

# МОРФОЛОГИЯ И МИКРОБИОМЕН ПРОФИЛ НА КРЪВНИ ПРОБИ ОТ ЗДРАВИ ЛИЦА С ЛАБОРАТОРНО ИНДУЦИРАНИ ХАЙНЦОВИ ТЕЛЦА

В. Цафарова<sup>1</sup>, Й. Ходжев<sup>1, 2</sup>, А. Генералова<sup>1</sup>, А. Александрова<sup>3, 4</sup>, Т. Тянков<sup>3, 4</sup>,  
С. Тодинова<sup>4, 5</sup>, Г. Йорданов<sup>6</sup>, Р. Калфин<sup>7, 8</sup>, С. Панайотов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести – София

<sup>2</sup>Нов български университет – София

<sup>3</sup>Институт по механика, Българската академия на науките – София

<sup>4</sup>Център за компетентност по мехатроника и чисти технологии – MIRACle – София

<sup>5</sup>Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, Българската академия на науките – София

<sup>6</sup>Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Кл. Охридски“

<sup>7</sup>Институт по невробиология, Българската академия на науките – София

<sup>8</sup>Югозападен университет „Неофит Рилски“ – Благоевград

## MORPHOLOGY AND MICROBIOME PROFILE OF BLOOD SAMPLES FROM HEALTHY INDIVIDUALS WITH LABORATORY-INDUCED HEINZ BODIES

B. Tsafarova<sup>1</sup>, Y. Hodzhev<sup>1, 2</sup>, A. Generalova<sup>1</sup>, A. Alexandrova<sup>3, 4</sup>, T. Tyankov<sup>3, 4</sup>,  
S. Todinova<sup>4, 5</sup>, G. Yordanov<sup>6</sup>, R. Kalfin<sup>7, 8</sup>, S. Panaiotov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Center for Infectious and Parasitic Diseases – Sofia

<sup>2</sup>New Bulgarian University – Sofia

<sup>3</sup>Institute of Mechanics, Bulgarian Academy of Sciences – Sofia

<sup>4</sup>Center of Competence in Mechatronics and Clean Technologies – MIRACle – Sofia

<sup>5</sup>Institute of Biophysics and Biomedical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences – Sofia

<sup>6</sup>Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia University "Sv. Kl. Ohridski"

<sup>7</sup>Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences – Sofia

<sup>8</sup>South-West University "Neofit Rilski" – Blagoevgrad

**Резюме.** Хайнцовите телца представляват грануларни вътреклетъчни включвания в еритроцитите. Водещата хипотеза е, че хайнцовите телца се образуват в условия на оксидативен стрес и структурно увреждане на хемоглобина. Съвременни данни предполагат, че освен химични фактори, в процеса на тяхното формиране могат да участват и представители на кръвната микробиота. Целта на настоящото пилотно изследване бе да се проследи динамиката на формиране на хайнцови телца в еритроцити под въздействие на индуциран оксидативен стрес и да се анализира микробният профил на третирани проби. Стресови фактори бяха висока температура и високи концентрации на познати соли, индуциращи формирането на хайнцови телца. Свежи кръвни проби от трима здрави доброволци бяха инкубирани при 43°C в присъствие на менадион натриев бисулфит (витамин К) и аминокфенол, а морфологичните промени бяха наблюдавани в реално време чрез светлинна микроскопия и система BioFlux и сканираща електронна микроскопия. Проведено беше таргетно 16S рДНК секвениране за оценка на микробния състав преди и след инкубиране. Още в първите минути на третиране морфологичният анализ показва формиране на грануларни включвания, а след 90-150 минути се установи значително увеличаване на процента клетки с хайнцови телца. Микробиомният анализ на ДНК, изолирана от нетретирани еритроцити и чисти хайнцови телца, доказва преобладаващо присъствие на представители от типове *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. При всички изследвани групи проби не бе наблюдавана загуба на микробно разнообразие, следствие на процедурите на третиране и изолване на ДНК. В стресирани проби с хайнцови телца доказахме до тридесеткратно увеличение на броя ридове за някои бактериални родове спрямо контролните нетретирани със соли еритроцити. В лизираната еритроцитна маса доказахме култивирани микробиоти с размери 170-180 nm с морфология на хайнцови телца. Витамин К и аминокфенол са силни стресови химични фактори за формиране на хайнцови телца и вероятно двата реагента имат специфични биохимични взаимодействия с клетъчните структури на различните таксони. Получените данни предполагат възможна връзка между оксидативно индуцираната гранулария в еритроцитите и количествените и качествените промени в кръвната микробиота, което подчертава необходимостта от по-нататъшни изследвания върху потенциалната роля на микробни фактори при образуването на хайнцови телца.

