

27. Southern S.A., Herrington C.S. Sexual transmission infections. Z. Pract. Oncol. 1998. Vol. 74. P. 101–109.
28. Tonon S.A., Picconi M.A. et al. Clinic symptoms papilloma virus // Infection diseases Obstetric and gynecology. 1999. Vol. P. 237–240.
29. Wall wiener D., Rimbach S., Schmid H. et al. Laser in gynecology. Palliative laser treatment in genital and breast cancers // Rev. Fr. Gynecol. Obstet. 1995. Vol. 90, № 7–9. P. 329–334.
30. Wright T.C.Jr., Cox J.T., Massad L.S., Twiggs L.B., Wilkinson E.J. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities // JAMA. 2002. Vol. 287. P. 2120–2129.

Поступила в редакцию 09.11.2012 г.

Для контактов: Ежов Виктор Владимирович
E-mail: victor.yezhov52@gmail.com

УДК 616. 57.087

Горис А.П., Зарубина Е.Г., Москвин С.В.

Зависимость деформируемости эритроцитов от возраста человека

Goris A.P., Zarubina E.G., Moskvin S.V.

Dependence of Erythrocyte deformability on the human age

НОУ ВПО Самарский медицинский институт «РЕАВИЗ»

В работе представлены данные исследования деформируемости мембраны эритроцитов и их связи со структурными перестройками мембран клеток в зависимости от возраста. Была исследована кровь практически здоровых людей в 4 возрастных группах от 20 до 59 лет. Кровь получали путем венепункции в пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для измерения деформируемости эритроцитов методом «лазерный пинцет» приготавливали рабочую суспензию эритроцитов, которую получали с помощью трехкратной отмывки раствором низкой ионной силы Liss (производитель ООО «Гематолог») с режимом центрифугирования при 2700 об./мин в течение 8 мин. Определения микровязкости мембран по флуоресценции зонда пирена проводили по методу Г.Е. Добрецова. Для проведения исследований белков мембраны эритроцитов методом электрофореза их трижды отмывали по методу I. Tannert. В результате проведенных исследований были получены подтверждения о наличии выраженной дезорганизации липидного спектра мембраны эритроцитов у практически здоровых людей пожилого возраста. В мембранах эритроцитов пожилых людей увеличивается вязкость липидного бислоя, что подтвердилось достоверным ($p < 0,001$) уменьшением индекса микровязкости мембран клеток. По мере физиологического старения происходят изменения и в белковом слое мембраны эритроцитов, а именно возрастает содержание высокомолекулярных белков спектринов. То, что происходит повышение жесткости цитоскелета с увеличением возраста, подтверждается при воздействии на красные клетки крови лазерным лучом при разных силах тока в течение определенного времени. Увеличение силы тока и времени воздействия приводило к снижению деформируемости мембраны эритроцитов и увеличению процента гемолизированных клеток в ряду I–II–III–IV. *Ключевые слова:* деформируемость эритроцитов, эритроцитарная мембрана, липидный бислой, лазерный пинцет.

The present work discusses findings on the deformability of erythrocyte membranes and its correlation with the structural changes in cellular membranes depending on the patient's age. The blood taken from practically healthy subjects aged 20–59 and divided into 4 groups was examined. The blood was obtained by the venipuncture technique into tubes containing EDTA as an anticoagulant. To measure the erythrocyte deformability using the «laser pincers» technique the researchers prepared a working erythrocyte suspension which was washed three times with the solution of low ion strength Liss (manufactured by Hematolog Ltd). Centrifugation was done under 2 700 r/min for 8 minutes. The membrane microviscosity was determined with the fluorescent level of pyrene probe by Dobretzov's technique. For studying erythrocyte membrane proteins with the electrophoresis technique red blood cells were washed three times by I. Tannert's technique. The results have confirmed that there is a severe disorganization of the lipid spectrum in red blood cell membranes in practically healthy people of elderly age. In the erythrocyte membranes in elderly people one can see the increase of viscosity in the lipid bilayer what was confirmed by a significant ($p < 0.001$) decrease of the microviscosity index in cellular membranes. With physiological aging one can also see changes in the membrane protein layer in red blood cells, namely, there is an increase of high molecular protein level in the spectrins. The cytoskeleton rigidity is increasing with age, and one can confirm it while irradiating red blood cells with laser beam of various power for a definite period of time. The increase of current strength and exposure time led to the decrease of RBC membrane deformability and to the increase of hemolyzed cells in series I–II–III–IV. *Key words:* erythrocyte deformability, erythrocyte membrane, lipid bilayer, laser pincers.

