



ВОЗРАСТНЫЕ И ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕОМЕТРИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ И ЖЕСТКОСТИ МЕМБРАН ЛЕЙКОЦИТОВ

В.Н. Тукин

М.З. Федорова

*Белгородский государственный
национальный
исследовательский
университет
Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы 85*

E-mail: fedorova@bsu.edu.ru

Возрастные изменения геометрических параметров лейкоцитов крови здоровых мужчин и женщин проявляются в виде увеличения диаметра, площади поверхности и объема клеток. У лиц обоего пола с возрастом регистрируется повышение жесткости мембран лейкоцитов. Все выявленные изменения более выражены у женщин.

Ключевые слова: нейтрофилы, лимфоциты, морфометрические параметры, жесткость мембран, атомно-силовая микроскопия.

Введение

На сегодняшний день имеется большое количество исследований, посвященных изучению гемодинамики, но до последнего времени, в связи с малым содержанием лейкоцитов в крови (около 1% от общей массы клеток), не принималось во внимание их влияние на поток крови через микрососуды. Вместе с тем, лейкоциты ведут себя в потоке, как более упругие и резистентные, по сравнению с эритроцитами, клетки, которые могут существенно нарушать кровоток в капиллярах вплоть до полного его прекращения. Поведение белых клеток крови в микрососудах зависит, прежде всего, от площади поверхности и объема этих клеток, а также от их механических свойств. Прижизненные размеры лейкоцитов незначительно отличаются от размеров эритроцитов. Основные различия заключаются в корпускулярном объеме. Кроме того, лейкоциты имеют упругое ядро, занимающее значительный объем: у гранулоцитов – 20%, у лимфоцитов – 44% [1].

Современные компьютеризированные цитологические методы, применяемые в области исследования клеточной физиологии, дают возможность изучить морфологию клеток на качественно новом уровне, с более высокой точностью и воспроизводимостью, чем при мануальных методах. Экспериментальными и клиническими исследованиями установлено, что изменение контактных и эластичных свойств клеток относится к числу универсальных составляющих адаптационных и компенсаторных реакций организма при дисфункциях различного генеза и степени выраженности [2, 3, 4].

Данные многомерного анализа клеток положены в основу создания моделей, позволяющих раскрывать фундаментальные аспекты патогенеза многих функциональных состояний и нарушений в организме. В трехмерном изображении, полученном с помощью электронной микроскопии, заложены сведения об особенностях строения поверхностной цитоархитектоники мембраны, позволяющие структурно охарактеризовать различные формы клеток, определить их функциональные особенности и описать геометрические характеристики [5].

Актуальность исследования определяется недостаточной решенностью одной из проблем физиологии и медицины – динамики возрастно-половых характеристик микрореологических свойств клеток крови [6, 7].

Цель работы – изучение геометрических показателей и жесткости мембран лейкоцитов крови практически здоровых мужчин и женщин различных возрастных групп. Задачи исследования: 1) методами атомно-силовой микроскопии установить диаметр, величину объема, площади поверхности лейкоцитов крови; 2) определить

показатели жесткости мембран лейкоцитов; 3) оценить возрастную динамику изученных показателей.

Материал и методы

Объектом исследования служила кровь 43 практически здоровых доноров Белгородской областной станции переливания крови. Мужчины и женщины были разделены на 2 возрастные группы. Среди мужчин: 1 группа (n=13) – мужчины от 21 до 34 лет (взрослые), 2 группа (n=10) – мужчины от 35 до 60 лет (зрелый возраст). Среди женщин: 1 группа (n=10) – женщины от 20 до 34 года (взрослые), 2 группа (n=10) – женщины от 35 до 55 лет (зрелый возраст).

