

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 613.98/612.67/.68

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ ЛЮДЕЙ С ОСТРОЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ СРЕДНЕГО, ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Забиняков Н.А.¹, Довгий П.Г.¹, Полторацкий А.Н.², Азаров К.С.³

1. ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия, e-mail: nzabinyakov@gmail.com

2. ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: nzabinyakov@gmail.com

3. «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: nzabinyakov@gmail.com

Воспаление легких во многих случаях является причиной длительной реабилитации, снижения трудоспособности и смертности, особенно, среди лиц пожилого и старческого возраста. При развитии данного пульмонологического заболевания серьезное влияние на организм оказывает гипоксия. В современной научной литературе большое количество работ посвящено изучению пневмонии, однако, относительно мало изучены механизмы влияния гипоксии на эритроциты и нейтрофилы крови. Цель исследования - определить особенности морфологии и механических изменений эритроцитов и нейтрофилов больных среднего, пожилого и старческого возраста при пневмонии для поиска дополнительных оценочных критериев диагностики степени воздействия гипоксии на организм. В результате проделанной работы было выяснено, что на изменения параметров клеток крови у людей с пневмонией во всех возрастных группах (средний, пожилой и старческий возраст) оказывает влияние как инфекционное, так и гипоксическое воздействие.

Ключевые слова: биологическая модель гипоксии, сканирующая зондовая микроскопия, модуль Юнга, поверхностный потенциал, пневмония, старческий возраст.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF ERITHROCYTES AND NEUTROPHILS FROM PATIENTS OF MIDDLE, ELDERLY AND SENILE AGE WITH ACUTE PNEUMONIA

Zabinyakov N.A.¹, Dovgiy P.G.¹, Poltoratskiy A.N.², Azarov K.S.³

1. Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia,
e-mail: nzabinyakov@gmail.com

2. N.N. Petrov's Institute of Oncology, Saint Petersburg, Russia,
e-mail: nzabinyakov@gmail.com

3. St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia,
e-mail: nzabinyakov@gmail.com

Commonly acute pneumonia causes long-term rehabilitation, disabilities and mortality, especially among the persons of elderly and senile age. With the development of this disease pulmonology serious effects on the body has hypoxia. In modern literature a large number of works devoted to the study of pneumonia, however, relatively little studied mechanisms of hypoxia on blood erythrocytes and neutrophils. The purpose of the study - to determine the morphology and mechanical changes of erythrocytes and neutrophils of patients average elderly pneumonia to find additional assessment criteria to diagnose the impact of hypoxia on the body. As a result of this work it was found that by changing the parameters of the blood cells in people with pneumonia in all age groups (average, elderly age) affects both infectious and hypoxic exposure.

Key words: biological hypoxic model, scanning probe microscopy, young's modulus, surface charge, pneumonia, senile age.

Введение. Воспаление легких является распространенным пульмонологическим заболеванием. Помимо инфекционного влияния на организм оказывается также и сопутствующее гипоксическое, которое характеризуется дефицитом кислорода в клетках и тканях. Неблагоприятный эффект гипоксии ярко выражен у лиц с возрастными анатомическими изменениями легочных тканей, что увеличивает риск инвалидности и летального исхода. Сложность диагностики и высокая смертность, особенно среди пациентов старше 50 лет, ставят изучение гипоксии при пневмонии в ранг приоритетных направлений физиологии и медицины. [5, 6, 10].

В современной научной литературе большое количество работ посвящено изучению пневмонии, однако, относительно мало изучены механизмы влияния

гипоксии на эритроциты и нейтрофилы крови. Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) в сочетании с современными методами работы с биологическими объектами позволяет выявить особенности изменений клеток крови (изменения геометрических параметров и модуля упругости (далее МУ) поверхности клеток) при пневмонии, что помогает установить прогностические критерии развития заболевания при сильном влиянии гипоксического фактора [8, 9].