**Ключови думи:** хайнцови телца, кръвен микробиом, оксидативен стрес, соли

**Abstract.** Heinz bodies are granular intracellular inclusions found in erythrocytes. The leading hypothesis suggests that they form under conditions of oxidative stress and structural damage of hemoglobin. Recent evidence indicates that, in addition to chemical factors, members of the blood microbiota may also participate in their formation. The aim of this pilot study was to track the dynamics of Heinz body formation in erythrocytes under induced oxidative stress and to analyze the associated microbial profile. High temperature and elevated concentrations of salts known to induce Heinz body formation were used as stress factors. Fresh blood samples from three healthy volunteers were incubated at 43 °C in the presence of menadione sodium bisulfite (vitamin K) and aminophenol. Morphological changes were monitored in real time using light microscopy, a BioFlux system, and scanning electron microscopy. Targeted 16S rDNA sequencing was performed to assess the microbial composition before and after incubation. Morphological analysis demonstrated the appearance of granular inclusions within the first minutes of treatment, followed by a marked increase in the percentage of erythrocytes containing Heinz bodies after 90–150 minutes. Microbiome analysis of DNA from untreated erythrocytes and isolated Heinz bodies showed predominant representation of the phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. No loss of microbial diversity was observed as a result of treatment or DNA isolation procedures. In stress-exposed samples containing Heinz bodies, we detected up to a thirty-fold increase in the number of reads for certain bacterial genera relative to untreated erythrocyte controls. In lysed erythrocyte preparations, we identified cultivable microbial structures measuring 170–180 nm with morphology similar to that of Heinz bodies. Vitamin K and aminophenol acted as strong chemical stressors promoting Heinz body formation and likely exhibited specific biochemical interactions with the cellular structures of different microbial taxa. These findings suggest a possible link between oxidative-stress-induced granulation in erythrocytes and quantitative and qualitative changes in the blood microbiota, highlighting the need for further investigation into the potential role of microbial factors in Heinz body formation.

**Key words:** Heinz bodies, blood microbiome, oxidative stress, salts

## ВЪВЕДЕНИЕ

Хайнцовите телца (Heinz bodies) представляват вътреклетъчни включвания в еритроцитите. Произходът им се свързва с денатуриран или окислен хемоглобин, който се утаява и се прикрепя към вътрешната повърхност на клетъчната мембрана. Те са описани за първи път от немския хематолог Роберт Хайнц през 1890 г. в контекста на морфологичните промени в червените кръвни клетки при токсични въздействия и хемолитични анемии [1]. Наличието на хайнцови телца променя механичните свойства на еритроцитите, намалява тяхната деформируемост и ускорява отстраняването им от кръвообращението [2]. Смята се, че увеличаването на броя на хайнцовите телца корелира със симптоми като диспнея, тахикардия, хематурия, умора и дори понижено кръвно налягане [3].

През първата половина на XX век хайнцовите телца са разглеждани като маркер за оксидативен стрес и хемолиза, възникващи вследствие на различни фактори – токсини, медикаменти, дефицит на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (G6PD), таласемии, спленектомия и други патологични състояния [4, 5]. Установено е, че хемоглобинът, следствие на окислително увреждане, може да образува междинен продукт – хемихром, който се свързва с мембранный протеин band 3 и формира ядро за агрегация и поява на хайнцови телца [6]. Класическата хипотеза, че грануларните телца са преципитати на химични структури, е била многократно тествана, но въпреки това не получава еднозначен отговор [7, 8]. В съвременната литература се разглежда и възможността хайнцовите телца да са маркер за стареене на еритроцитите [9]. *In vitro* модели показват, че образуването на хайнцови телца може да се индуцира от витамин К, аминокиселини, натриев тиосулфат, фенилхидразин и други соли [10, 11].

Описаните в литературата вътреклетъчни структури, като хайнцови телца, телца на Russell, телца на Rappenheim, телца на Howell-Jolly, телца на Hamazaki-Wesenberg и др., в еритроцитите и тъканите имат поведение на микробни структури. Могат да нарастват по размер и по брой, делят се и имат микробоподобна морфология. Наличието на микробни компоненти в кръвта и способността да индуцират протеинова агрегация предполагат възможна роля на микроорганизмите като катализатори или нуклеационни центрове при формирането на хайнцови и други грануларни телца [12, 13]. Нашата хипотеза е, че изследването на механизмите на образуване на хайнцовите телца, както и тяхната функционална роля, би било непълно без изследване на потенциалния принос на кръвната микробиота – нейния състав, динамика и биохимични взаимодействия с еритроцита.

Целите на настоящото изследване бяха: 1) да се индуцира и проследи в реално време формирането на хайнцови телца в еритроцити, 2) да се изследва микробният състав на третирани еритроцити чрез таргетно секвениране на 16S рДНК и микробиомен анализ и 3) да се обсъди потенциалния принос на кръвната микробиота за формирането на хайнцовите телца.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### Подбор на изследваните лица

За преглед и изследвания бяха подбрани девет доброволци. След анализ на лабораторните и клиничните резултати в крайното изследване бяха включени пет лица на възраст от 40 до 60 г. – четири жени и един мъж.

Статусът на доброволците беше определен след проведен медицински преглед и кръвни изследвания. Клиничните и лабораторните параметри включваха: снемане на подробна анамнеза и статус, измерване на артериално налягане, пълна кръвна картина (RBC, Hb, Hct, MCV, MCHC, MCH, RDW, WBC, PLT, MPV, PDV, липиден профил, глюкоза). Всички избрани за изследване лица бяха с нормални, референтни за съответния пол и възраст нива на артериално налягане, кръвна захар, холестерол и кръвна картина и отговаряха посочените изисквания.