Кровь для исследования получали из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 20 ед./мл. Кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин, собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами, и лейкоцитарное кольцо. Примесь эритроцитов разрушали 0.83%-ным раствором хлорида аммония. Клетки дважды отмывали изотоничным буферным раствором (раствор Дульбекко, $pH=7.4$). На атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА ВИТА (Россия, Зеленоград) проводили морфометрию лейкоцитов, определяли средний объем и площадь поверхности с использованием программного обеспечения «Nova 1.0.26 Build 1397» (НТ МДТ). Сканировали нативные клетки в условиях влажной камеры, предотвращающей их высыхание, при комнатной температуре. АСМ-изображения клеток для всех серий были получены в режиме полуконтактного сканирования.

Результаты, полученные при проведении исследования, были обработаны методами вариационной статистики с использованием программы «Microsoft Excel». Степень достоверности межгрупповых различий определяли по критерию t Стьюдента, статистически достоверными считались результаты при $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Геометрические показатели и механические свойства лейкоцитов здоровых мужчин и женщин представлены в таблицах 1 и 2. При сравнении морфометрических параметров лимфоцитов мужчин, мы установили достоверное увеличение (на 22.3%) площади поверхности этого клеточного пула у зрелого возраста (группа 2). Вместе с тем, диаметр и объем лимфоцитов в численных значениях больше у мужчин 1-ой группы, но данные различия недостоверны. По геометрическим показателям нейтрофилов крови достоверных различий не установлено. В качестве тенденции проявляется увеличение у мужчин зрелого возраста диаметра, площади поверхности и объема нейтрофилов по сравнению с мужчинами 1 группы. Выявленные возрастные изменения свидетельствуют о создании условий, затрудняющих кровотоки по мелким капиллярам.

Таблица 1

Показатели лейкоцитов мужчин (M±m)

Показатель, ед. измерения	Мужчины	
	1 группа (n=13)	2 группа (n=10)
Диаметр лимфоцитов, мкм	8.16±0.07	7.73±0.09
Площадь поверхности лимфоцитов, мкм ²	95.05±2.84	116.26±4.18*
Объем лимфоцитов, мкм ³	130.02±5.21	129.28±5.71
Средняя жесткость мембраны лимфоцитов, Pa	8.70±0.93	9.17±1.11
Диаметр нейтрофилов, мкм	12.64±0.08	13.26±0.11
Площадь поверхности нейтрофилов, мкм ²	144.89±3.18	150.44±6.17
Объем нейтрофилов, мкм ³	103.17±5.89	104.95±6.08
Средняя жесткость мембраны нейтрофилов, Pa	9.10±1.03	9.48±1.45

Примечание: * – достоверность различий между мужчинами по критерию Стьюдента ($p < 0.05$).



Аналогичные показатели лейкоцитов здоровых женщин представлены в табл. 2. На основе сравнения морфометрических параметров установлено достоверное увеличение (на 22.6%) площади поверхности лимфоцитов у женщин зрелого возраста (группа 2). Вместе с тем, диаметр лимфоцитов в численных значениях больше у взрослых женщин, но данные различия недостоверны.

Диаметр нейтрофилов также достоверно больше у женщин группы 2 (на 9.3%). По другим геометрическим показателям нейтрофилов крови достоверные различия не установлены. В качестве тенденции проявляется увеличение у женщин зрелого возраста диаметра нейтрофилов.

Таблица 2

Показатели лейкоцитов женщин (M±m)

Показатель, ед. измерения	Женщины	
	1 группа (n=10)	2 группа (n=10)
Диаметр лимфоцитов, мкм	8.24±0.06	8.70±0.08 [#]
Площадь поверхности лимфоцитов, мкм ²	107.05±2.53 [*]	131.26±3.68 ^{**}
Объем лимфоцитов, мкм ³	141.07±5.01	137.28±4.99
Средняя жесткость мембраны лимфоцитов, Pa	8.82±1.02	9.04±0.96
Диаметр нейтрофилов, мкм	12.82±0.08	14.01±0.12 ^{**}
Площадь поверхности нейтрофилов, мкм ²	155.89±3.10 [*]	159.44±6.07
Объем нейтрофилов, мкм ³	105.88±5.99	109.95±5.22
Средняя жесткость мембраны нейтрофилов, Pa	9.16±1.12	9.49±1.32

Примечание: * – достоверность различий между женщинами по критерию Стьюдента ($p < 0,05$); # – достоверность различия между мужчинами и женщинами внутри одновозрастных групп.