Цель исследования - определить особенности морфологии и механических изменений эритроцитов и нейтрофилов больных среднего, пожилого и старческого возраста при пневмонии для поиска дополнительных оценочных критериев диагностики степени воздействия гипоксии на организм. Основной задачей было определить изменения параметров клеток крови (таких как площадь, объем, модуль Юнга, далее МЮ, и потенциал поверхности, далее ПП) при воздействии пневмонии на организм человека, а также, продемонстрировать, что при пневмонии основное влияние оказывает не только инфекционный, но и гипоксический фактор; сделать вывод о возможном использовании данных об изменении параметров клеток крови для оценки степени влияния гипоксии на организм.

Материал и методы исследования. Исследование было проведено на базе НИЛ «Физиология адаптационных процессов» НИУ «Белгородский государственный университет» и пульмонологического отделения «Городской клинической больницы №1» города Белгорода в период с сентября 2012 года по май 2013. Объектом исследования были эритроциты и нейтрофилы больных с пневмонией среднего возраста (45-52 года, средний возраст составлял 48 лет); пожилого – 62-72 (средний возраст – 67 лет) и старческого – 80-84 года (средний возраст – 82 года). Контрольными были клетки крови здоровых людей таких же возрастных групп. Под «здоровыми» следует понимать людей без заболеваний органов дыхательной системы и серьезной соматической патологии.

Забор крови производился из локтевой вены у 17 человек (по 5-6 человек в каждой возрастной группе соответственно). Были поставлены следующие диагнозы: 1) у трех человек в возрасте 47, 50, 82 лет была выявлена внебольничная левосторонняя нижнедолевая пневмония, тяжелое течение; 2) у трех человек 66, 67, 84 лет – внебольничная левосторонняя верхнедолевая пневмония, тяжелое течение; 3) у двух человек в возрасте 47, 52 года – внебольничная левосторонняя очаговая нижнедолевая пневмония средней степени тяжести; 4) у двух человек в возрасте 66, 70 лет –

внебольничная двусторонняя полисегментарная пневмония, тяжелое течение; 5) у двух человек в возрасте 67, 80 лет – внебольничная правосторонняя верхнедолевая очаговая пневмония в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких, тяжелое течение; 6) у двух человек 48, 67 лет – внебольничная двусторонняя нижнедолевая пневмония, тяжелое течение; 7) у двух человек 68, 81 года – внебольничная левосторонняя нижнедолевая пневмония средней степени тяжести; 8) у одного человека в возрасте 84 лет – внебольничная левосторонняя очаговая нижнедолевая пневмония, тяжелое течение. Контрольными были клетки крови 10 здоровых людей такого же возраста. Забор крови производился из вены в количестве 3 мл. Забор крови осуществлял квалифицированный медперсонал пульмонологического отделения МБУЗ «Городской клинической больницы №1» г. Белгорода у вновь поступивших людей с выраженными признаками обострения заболевания. Интервал между поступлением больного и забором крови составлял не более 40 минут. В нашей работе методы лечения не учитывались, исход лечения всех пациентов был благоприятным.

