиксировали 1%-м водным раствором тетраоксида осмия, затем снова отмывали с последующей дегидратацией в восходящих концентрациях этанола. Допускалось хранение образца в 70%-м этаноле при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до заключения в смолу. Перед заключением в смолу *Epon* 812 [7] дегидратацию доводили до конца при помощи нескольких инкубаций образца с 96%-м этанолом и 100%-м ацетоном. Далее производили пропитку смолой: сначала образец пропитывали растворами из смолы и ацетона, затем только смолой, после этого производили полимеризацию смолы при $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ не менее суток.

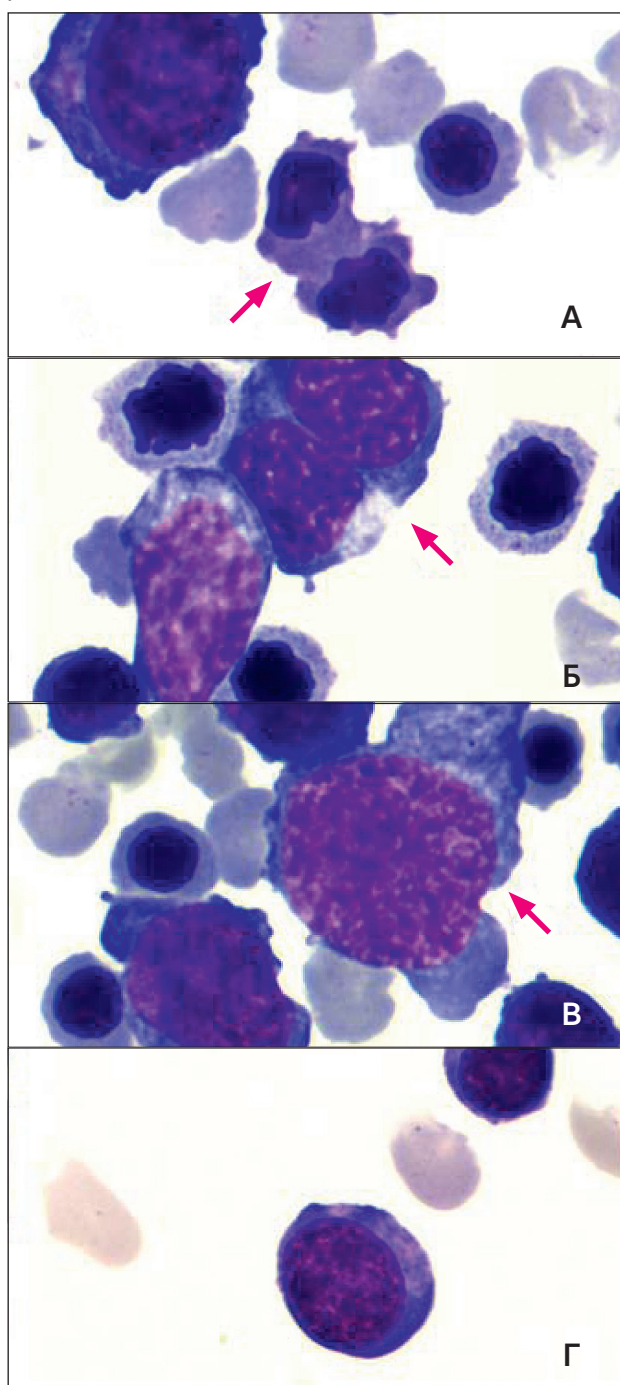
Полимеризованные блоки нарезали на ультратоме *Ultracut E* (Reichert, Австрия), полученные ультратонкие срезы помещали на медные сеточки и контрастировали 30 мин 2%-м уранилацетатом, а затем 5 мин цитратом свинца [8]. Готовые срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL).