Задължителните критерии за включване бяха: лицата да бъдат клинично здрави, да бъдат на възраст между 20 и 60 години и изследваните кръвни показатели да са в норма. Задължителните критерии за изключване бяха: телесно тегло равно или под 50 kg; бременност за жените; лицето страда от силна умора; лицето се лекува за подлежащи хронични заболявания, като диабет или други хронични инфекциозни заболявания; лицето е било хоспитализирано през последните две години; лицето е имало трансфузия на кръв и кръвни продукти през последните две години; лицето е приемало антибиотици или системни кортикостероиди през последните шест месеца; на лицето е било прилагано хирургично, стоматологично лечение, татуиране или пиърсинг за последните шест месеца.

### Биологичен материал

Изследвахме кръвни проби, 4 ml венозна кръв, взета в епруветки с K2-ЕДТА като антикоагулант. Кръвните проби бяха от трима здрави доброволци, взети в един ден от един и същ лабораторен специалист. Доброволците подписаха информирано съгласие за изследване. Изследването е одобрено с протокол № 2/2025 от 25.06.2025 г. на Комисията по етика при НЦЗГБ. Изследваните групи материали бяха: неинкубирана и инкубирана чиста еритроцитна маса; инкубиран лизат от еритроцити без соли; инкубирана еритроцитна маса с аминокиселини и еритроцитна маса с витамин К.

### **Подготовка на еритроцитна фракция**

След центрофугиране при 3500 rpm за 5 минути плазмата и фракцията от левкоцити и тромбоцити (buffy coat) бе отстранена, а еритроцитната фракция бе промита трикратно с PBS (фосфатнобуферен физиологичен разтвор, рН 7.4), за да се елиминират остатъчни плазмени протеини, левкоцити и тромбоцити.

### **Инкубационни условия за микроскопско наблюдение**

За индуциране на формирането на хайнцови телца еритроцитите бяха ресуспендирани в съотношение 1:1 с 0.52% глюкозен буфер, съдържащ 2 mg/ml менадион натриев бисулфит (синтетичен витамин К) или 2 mg/ml аминокфенол, и инкубирани при 43°C. Контролните проби бяха ресуспендирани в PBS без добавка на витамин К или аминокфенол. Инкубацията бе проведена за 5, 90 и 150 минути. На всеки времеви интервал се правеше специфично оцветяване за ХТ с добавяне на разтвор на метилвиолет в 0,9% NaCl в съотношение 1:4. Хайнцовите телца се наблюдаваха микроскопски при увеличение 100 х.

### **Микроскопско наблюдение**

За динамично проследяване на процеса бе използвана система BioFlux (Fluxion Biosciences), позволяваща контролирана перфузия и заснемане на еритроцитите в реално време. Микроскопските наблюдения се провеждаха при увеличение 100 х с имерсионно масло и видеоаснемане. На всеки времеви интервал бяха анализирани минимум 100 еритроцита, като се отчетоха процент клетки с видими хайнцови телца и среден брой телца на клетка. Сканиращата електронна микроскопия бе извършена на микроскоп Lyra, Tescan, с детектор Quantax EDS.

### **Статистически анализ**

За анализ използвахме средното таксономично разнообразие, изразено в проценти на ниво тип и род. Резултатите бяха визуализирани във формат бар-графики с помощта на R version 4.5.1 и библиотека ggplot2\_4.0.0. Кодът за обработка на данните е депозиран в хранилището на GitHub, <https://gist.github.com/Rhinrei/3466b3a8390ab8e88fe3bfa2ffa5a5a4>

### **Изолиране на ДНК от хайнцови телца и кръвни микробиоти от еритроцитна маса**

На микробиомен анализ чрез таргетно 16S рДНК секвениране бяха подложени проби с цели и лизирани еритроцити и проби от еритроцитна маса с добавени соли и инкубирани 150 min. За изолиране на ДНК от третирани с витамин К и аминокфенол и нетретирани цели еритроцити подходихме по следния начин: Пробите бяха

центрофугирани на 4°C за 15 min на 5000 rpm. Утайката от еритроцитна маса и хайнцови телца бе разтворена в 200 µl в PBS и лизирана с 1.7 ml дестилирана вода за 30 min на стайна температура. За да улесним лизирането, механично разбихме еритроцитната маса с помощта на 0.3 µm циркониеви перли на апарат Beat Beater два пъти по 180 s при 4000 rpm през интервали от 5 min. Свободните хайнцови телца екстрахирахме с 1 ml етер и трикратно центрофугирахме за 15 min на 5000 rpm с промиване на утайката с фосфатен буфер. Изолирането на ДНК се извърши чрез лизиране на микробната биомаса с TES (Tris, EDTA, SDS) буфер [14].

За изолиране на ДНК от пробите с лизирани еритроцити подходихме по следния начин: Двеста микролитра еритроцитна маса бяха лизирани на стайна температура за 30 min със 700 µl дестилирана вода. За по-добро лизиране приложихме механично биене с 0.3 µm циркониеви перли. Към лизираната смес добавихме 900 µl PBS буфер. Инкубирахме на 43°C за 3 часа. Центрофугирахме 15 min на 5000 rpm на 4°C. Промихме утайката три пъти с PBS. След всяко промиване центрофугирахме при същите условия. След последното центрофугиране разтворихме утайката в 500 µl PBS буфер и екстрахирахме хайнцовите телца с 1 ml етер. Центрофугирахме на 15 000 rpm за 15 min при 4°C. Супернатантата и водната фаза бяха отстранени. Получената интерфаза от хайнцови телца и липидни мембрани полепна по стената на центрофужната епруветка. Интерфазата бе промита трикратно с PBS с центрофугиране на 15 000 rpm за 15 min при 4°C. Изолирането на ДНК се извърши чрез лизиране на микробната биомаса с TES буфер [14]. За отрицателна контрола използвахме изолирана ДНК от проба с използваните реактиви, но без еритроцитна маса.