Введение

Известно, что эритроцитарной мембране принадлежит ключевая роль в детерминации нормального функционирования клетки в целом [3]. Согласованная работа мембранных механизмов клетки в значительной мере определяет ее способность поддерживать клеточный гомеостаз и тонко реагировать как на воздействия факторов внешней среды, так и на изменения внутренней среды организма [3, 7].

По мнению многих исследователей, наблюдаемое снижение деформируемости эритроцитов при старении организма связано с ухудшением пластических свойств мембраны клеток [1, 4]. Сложность строения эритроцитов обуславливает зависимость их деформируемости от вязкости внутреннего содержимого и структурно-функционального состояния мембраны, причем согласно гипотезе ее мозаично-жидкостного состояния, с менее подвижным белковым матриксом, деформируемость

клетки в большей степени связана с конформантными перестройками липидного бислоя [6].

Цель исследования

Определить в разных возрастных группах людей основные изменения в состоянии и структуре липидной и белковой компонент мембран эритроцитов, влияющих на их деформируемость.

Материал и методы исследования

Были обследованы практически здоровые люди ($n = 111$) в возрасте от 20 до 59 лет, из них – 45 женщин и 66 мужчин. Для изучения возрастных особенностей эритроцитов все обследуемые люди были разделены на четыре группы: 20–29 лет (I группа); 30–39 лет (II группа); 40–49 лет (III группа); 50–59 лет (IV группа). Эритроциты получали из крови обследуемых людей путем пункции локтевой вены.

Определение деформируемости эритроцитарной мембраны проводили методом лазерного пинцета путем измерения относительного удлинения эритроцитов под воздействием излучения волоконного лазера с длиной волны 1,08 мкм и максимальной выходной мощностью 200 мВт (соответствует показанию измерителя силы тока в схеме управления – 1,2 А). Выбранная длина волны позволяет попасть в полосу прозрачности эритроцитов и минимизировать негативное воздействие излучения на объект. Скорость перемещения пятна оптической ловушки составляла около 15–20 мкм/с. Пучок от лазера проходил через коллиматор и направлялся в $\times 100$ объектив микроскопа МИН-8. Результаты экспериментов записывали на ПЗС-камеру, подключенную к компьютеру. Размер эритроцита определяли по его теневому контуру. Первоначальные размеры эритроцитов составляли от 6,2 мкм до 8,1 мкм. Деформируемость мембран эритроцитов определяли при помощи программы контурного анализа клеток [5].

Определения микровязкости мембран по флюоресценции зонда пирена проводили по методу Г.Е. Добрецова [2], причем мономеры и эксимеры имеют четко различимые спектры флюоресценции с максимумом соответственно 390 и 480 нм. Индекс микровязкости мембран определяли как отношение флюоресценции пирена при 480 и 390 нм.

Для проведения исследований белков мембраны эритроцитов их трижды отмывали 0,9% раствором хлорида натрия, затем гемолизировали, отмывку теней проводили по методу Т.С. Tannert, К. Lux [10]. Термообработку белкового препарата (в течение 5 мин) и электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na) проводили в ступенчатом градиенте плотности геля от 13,5 до 5% в течение 5,5 ч. Гели окрашивали Кумасси G 250 бриллиантовым голубым, вымачивая в растворе красителя-фиксатора, содержащего 45% метанола и 25% уксусной кислоты в течение 12 ч, дифференцировали 10% уксусной кислотой и денситометрировали. Количественную оценку содержания отдельных белковых фракций проводили методом взвешивания пиков.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. До-

стоверность различий средних величин оценивали при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Об увеличении вязкости в мембранах эритроцитов судили по изменению индекса микровязкости (табл. 1), определяемому с помощью липотропного зонда пирена.