Пациенты. Исследование морфологии эритроидных предшественников на биочипе после окраски по Паппенгейму было проведено для трех пациентов мужского пола в возрасте от 1 до 13 лет с по-

дозрением на дизэритропоэтическую анемию. Этим пациентам был поставлен диагноз «наследственная гемолитическая анемия неуточненная». В качестве контроля использовали образцы пунктатов костного мозга четырех здоровых доноров (трое мужчин и одна женщина) в возрасте от 10 до 43 лет. Электронно-ми-

Рисунок 1

Морфология эритроидных предшественников на клеточном биочипе (А–В); морфологические изменения в эритроидных предшественниках, выделенных из костного мозга пациента, поступившего с подозрением на дизэритропоэтическую анемию и связанвшегося на биочипе с анти-CD235a (окончательный диагноз: «наследственная гемолитическая анемия неуточненная»): митоз на стадии полихроматофильного эритрокариота (А), двуядерный базофильный эритробласт (Б), мегалобласт (В); нормальные эритроидные предшественники (Г); стрелками указаны патологические изменения

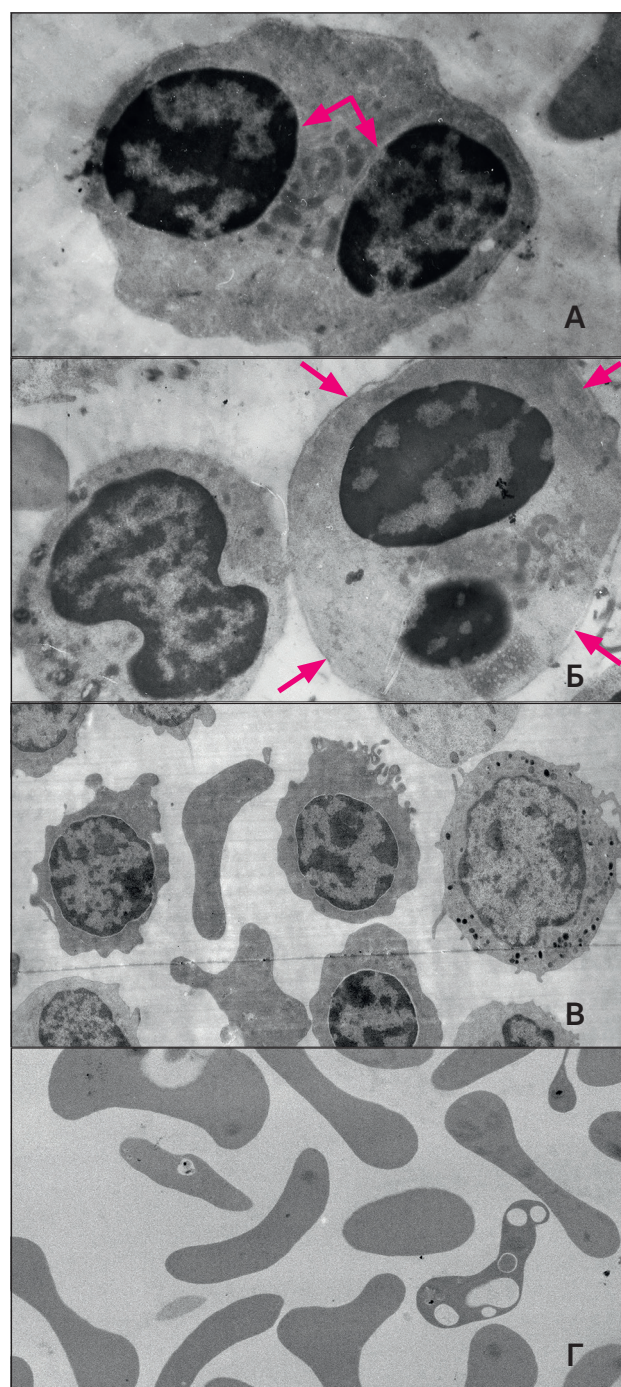


кроскопическое исследование мононуклеарной фракции пунктатов костного мозга было проведено для 8 пациентов.

Согласие доноров и пациентов на забор костного мозга и будущие биомедицинские исследования были получены.