### **Таргетно 16S рДНК секвениране и биоинформатичен анализ**

Приложихме таргетно 16S рДНК секвениране (Illumina). За таксономична класификация бе използвана база данни SILVA v.138. След първичен контрол на качеството данните бяха филтрирани за контаминанти спрямо отрицателната контрола. Отрицателната контрола представляваше изолирана ДНК от използваните реактиви.

## **РЕЗУЛТАТИ**

### **Морфологични промени в еритроцитите**

Още в първите 5 минути на инкубация с витамин К (менадион натриев бисулфит) се наблюдаваха минимални промени във формата на еритроцитите в сравнение с контролните проби. Контролните еритроцити, инкубирани само в PBS, запазиха нормалната си двойноvdлбната форма (фиг. 1).

След експозиция от 90 минути в среда с витамин К клетките показаха отчетливи промени. Част от тях се закръглиха, други придобиха неправилна форма и в значителен процент от клетките се визуализираха грануларни включения, съответстващи на хайнцови телца. В контролната група (PBS) морфологията остана непроменена (фиг. 2).

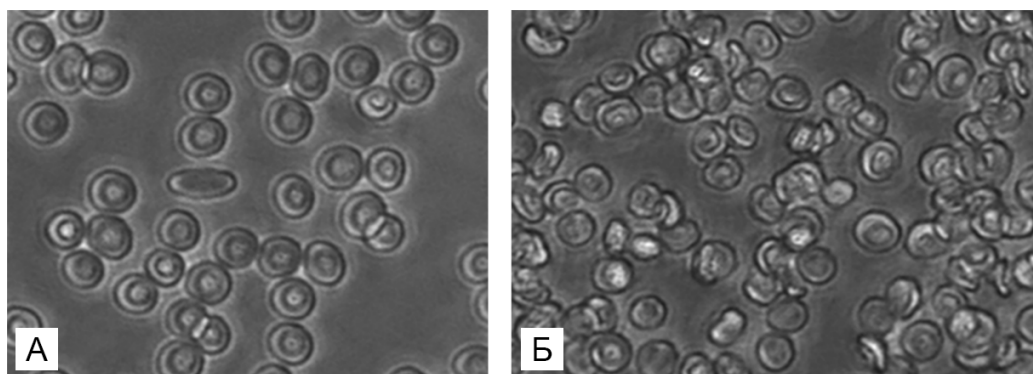
След 150 минути на инкубация в присъствие на витамин К броят на деформираните еритроцити и на тези с формирани хайнцови телца значително нарасна. Освен вътреклетъчните включения, в някои полета наблюдавахме освобождаване на гранули в извънклетъчното пространство, вероятно в резултат от разкъсване на мембраната (фиг. 3).

В групата, инкубирана 90 минути с витамин К, около 30-40% от клетките съдържаха едно или повече хайнцови телца. След 150 минути този процент се увеличи до над 60%, като в някои случаи

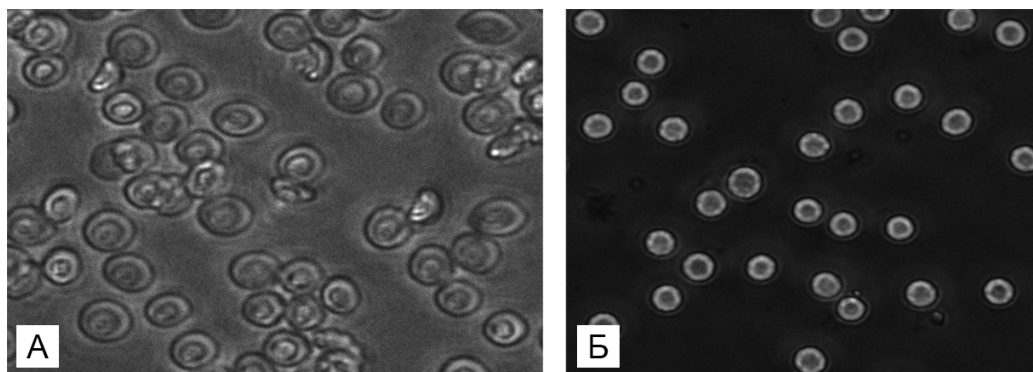
бяха наблюдавани повече от 20 грануларни телца в еритроцит. В контролната група (PBS) не се наблюдаваше значимо образуване на включения ( $\leq 2\%$ ).