Таблица 1
Значение индекса микровязкости мембран эритроцитов у пациентов разных возрастных групп

Показатель	I группа, n = 31	II группа, n = 29	III группа, n = 28	IV группа, n = 23
Индекс микровязкости мембран эритроцитов	0,88 ± 0,02	0,84 ± 0,03*	0,62 ± 0,01*	0,52 ± 0,02*

Примечание. * – $p < 0,001$ по сравнению со следующей группой.

Было зарегистрировано достоверное ($p < 0,001$) уменьшение индекса микровязкости мембран эритроцитов, коррелирующее с возрастом людей в ряду I–II–III–IV группы. Статистически значимое снижение микровязкости липидов мембран эритроцитов происходит именно после 40 лет – на 35,5%, после 50 лет это снижение не превышает 19,2%.

Поскольку деформируемость клеток контролируется также мембранным белком спектрином [6–7], то логично предположить, что за уменьшение коэффициента деформируемости ответственны изменения количественного содержания и (или) изменения структуры взаимосвязи спектрина в процессе жизнедеятельности клетки.

Количественные изменения в белках эритроцитов у пациентов разных групп приведены в табл. 2.

Таблица 2
Содержание белков в мембранах эритроцитов

Группы наблюдения	Номера фракций	Содержание фракций белков в мембранах Э, %
I группа, n = 31	1 (Глутатион-S-трансфераза)	4,26 ± 0,1
	4 (Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа)	4,36 ± 0,2
	13 (Спектрин)	24,61 ± 0,5
II группа, n = 29	1	4,11 ± 0,3
	4	3,81 ± 0,2
	13	25,35 ± 0,4
III группа, n = 28	1	2,32 ± 0,1
	4	2,75 ± 0,5
	13	29,65 ± 0,8*
IV группа, n = 23	1	1,32 ± 0,3**
	4	2,37 ± 0,2**
	13	38,13 ± 0,6**

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ по сравнению с группой контроля.

В первых двух группах относительное содержание высокомолекулярных скелетных белков спектринов (фракция 13) статистически не отличается друг от друга. Достоверное ($p < 0,05$) повышение содержания – на 16,9% по сравнению с пациентами II группы – отмечено у лиц старше 40 лет, у пациентов старше 50 лет по срав-

нению с лицами I и II групп это увеличение составляет уже 50,4% ($p < 0,001$).

Содержание белка 4 полосы (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, важнейший фермент энергетического обмена эритроцита) также достоверно ($p < 0,001$) снижается в мембранах эритроцитов в направлении от I к IV группе, что может приводить к нарушениям энергетического обмена красных клеток крови. У всех пациентов старших возрастных групп (в ряду I–II–III–IV групп) зарегистрировано уменьшение содержания глутатион-S-трансферазы, что сопряжено, по-видимому, с увеличением активности процессов перекисного окисления липидов и изменением качественного состояния липидов мембран эритроцитов. Одновременное снижение содержания фактически всех белковых фракций с относительно низким молекулярным весом и локализованных на внутренней стороне мембраны эритроцитов отчасти может быть объяснено структурно-функциональными изменениями мембран клеток с возрастом.

Косвенным подтверждением снижения прочности и повышения жесткости мембран с увеличением возраста мы получили, воздействуя на эритроциты при разных силах тока от 0,7 до 1,2 А в течение определенных интервалов времени (рис. 1), что приводило к резкому увеличению числа гемолизированных эритроцитов, особенно в старших возрастных группах.

Наибольшая деформируемость эритроцитарной мембраны регистрировалась при силе тока 0,9 А и времени воздействия 8 мин. При данных параметрах удавалось деформировать практически 100,0% попадающих в «ловушку» красных клеток крови, отмечалось наименьшее разрушение клеток – среди пациентов I и II групп гемолиза зарегистрировано не было, у пациентов III группы он не превышал 1,6% и в IV группе – 5,7%.