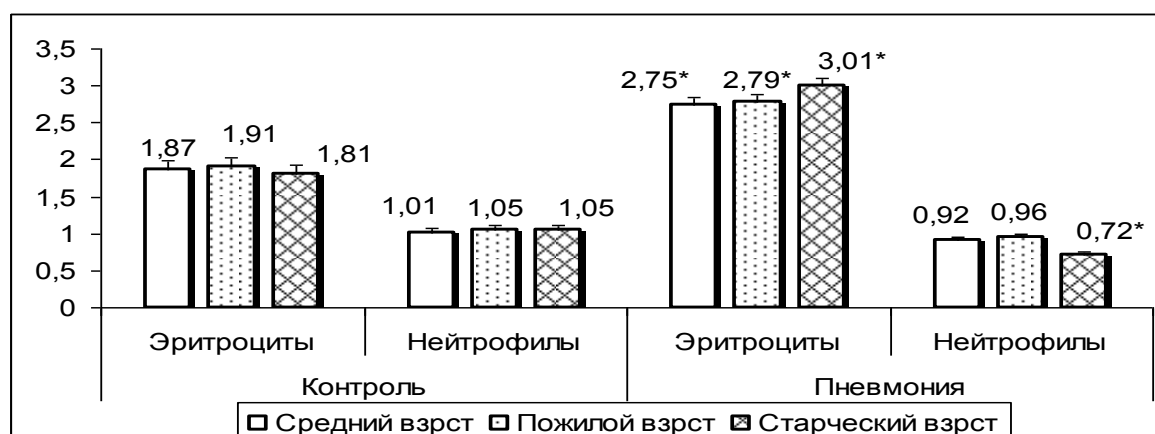
В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 Ед/мл. Разделение на лейкоциты и эритроциты осуществляли путем центрифугирования 10 мин при 1500 об/мин. Собирали слой лейкоцитов, в котором примесь эритроцитов разрушали 0,83% раствором хлорида аммония. Суспензии лейкоцитов и эритроцитов дважды отмывали изотоническим буферным раствором (раствор Дульбекко, pH=7,4). СОЭ измеряли по методу Вестергрена, pH крови измеряли лабораторным pH-метром «pH 827 lab» (Metrohm, Швейцария). Изучение структурно-функциональных свойств клеток крови осуществляли на атомно-силовом микроскопе «NTEGRA Vita» (NT-MDT, г. Зеленоград, Россия, конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа «Olympus IX-71», Япония). Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов марки NSG, CSG (Nanoworld, USA), жесткость которых не превышала 0,5 Н/м. Препараты для сканирования готовили на чистых обезжиренных стеклянных подложках, которые помещали во влажную камеру, для сохранения нативных свойств клеток. В каждой серии эксперимента в полуконтактном режиме сканировали по 30 нейтрофилов, и 50 эритроцитов согласно разработанному «Способу исследования нативных клеток крови» [8].

Площадь поверхности и объем форменных элементов оценивали на основе полученных сканов с использованием приложений «Nova»; «Gwyddion». Упруго-эластические свойства измеряли в режиме силовой спектроскопии, в основе которого

лежит оценка степени деформации поверхности образца при взаимодействии его с зондом [8]. Регистрацию МУ производили с использованием модифицированного кантилевера на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG 11, согласно «Способу определения упругости клеток крови» [9]. Для исследования электрических свойств поверхности клеток крови работу проводили в режиме Кельвина с использованием зонда с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN. Поверхностный потенциал оценивали исходя из его градиентного распределения на СЗМ-скане. Для измерения ПП готовили мазки из эритроцитарной массы на специальной обезжиренной металлической подложке.

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета анализа «Microsoft Excel 14», «Origin Pro 8.0». Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Как показано на (Рис. 1), МУ эритроцитов людей старческого возраста с пневмонией достоверно ($p < 0,05$) больше МУ эритроцитов контрольной группы на 39%; данные МУ эритроцитов в группах среднего и пожилого возрастов отличаются в меньшей степени от контрольных данных (32% и 31% при $p < 0,05$). МУ нейтрофилов достоверно ($p < 0,05$) ниже в группе старческого возраста людей с пневмонией на 31% ($p < 0,05$).



* - достоверность различий по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$

Рисунок. 1. МУ эритроцитов и нейтрофилов людей разных возрастных групп с пневмонией, μPa .

Изменения ПП, морфологических параметров (площадь и объем) эритроцитов и нейтрофилов, а также скорость оседания эритроцитов и рН крови людей представлены в (табл. 1).

Таблица 1.

Клеточные параметры крови людей разных возрастных групп в контрольном эксперименте и с пневмонией.