### **Динамика на формиране на хайнцовите телца**

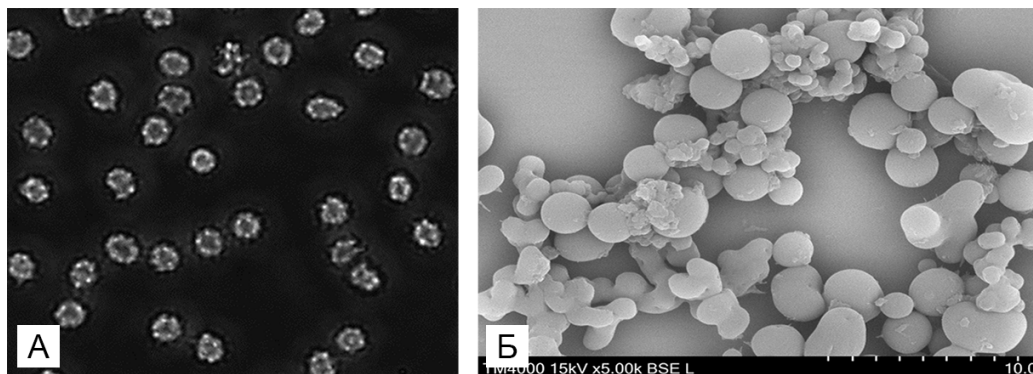
От литературата е известно, че прилагането на високи дози на витамин К и аминокфенол води до образуване на хайнцови телца. Нашите резултати показват, че индуцираното образуване на хайнцови телца започва още в първите минути на инкубация, като процесът протича динамично и включва: окръгляне на клетките, формиране на гранулирани включения под мембраната, частично или пълно разрушаване на мембраната и частично освобождаване на гранули в извънклетъчното пространство (фиг. 4). Подобна морфология на еритроцитите се наблюдава при пациенти с хемолитична анемия.



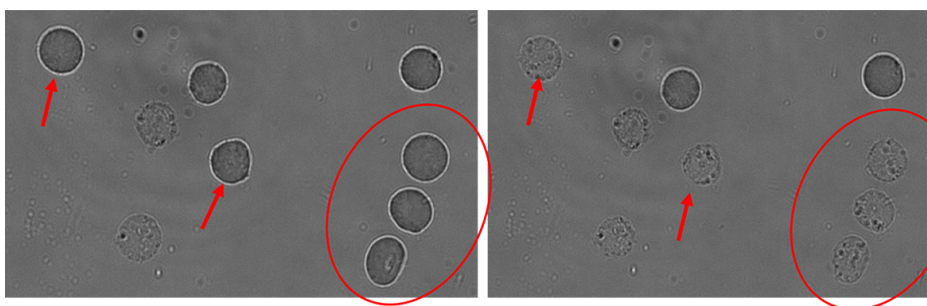
Фиг. 1. Еритроцити след 5 минути инкубация. А. Еритроцити в PBS и Б. Еритроцити, третирани с витамин К



Фиг. 2. Еритроцити след 90 минути. А. Нетретирана с витамин К контрола. Б. Поява на грануларни включения в третираните еритроцити с витамин К



Фиг. 3. Еритроцити след 150 минути на третиране с витамин К 1 mg/ml. А. Наблюдават се силно изразена грануляция и мембранни дефекти. Б. Сканираща микроскопия. Морфология на чисти хайнцови телца



**Фиг. 4.** Динамика на формиране на хайнцови телца в еритроцити чрез инкубиране на 43°C в среда със синтетичен витамин К (1 mg/ml). Заснето е същото зрително поле през интервал от една минута. Наблюдават се частично лизиране на еритроцитите, освобождаване на хемоглобина и получаване 'ghost/призрачни' еритроцити

### Резултати от таргетното 16S рДНК секвениране

От общо 1666 идентифицирани таксона (OTU), след филтриране 1408 (84.5%) бяха елиминирани като вероятни контаминанти. Останалите 258 представителни таксона бяха таксономично отнесени към 20 типа, 28 класа, 72 разряда, 128 семейства и 258 рода.

### Таксономичен състав

Табл. 1 включва петте най-представителни бактериални таксона на ниво тип и род, доказани сред изследваните групи.

**Таблица 1.** Доминиращи родове сред анализирани проби

Група	Тип	Род	Количество (%)	Стандартно отклонение (SD)
K	Proteobacteria	Variovorax	36.9	1.4
K	Firmicutes	Enterococcus	26.9	0.4
K	Actinobacteriota	Rarobacter	5.4	2.2
K	Proteobacteria	Pantoea	3.3	0.9
K	Proteobacteria	Raoultella	2.9	2.1
Ery	Proteobacteria	Variovorax	22.6	6.8
Ery	Firmicutes	Enterococcus	16.5	2.4
Ery	Proteobacteria	Acinetobacter	8.5	8.5
Ery	Bacteroidota	Porphyromonas	4.3	1.3
Ery	Firmicutes	Brevibacillus	3.6	1.1
LyE	Proteobacteria	Variovorax	34.4	9.9
LyE	Firmicutes	Enterococcus	20.3	4.4
LyE	Actinobacteriota	Rarobacter	7.8	3.6
LyE	Firmicutes	Brevibacillus	5	1.7
LyE	Proteobacteria	Acinetobacter	4.7	7.2
vitK	Proteobacteria	Variovorax	20.8	13.5
vitK	Firmicutes	Enterococcus	15.9	0.9
vitK	Proteobacteria	Acinetobacter	4.3	4.6
vitK	Bacteroidota	Porphyromonas	3.3	0.3
vitK	Firmicutes	Streptococcus	2.7	1.6
AF	Proteobacteria	Variovorax	22.7	4.6
AF	Firmicutes	Enterococcus	18.1	3.8
AF	Proteobacteria	Acinetobacter	14.8	8.3
AF	Firmicutes	Brevibacillus	4.1	1.1
AF	Actinobacteriota	Rarobacter	3.4	0.7