Увеличение времени воздействия при той же силе тока выявило незначительное увеличение количества клеток, давших прирост диаметра под воздействием смещающей силы луча: в I группе на 3,3%, во II – на 5,8%, в III – на 10,7% и в IV – на 22,0%, что подтверждает повышение жесткости мембран с возрастом и требует большей силы воздействия для ее деформации. Однако такая «жесткая» принудительная деформация мембран клеток привела к значительному увеличению числа разрушенных эритроцитов: в I группе количество разрушенных эритроцитов возросло до 7,3%, во II группе – до 8,7%, в III группе – 12,3% и в IV группе – 18,7%

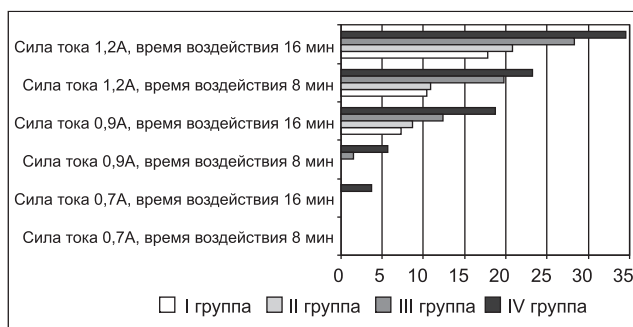


Рис. 1. Динамика увеличения числа гемолизированных эритроцитов под воздействием изменения параметров лазерной «ловушки»

клеток. Возможно, такой закономерный рост числа разрушающихся клеток был обусловлен патологическими изменениями их мембран, связанными со снижением структурообразующей функции липидной части и повышением жесткости цитоскелета.

Уменьшение интенсивности лазерного воздействия до силы тока 0,7 А приводило к уменьшению количества клеток, диаметр которых удавалось изменить. Дальнейшее увеличение силы тока или длительности воздействия не приводило к существенному возрастанию степени деформируемости клеток, значительно увеличивая гемолиз эритроцитов.

Выводы

Физиологические возрастные изменения мембран эритроцитов затрагивают и липидную, и белковую компоненты мембраны эритроцитов и заключаются в увеличении вязкости липидного бислоя и изменении процентного соотношения между высокомолекулярными и низкомолекулярными белками: повышается содержание белка спектрина и снижается содержание низкомолекулярных белков. Выявленные нарушения приводят к изменению вязко-эластических свойств крови, что связано со снижением деформируемости эритроцитов и нарушением эритроцитарного звена микроциркуляции.

Литература

1. Ганелина И.Е., Денисенко А.Д., Катюхин Л.Н. Липиды плазмы крови и реологические свойства эритроцитов у больных со стабильной стенокардией // Кардиология. 2000. Т. 40, № 8. С. 62–63.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. М.: Издательство «Наука», 1989. 277 с.
3. Кленова Н.А. Биохимические механизмы дезинтеграции эритроцитов человека в различных условиях функционирования: Автореф. дисс. ... д. б. н. Тюмень, 2003. 35 с.
4. Колосова М.В., Новицкий В.В., Степовая Е.А. Состав липидов мембран эритроцитов и их биофизические характеристики у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом в процессе терапии // Клин. лабор. диагност. 2001. № 1. С. 10–12.
5. Коробцов А.В., Котова С.П., Лосевский Н.Н. и др. Применение лазерного пинцета для изучения механических свойств эритроцитов // Извест. Самарского науч. центра Рос. акад. наук. 2009. Т. 11, № 3. С. 76–81.
6. Кублинская М.М. Изменения структуры мембраны эритроцитов при физиологическом старении и болезни Альцгеймера: Автореф. дисс. ... к. м. н. Томск, 2002. 22 с.
7. Лисовская И.И. Популяционная характеристика эритроцитов человека в норме и патологии; фильтрационно-осмотические методы исследования деформируемости: Автореф. дисс. ... д. б. н. М., 2004. 25 с.
8. Снегирева Л.В., Иванов В.П. Реологические свойства эритроцитов в их онтогенезе // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». 2007. № 1. С. 35 с.
9. Степовая Е.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. Роль нарушений структуры мембраны и метаболизма эритроцитов в развитии анемии у больных со злокачественными новообразованиями // Гематол. и трансфузиол. 2003. № 5. С. 11–18.
10. Tannert T.C., Lux K. Spreading of red cell bloodsuspensions on paper as a simple test of cell deformability // Acta biol. med. germ. 1981. Vol. 40. P. 739–742.

Поступила в редакцию 31.10.2011 г.

Для контактов: Москвин Сергей Владимирович
E-mail: 7652612@mail.ru