Рисунок 2

Электронная микроскопия эритроидных предшественников пациентов, поступивших с подозрением на врожденную дизэритропоэтическую анемию; наличие нескольких ядер (А, белые стрелки) и двойной мембраны (Б, черные стрелки) может соответствовать ВДА типа II, $\times 4000$ (В). Типичное поле зрения на электронном микроскопе пунктата красного костного мозга с использованием методики выделения мононуклеарной фракции (В, $\times 2000$) и без использования методики (Г)



РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология эритроидных предшественников на клеточном биочипе. После инкубации мононуклеарной фракции пунктата костного мозга с биочипом и отмывки неспецифически связавшихся клеток в области с иммобилизованными антителами к гликофору А (CD235a) остаются только клетки эритроидной природы. Гликофорин А присутствует на созревающих эритроидных клетках, начиная со стадии проэритробласта [9]. Изучение клеток, связавшихся на биочипе с анти-CD235a, позволяет исследовать чистую популяцию эритроидных предшественников и упрощает выявление морфологических изменений, характерных для различных типов дизэритропоэтической анемии [1]. На *рисунке 1 г* представлены клетки эритроидной природы, выделенные из пунктата костного мозга здорового донора и связавшиеся на биочипе с антителом к гликофору А. Среди эритроидных предшественников у всех исследованных пациентов присутствовали мегалобластоидные эритробласты, кроме того, у одного пациента были обнаружены митозы на стадии полихроматофильного нормобласта и отдельные двоядерные эритробласты (*рис. 1 а-в*). Мегалобластоидность и митозы на поздних стадиях развития эритроидных предшественников встречаются при различных нарушениях эритропоэза, а количество двоядерных эритробластов ни у одного из пациентов не превышало 1%. Морфологическая картина эритрокариоцитов у исследованных пациентов не соответствует врожденной дизэритропоэтической анемии.

Морфология эритроидных предшественников в электронной микроскопии. Результаты анализа представлены на *рисунке 2*. Данные панелей на *рисунках 2 а-б* показывают наличие множественных ядер и двойной мембраны, согласующейся с ВДА типа II. Использование обогащения позволяет наблюдать увеличение количества эритроидных предшественников в каждом образце (*рис. 2 в*). В отсутствии обогащения в препаратах костного мозга доминируют эритроциты (*рис. 2 г*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование биочипа с иммобилизованными на нем антителами к CD235a и CD45 ускоряет и упрощает исследование морфологии эритрокариоцитов у пациентов с подозрением на дизэритропоэтическую анемию за счет выделения чистой популяции эритроидных предшественников. Для электронной микроскопии возможно обогащение концентрацией в градиенте плотности.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантами РФФИ 16-34-01030, 16-04-00282, 16-34-01342, 17-04-01309 и 18-015-00272, а также грантом Президента РФ МД-229.2017.4.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

С.И. Обыденный <http://orcid.org/0000-0002-2930-8768>
А.Н. Хвастунова <http://orcid.org/0000-0002-7117-0168>
М.А. Пантелеев <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>
И.И. Киреев <http://orcid.org/0000-0001-9252-6808>
С.А. Кузнецова <http://orcid.org/0000-0001-5946-0026>
Н.С. Сметанина <http://orcid.org/0000-0003-2756-7325>

Литература

- Heimpel H., Kellermann K., Neuschwander N., Högel J., Schwarz K. The morphological diagnosis of congenital dyserythropoietic anemia: results of a quantitative analysis of peripheral blood and bone marrow cells. *Haematologica* 2010; 95 (6): 1034–6.
- Bain B.J. The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Hematol* 1996; 94: 206–9.
- Gambale A., Iolascon A., Andolfo I., Russo R. Diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anemias. *Expert review of hematology* 2016; 9 (3): 283–96.
- Heimpel H., Forteza-Vila J., Queisser W., Spiertz E. Electron and light microscopic study of the erythroblasts of patients with congenital dyserythropoietic anemia. *Blood* 1971; 37 (3): 299–310.
- Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.S., Filatov A.V., Vorobjev I.A., F. Ataulakhonov. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Scientific reports* 2015; 5 (1).
- Федянина О.С., Закирова А.О., Задорожная А.Е., Капранов Н.М., Хвастунова А.Н., Ядгарова П.А., Филатов А.В., Бурова О.С., Атауллаханов Ф.И., Кузнецова С.А. Исследование морфологии и распределения α -нафтилбутират-эстеразы и нафтол-AS-D-хлорацетат-эстеразы в нормальных предшественниках лейкоцитов миелоидного роста с помощью клеточного биочипа. *Онкогематология* 2016; 11 (4): 74–9.
- Luft J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1961; 9 (2): 409–14.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology* 1963; 17 (1): 208–12.
- Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. Изд. 3-е, доп. –Москва–Тверь: Триада, 2011, 368 с.