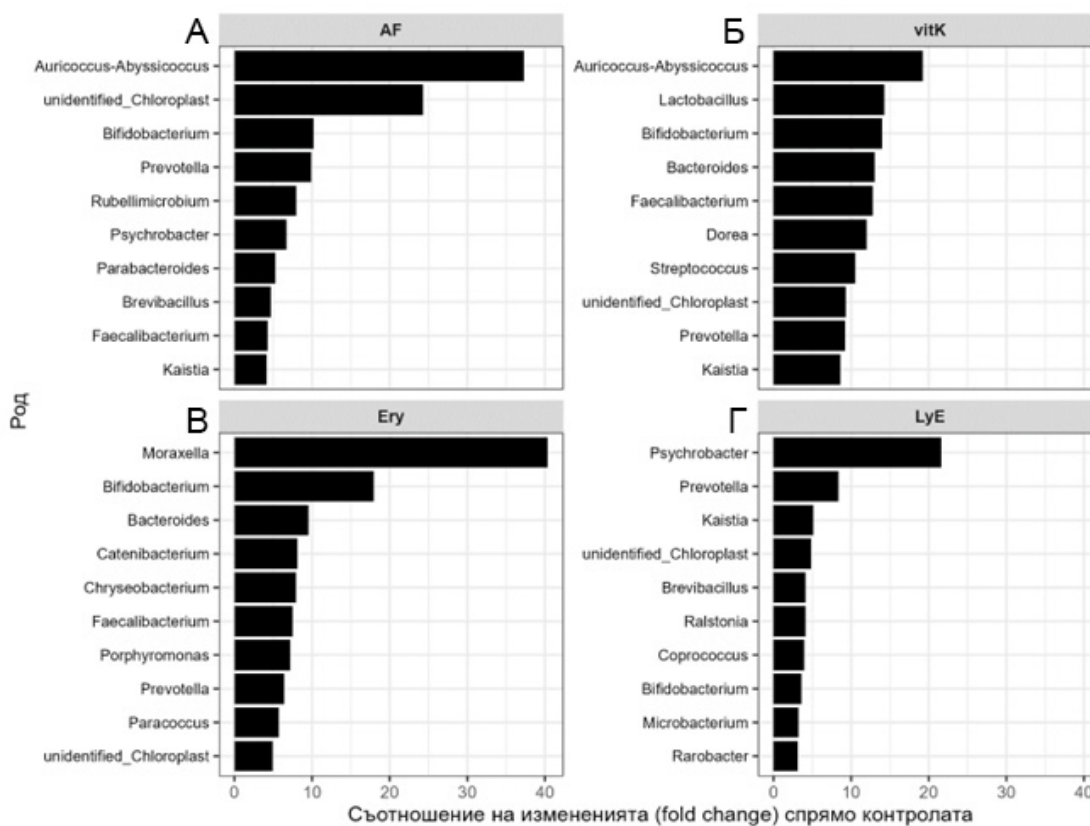
Контролна еритроцитна маса (K); Еритроцитна маса, инкубирана на 43°C за 150 min (Ery); Лизирани еритроцити, инкубирани на 43°C за 150 min (LyE); Третирани еритроцити с витамин К (vitK); Третирани еритроцити с аминофенол на 43°C за 150 min (AF).

Алфа-разнообразието на микробните общности в еритроцитите беше оценено чрез индексите на Shannon и Simpson след филтриране на контаминантите, внесени от използваните реактиви – вода, буфери, соли, глюкоза, полимераза и др. Еднофакторната ANOVA показва статистически значими разлики между четирите експериментални условия: анализ на ДНК от цели еритроцити, от лизирани еритроцити, от еритроцитна маса, третирана с аминофенол, и еритроцитна маса, третирана с витамин К. Индексът на Shannon се различаваше значимо между групите ( $F(4,9) = 5.05$ ,  $p = 0.021$ ), както и индексът на Simpson ( $F(4,9) = 3.83$ ,  $p = 0.044$ ). Тези резултати показват, че стресовите условия (висока температура, аминофенол и витамин К) променят микробното разнообразие.

Доминиращите типове бяха Proteobacteria (51%), Firmicutes (34%) и Actinobacteria (8%). Пробите, третирани с витамин К, показаха по-високо  $\alpha$ -разнообразие в сравнение с аминофенол и контролните еритроцити.

### ОБСЪЖДАНЕ

Целта на настоящото изследване бе да докаже участието на кръвната микробиота в процеса на образуване на хайнцови телца. Нашите експерименти потвърждават, че при окислително увреждане и 43°C се формират хайнцови телца в еритроцитите, както е описано от Sugawara и съавт. При стресови температури между 37°C и 43°C броят на хайнцовите телца в еритроцитите се увеличава [15]. Освен това денатурираният хемоглобин може да се свърже с мембранно свързани протеини като Band 3, както е описано от Waugh и Low [6]. Въпреки че в литературата не намерихме директни примери за микробен произход на хайнцовите грануларни телца, могат да бъдат открити морфологични прилики [16-18].