Средний возраст (45-52)	Пожилой возраст (62-72)	Старческий возраст (80-84)
Площадь и объем эритроцитов и нейтрофилов при пневмонии		
S _{эп} , μm ² (M±m)		
117,6±11,9	136,6±14,1	164,2±13,1* **
V _{эп} , μm ³ (M±m)		
101,±10	89,8±11,7	117,2±12,4*
S _н , μm ² (M±m)		
215±17,3*	220,2±19,3	186,6±11,8* **
V _н , μm ³ (M±m)		
100,5±9,4*	97,5±10*	86,4±7,4* **
Площадь и объем эритроцитов и нейтрофилов в контрольном эксперименте		
S _{эп} , μm ² (M±m)		
126,4±10,2	111,2±13,7	136,1±10
V _{эп} , μm ³ (M±m)		
88,9±10,1	90,9±14,2	90±7,4
S _н , μm ² (M±m)		
253,6±17,7	213,1±20,1	213±12,3
V _н , μm ³ (M±m)		
132,6±12,4	123,3±12,5	110,9±9,9
СОЭ при пневмонии, мм/час (M±m)		
17,0±2,0*	19,0±2,0*	24,0±2,0* **
СОЭ в контрольном эксперименте, мм/час (M±m)		

11,0±2,0	15,3±1,6	19,5±1,6**
рН крови при пневмонии (M±m)		
7,40±0,01	7,41±0,01	7,40±0,02*
рН крови в контрольном эксперименте (M±m)		
7,39±0,01	7,40±0,01	7,37±0,01
ПП эритроцитов при пневмонии, mV (M±m)		
-10±2	-7±2	-4±1*
ПП эритроцитов в контрольном эксперименте, mV (M±m)		
-9±3	-11±3	-9±3

$S_{эр}$ – площадь эритроцитов; $V_{эр}$ – объем эритроцитов; $S_{н}$ – площадь нейтрофилов; $V_{н}$ – объем нейтрофилов;

* – достоверность различий по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$

** – достоверность различий по сравнению с группой среднего возраста при $p < 0,05$

У людей среднего и пожилого возраста с пневмонией не было выявлено достоверных различий значений площади поверхности и объема эритроцитов. Однако, у больных старческого возраста площадь поверхности эритроцитов была больше на 17% ($p < 0,05$), а объем – на 23% ($p < 0,05$), чем у эритроцитов крови здоровых людей. Также эти два параметра отличались в возрастных группах – в возрасте 80-84 лет размеры эритроцитов превышали таковые у людей среднего возраста – площадь поверхности эритроцитов на 28% ($p < 0,05$), значения объема имели восходящую тенденцию с увеличением возраста, но различались незначимо. Как видно во всех возрастных группах у здоровых людей и с пневмонией с увеличением возраста площадь поверхности и объем нейтрофилов уменьшились. В группах среднего и старческого возраста по сравнению с контрольной группой площадь поверхности уменьшилась на 15% и 12% ($p < 0,05$) соответственно, значения объема нейтрофилов были меньше во всех возрастных группах на 32%, 21% и 22% ($p < 0,05$) соответственно.

У людей с пневмонией в возрасте 45-52 и 62-72 лет размеры эритроцитов и нейтрофилов практически не отличались от группы здоровых людей такого же возраста и, напротив, в группе 80-84 лет эритроциты были большего размера. С возрастом у здоровых людей одни клеточные параметры имеют восходящую тенденцию (площадь эритроцитов), другие – нисходящую (площадь и объем нейтрофилов), что, возможно

связано с возрастными особенностями клеток крови; при этом, на сканах характерных отличных особенностей в архитектоники клеточных поверхностей между возрастными группами выявлено не было.

СОЭ в группе среднего пожилого и старческого возраста с пневмонией была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в контрольном эксперименте на 35%, 19% и 19% соответственно. Достоверно ($p < 0,05$) рН крови сместился в кислую сторону только в группе 80-84 лет. ПП также достоверно увеличился на 56% ($p < 0,05$) в группе старческого возраста.

Изменения СОЭ во всех группах могут свидетельствовать о наличие инфекционного процесса в организме. Также, стоит отметить, что при воспалении в организме существенно уменьшается жесткость клеточной мембраны нейтрофилов. Такое изменение связано с активацией нейтрофилов и необходимо для их последующей миграции в ткани из сосудов [11, 12]. В нашем эксперименте МЮ достоверно был меньше только в группе старческого возраста, вероятно, отсутствие изменений МЮ в группах среднего и пожилого возраста свидетельствует о том, что малое количество нейтрофилов мигрирует в ткани в начале развития острой пневмонии, однако данные о МЮ нейтрофилов требуют дополнительной проверки в последующие дни течения болезни. Известно, что гипоксия сопровождается ацидозом – рН крови была смещена в кислую сторону достоверно в группе старческого возраста, вероятно, в группах среднего и пожилого возраста лучше выражена компенсаторные механизмы. В доступных нам литературных источниках не встречалось данных о прямом бактериальном (инфекционном) влиянии на МЮ и ПП эритроцитов человека, но данные об изменениях параметров красных клеток крови и ПП при гипоксии повторяют ту же тенденцию, что и в наших ранних исследованиях, в том числе и на животных [1, 2, 3, 7].