Фиг. 5. Кратно изменение на количеството ридове в третирани проби спрямо нетретирана контрола от еритроцитна маса. А. Третирани еритроцити с аминоксенол на 43°C за 150 min (AF); Б. Третирани еритроцити с витамин К (vitK); В. Еритроцитна маса, инкубирана на 43°C за 150 min (Ery); Г. Лизирани еритроцити, инкубирани на 43°C за 150 min (LyE)

### Оценка на хипотезата за микробния произход на хайнцовите телца

Търсейки доказателства за микробния произход на грануларни телца в еритроцитите и тъканите, ние проведохме това пилотно изследване. Проучването беше планирано с цел да се оцени неговата осъществимост и да се идентифицират всички потенциални проблеми или въпроси, свързани с доказването на тази хипотеза. Бяха изпробвани процедурите, методите и инструментите, като направихме необходимите корекции и подобрихме качеството и точността на данните, преди да се убедим, че предположенията ни имат основания да бъдат тествани в по-големи мащаби.

Трудностите и потенциалните източници на грешки са реален факт. Такива са невъзможността хайнцовите телца да бъдат култивирани на хранителна среда или трудността да изолираме само ДНК от хайнцовите телца, като елиминираме човешката ДНК, въпреки многократните промивания с PBS на хайнцовите телца преди изолирането на ДНК. Тези трудности продължават да съществуват.

Морфологично множество вътреклетъчни патогени наподобяват грануларни структури [16-18]. Фактът на успешното индуциране на хайнцови телца с витамин К и аминоксенол, изолиране на ДНК от пречистени хайнцови телца и прилагане на секвенционен анализ е потвърждение за

връзката с наблюдаваните и изследвани от нас кръвни микробиоти. Приложените стресови фактори за индуциране на хайнцови телца и кръвни микробиоти са едни и същи – инкубиране при температура от 43°C и токсично въздействие с високи концентрации на витамин К, аминоксенол, фенилхидразин, натриев тиосулфат и др. При третирание с витамин К и аминоксенол наблюдавахме динамика на броя на получените бактериални ридове. Установихме намален брой ридове, следствие на инхибиране, или до тридесеткратно увеличение на определени таксони спрямо контролните нетретирани проби. Микроскопски морфологията на хайнцовите телца и на кръвните микробиоти е идентична. Тези резултати показват, че в еритроцитите се извършват активни метаболитни процеси. Приложените стресови фактори индуцират защитни механизми на оцеляване и латентните кръвни микробиоти преминават в активно делене. Процесът на ревертиране на латентните микробиоти, за които ние предполагахме, че са стабилни L-форми, не е завършен и те остават в трайно латентно състояние, което води до тяхната по-нататъшна некултивируемост. Количествената промяна, отчетена чрез броя ридове на едни и същи таксони в проби от култивирана и некултивирана кръв, показва, че тези процеси са реални.

Два съществени извода могат да бъдат направени: 1) в резултат на термичен стрес се стимулира пролиферацията на кръвната микробиота и 2) растежът на кръвната микробиота стимулира образуването на хайнцови телца.

Възможно е микробиотите или техни метаболити да продуцират свободни радикали или да индуцират локално окисление, което ускорява агрегацията на хемоглобина. Например окислението на хемоглобина ускорява образуването на хемихроми, които от своя страна служат за предшественик хайнцовите телца [19].

Друго предположение, което може да се изкаже, е, че микробните повърхности служат като основа (scaffold) или нуклеационни ядра, около които се утаяват денатурирани хемоглобинови молекули. Електронномикроскопски наблюдения показват натрупване на аморфен електронно плътен материал около микробни клетки [16]. Ние наблюдавахме индуцирано с витамин К натрупване на електронно плътен материал от вътрешната и външната страна на клетъчната мембрана на микробиоти в кръвта [20].

Доминиращият тип е Proteobacteria, следван от значителен дял Firmicutes и Actinobacteria, докато Bacteroidota присъства в по-умерени количества. Този профил е в съответствие с наши и други изследвания, според които кръвната микробиота при здрави индивиди е доминирана от Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria и Bacteroidota [21, 22]. Идентифицираните от нас родове включват представители, известни с оксидативен метаболизъм и потенциална способност за образуване на биофилм [23-25]. Макар да не намерихме директни примери за образуване на грануларни структури от тези родове, техните характеристики допускат потенциална роля в процеса на формирането на хайнцови телца.

Тези и предишни наши резултати показват богат микробен профил в еритроцитната маса при инкубация с витамин К и аминофенол, което подкрепя хипотезата ни за микробно участие при формирането на хайнцови телца [21]. Класическото разбиране, че хайнцовите телца са метаболитни или хемоглобинови преципитати или бактериални везикуларни остатъци, не е актуално. Потвърждаването на хипотезата за микробния произход на грануларните телца в еритроцити и тъкани изисква по-задълбочени проучвания, включващи морфологични, генетични и физикохимични анализи.