Выводы. Показано, что на изменения параметров клеток крови у людей с пневмонией во всех возрастных группах (средний, пожилой и старческий возраст) оказывает влияние как инфекционное, так и гипоксическое воздействие.

Под воздействием инфекционного и гипоксического стресс-факторов меняются практически все изученные нами клеточные параметры крови. СОЭ увеличилась в каждой возрастной группе, рН достоверно сместился в кислую сторону только в группе 80-84 лет. Модуль Юнга эритроцитов людей старческого возраста увеличился с 1,81 до

3,01 μPa ; среднего – с 1,87 до 2,75 μPa ; пожилого с 1,91 до 2,79 μPa . В свою очередь МЮ нейтрофилов в группе старческого возраста уменьшился с 1,05 до 0,72 μPa . В группе старческого возраста также отмечено уменьшение потенциала поверхности эритроцитов с -4 до -9 mV, а также увеличение площади поверхности эритроцитов с 136,1 до 164,2 μPa^2 ; уменьшению объема эритроцитов с 117 до 90 μPa^3 ; увеличении площади поверхности нейтрофилов с 186 до 213 μPa^2 ; уменьшению объема нейтрофилов с 110 до 84,6 μPa^3 . Сходные тенденции изменения клеточных параметров сходны с изменениями под воздействием гипоксии в предыдущих работах [1, 2, 3, 7].

Как видно, наибольшим изменениям подвержены клеточные параметры крови людей в самой старшей группе – 80-84 лет. Вероятно, организм людей этой возрастной группе более подвержен влиянию как гипоксического, так и инфекционного факторов при острой пневмонии, в то время как клеточные параметры крови людей среднего и пожилого возраста отличались большей резистентностью к данным стресс-факторам.

Подобные изменения можно использовать как дополнительный инструмент диагностики заболеваний пульмонологического профиля, таких как гипоксия, так как это позволит скорректировать тактику лечения, направляя ее не только на устранение основной патологии, но и на предотвращение возникновения сопровождающих осложнений, что особенно актуально в старческом возрасте.

Список литературы.

1. Забиняков Н.А. Оценка микрорельефа и механических свойств эритроцитов и нейтрофилов в условиях острой гипоксии методом АСМ. // Сб. мат. XXIV Российской конференции по электронной микроскопии (РКЭМ-2012). (Черноголовка, 29 мая – 1 июня. 2012 г.). – Черноголовка, 2012. –124 с.
2. Забиняков Н.А. Особенности морфологии и механических изменений эритроцитов и нейтрофилов у больных разных возрастных групп с хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой / Н.А. Забиняков, К.И. Прощаев, П.Г. Довгий [и др.]. // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 25, № 2. - С. 373 - 378.
3. Забиняков Н.А., Сладкова Е.А. Цитоархитектоника мембран нейтрофилов в условиях гипоксии-гиперкапнии // VIII международная конференция «Системное

кровообращение, микроциркуляция и гемореология». (Ярославль, 10 - 14 июн. 2011 г.) – Ярославль, 2011. – 22 с.

4. Лебедев Д.В.. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа / Д.В. Лебедев, А.П. Чукланов, А.А. Бухареаев // Письма в ЖТФ. – 2009. – Т. 35, №. 8. – С. 54 - 61.

5. Панева М.А. Клинико-иммунологическая характеристика внебольничной пневмонии у больных пожилого и старческого возраста: Дис. канд. мед. наук. – Омск. 2009. - 133 с.