**Благодарности.** Изследването е финансирано от Фонд „Научни изследвания“ по проект КП-06-Н73/5 от 5.12.2023 г. „Формиране и структурен анализ на еритроцитните грануларни телца“ и договор BG16RFPR002-1.014-0017, „Център за компетентност „Имунопатоген“ по Програма „Научни изследвания, иновации и дигитализация за интелигентна трансформация“ 2021-2027 г. Това изследване е разработено и със съдействието на Център за компетентност по мехатроника и чисти технологии „Мехатроника, иновации, роботика, автоматизация и чисти технологии“ – MIRACle, по договор № BG16RFPR002-1.014-0019-C01, финансиран от Европейския фонд за регионално развитие (ЕФРР) чрез Програма „Научни изследвания, иновации и дигитализация за интелигентна трансформация“ (ПНИИДИТ) 2021-2027.

## Библиография

1. Heinz R. Beiträge zur Kenntniss der Anämien. Virchows Arch Pathol Anat, 1890, 119:193–226.
2. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. Blood, 2008, 112(10):3939–48.
3. Phillips J, Henderson AC. Hemolytic anemia: evaluation and differential diagnosis. Am Fam Physician, 2018, 98(6):354–361.
4. Beutler E. Heinz body anemia: pathogenesis and laboratory diagnosis. Blood, 1962, 20(5):517–21.
5. Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. Am Fam Physician, 2005, 72(7):1277–82.
6. Waugh RE, Low PS. Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies in red blood cells. Biochemistry, 1985, 24(1):34–9.
7. Reinhart WH, Sung LP, Chien S. Quantitative relationship between Heinz body formation and red blood cell deformability. Blood, 1986, 68(6):1376–1383.
8. Christopher MM, White JG, Eaton JW. Erythrocyte pathology and mechanisms of Heinz body-mediated hemolysis in cats. Vet Pathol, 1990, 27(5):299–310. <https://doi.org/10.1177/030098589002700501>
9. Pantaleo A, De Franceschi L, Turrini F. Clinical relevance of Heinz bodies in red cells. Int J Lab Hematol, 2008, 30(5):353–60.
10. Gartner LM, Hollander M. Disorders of bilirubin metabolism. In: Assali NS (Ed.). Pathophysiology of Gestation. 3rd ed. New York, Academic Press, 1972, 455–503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-065503-8.50015-8>
11. Kusumoto S, Nakajima T. The constitution of Heinz bodies. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol Exp Pathol, 1968, 259:266–275. <https://doi.org/10.1007/BF00536772>
12. Damgaard C, Magnussen K, Enevold C, et al. Viable bacteria associated with red blood cells and plasma in freshly drawn blood donations. PLoS One, 2015, 10(3):e0120826.
13. McLaughlin RW, Vali H, Lau PC, et al. Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? J Clin Microbiol, 2002, 40(12):4771–5.
14. Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. BioTechniques, 2004, 36:808–812. <https://doi.org/10.2144/04365ST04>
15. Sugawara Y, Hayashi Y, Shigemasa Y, et al. Molecular biosensing mechanisms in the spleen for the removal of aged and damaged red cells from the blood circulation. Sensors, 2010, 10(8):7099–7121. <https://doi.org/10.3390/s100807099>
16. Domingue GJ Sr, Woody HB. Bacterial persistence and expression of disease. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(2):320–44. doi:10.1128/CMR.10.2.320
17. Cuadra M, Takano J. The relationship of Bartonella bacilliformis to the red blood cell as revealed by electron microscopy. Blood, 1969, 33(5):708–16.
18. Pohlod DJ, Mattman LH, Tunstall L. Structures suggesting cell-wall-deficient forms detected in circulating erythrocytes by fluorochrome staining. Appl Microbiol, 1972, 23(2):262–7. doi:10.1128/am.23.2.262-267.1972
19. Spinelli S, Marino A, Remigante A, Morabito R. Redox homeostasis in red blood cells: from molecular mechanisms to antioxidant strategies. Curr Issues Mol Biol, 2025, 47(8):655. <https://doi.org/10.3390/cimb47080655>
20. Tsafarova B, Hodzhev Y, Yordanov G, et al. Morphology of blood microbiota in healthy individuals assessed by light and electron microscopy. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 12:1091341. doi:10.3389/fcimb.2022.1091341
21. Panaiotov S, Hodzhev Y, Tsafarova B, et al. Culturable and non-culturable blood microbiota of healthy individuals. Microorganisms, 2021, 9:1464. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071464>
22. Sciarra F, Franceschini E, Campolo F, Venneri MA. The diagnostic potential of the human blood microbiome: are we dreaming or awake? Int J Mol Sci, 2023, 24(13):10422. <https://doi.org/10.3390/ijms241310422>
23. Ch'ng JH, Muthu M, Chong KKL, et al. Heme cross-feeding can augment Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis dual species biofilms. ISME J, 2022, 16:2015–2026. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01248-1>
24. Martins JG, lurk VB, De Oliveira EP, et al. Adaptation of Enterobacter sp. to herbicides is correlated with distinct patterns of quorum sensing molecules. J Hazard Mater, 2025, 496:139324. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.139324>
25. Kim JH, Ruegger PR, Lebig EG, et al. High levels of oxidative stress create a microenvironment that significantly decreases the diversity of the microbiota in diabetic chronic wounds and promotes biofilm formation. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:259. doi: 10.3389/fcimb.2020.00259

✉ Адрес за кореспонденция:  
Д-р Стефан Панайотов  
e-mail: spanaiotov@yahoo.com