6. Попова И.Е. Изучение структурных свойств эритроцитов крови новорожденных при оксидативном стрессе, вызванном гипоксией: Дис. канд. биол. наук. – Воронеж, 2007. - 250 с.

7. Сладкова Е.А., Забиняков Н.А. Влияние острой гипоксии-гиперкапнии на морфофункциональные показатели эритроцитов. // Сб. мат. 15-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». (Пушино, 18 - 22 апр. 2011 г.) – Пушино, 2011. – С. 188 - 189.

8. Федорова М.З. Способ исследования нативных клеток / М.З. Федорова, М.Ю. Скоркина, С.Д. Чернявских, Е.А. Сладкова, Н.А. Забиняков // Патент России № 2009125268/15 27.08.2010.

9. Скоркина М.Ю. Способ определения упругости клеток крови / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Н.А. Забиняков, Е.А. Сладкова // Патент Росси № 2466401.2012 10.11.2012.

10. Шереметьев Ю.А. Морфо-физиологический анализ механизмов La^{3+} -индуцируемых агрегации и слияния эритроцитов: Дис. докт. биол. наук. – Н. Новгород, 2007. - 133 с.

11. Pick R. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation / R. Pick, D. Brechtefeld, B. Walzog // Molecular Immunology. – 2013. – Vol. 55, № 1. – P. 70 - 75.

12. Wagner J.G., Roth R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature / J.G. Wagner, R.A. Roth // Pharmacological Review. – 2000. – Vol. 52, № 3. P. 349 - 374.

References.

1. Zabinyakov N.A. *Sb. mat. XXIV Rossijskoj konferencii po jelektronnoj mikroskopii (RKJeM-2012)* (Sat mat. XXIV Russian Conference on Electron Microscopy (RKEM 2012)). Chernogolovka, 2012, 124 p.

2. Zabinyakov N.A., Prashchayeu K.I., Dovgiy P.G., Poltorackiy A.N., Ryzhak G.A. *Uspehi gerontologii*. 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 373 - 378.
3. Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. *VIII mezhdunarodnaja konferencija «Sistemnoe krovoobrashhenie, mikroциркуляция и гемореология»* (Materials of VIII International conference "System circulation, microcirculation, and hemorheology"). Yaroslavl, 2011, 22 p.
4. Lebedev D.V., Chuklanov A.P., Buhareaev A.A. *Pis'ma v ZhTF*. 2009, Vol. 35, no. 8, pp. 54 - 61.
5. Paneva M.A. *Kliniko-immunologicheskaja harakteristika vnebol'nicnoj pnevmonii u bol'nyh pozhilogo i starcheskogo vozrasta: Dis. kand. med. nauk*. Omsk. 2009. 133 p.
6. Popova I.E. *Izuchenie strukturnyh svojstv jерitroцитov krovi novorozhdennyh pri oksidativnom stresse, vyzvannom gipoksiej: Dis. kand. biol. nauk*. Voronezh. 2007. 250 p.
7. Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. *Sb. mat. 15-oj Mezhdunarodnoj Pushhinskoj shkoly-konferencii molodyh uchenyh «Biologija – nauka XXI veka»* (Materials of 15th International Pushchino conference for young scientists «Biology is a science of XXI century»). Pushchino, 2011, pp. 188 - 189.
8. Fedorova M.Z., Skorkina M.Ju., Chernjavskih S.D., Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. *Patent Rossii* 24664001 27.08.2010.
9. Skorkina M.Ju., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. *Patent Rossii* 2466401 10.11.2012.
10. Sheremet'ev Ju.A. *Morfo-fiziologicheskij analiz mehanizmov La³⁺-induciruemyh agregacii i slijanija jерitroцитov: Dis. kand. med. nauk*. N. Novgorod. 2007. 154 p.
11. Pick R., Brechtefeld D., Walzog B. *Molecular Immunology*. 2013, Vol. 55, no. 1, pp. 70 - 75.
12. Wagner J.G., Roth R.A. *Pharmacological Review*. 2000, Vol. 52, no.3, pp. 349 - 374.