При сравнении между собой одновозрастных групп разного пола, было установлено, что у взрослых женщин больше площадь поверхности лимфоцитов и нейтрофилов (на 12.6% и 7.6% соответственно) по сравнению со взрослыми мужчинами. У зрелых женщин также больше диаметр и площадь поверхности лимфоцитов (на 12.5% и 12.9% соответственно), а также диаметр нейтрофилов (на 5.7%) по сравнению со зрелыми мужчинами.

На основании результатов силовой спектроскопии лимфоцитов и нейтрофилов установлено, что с возрастом наблюдается повышение жесткости мембран лейкоцитов. Причем данные изменения более выражены у женщин.

Заключение

На основе проведенных исследований выявлены возрастные изменения геометрических показателей и механических свойств (жесткости) лейкоцитов. У мужчин и женщин зрелого возраста, по сравнению с взрослыми, установлено достоверное увеличение площади поверхности лимфоцитов, а также диаметра нейтрофилов у зрелых женщин. Как тенденцию можно рассматривать увеличение у лиц зрелого возраста диаметра, площади поверхности и объема лимфоцитов и нейтрофилов по сравнению с взрослыми людьми. Сравнительный анализ одновозрастных групп разного пола показал, что у взрослых женщин, по сравнению с мужчинами, больше площадь поверхности лимфоцитов и нейтрофилов; у зрелых женщин – больше диаметр и площадь поверхности лимфоцита, а также диаметр нейтрофилов. Это свидетельствует о развитии условий, затрудняющих кровотоки по мелким капиллярам. Результаты силовой спектроскопии лимфоцитов и нейтрофилов выявили, что с возрастом наблюдается повышение жесткости мембран лейкоцитов. Все выявленные возрастные сдвиги более выражены у женщин.

Список литературы

1. Редчиц Е.Г., Парфенов А.С. Реологические свойства лейкоцитов и их участие в микроциркуляции крови // Гематология и трансфузиология. – 1989. – Т. 34, № 12. – С. 40-45.
2. Агаджанян Н.А., Федорова М.З. Реактивность лейкоцитов в различных условиях среды // Экология человека. – 2001. – № 4. – С. 66-68.
3. Федорова М.З. Реактивность лейкоцитов крови при различных функциональных нарушениях. – М.; Ярославль, 2001. – 68 с.
4. Федорова М.З., Левин В.Н., Горичева В.Д., Тяпкина А.Д. Функциональная активность нейтрофилов при перегревании, охлаждении и дегидратации организма // Тез. докл. XVIII съезда физиол. об-ва им. И.П. Павлова. – Казань, 2001. – С. 442.
5. Муравьев А.В., Чепоров С.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). – Ярославль: Изд-во ЯГПУ, 2009. – 178 с.
6. Саркисян Г.П., Калинина И.А., Булычева Т.И. Иммунофенотипическая и функциональная характеристика лимфоцитов крови у больных апластической анемией на фоне иммуносупрессивной терапии // Гематология и трансфузиология. – 2003. – № 3. – С. 23-26.
7. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов // Иммунология. – 2004. – №5. – С. 312-318.

AGE FEATURES OF CHANGES IN GEOMETRICAL STRUCTURE AND RIGIDITY OF LEUKOCYTE MEMBRANES OF MEN AND WOMEN

V.N. Tugin
M.Z. Fedorova

*Belgorod State National Research University
Pobedy St. 85, Belgorod, 308015,
Russia
E-mail: fedorova@bsu.edu.ru*

Age-related changes of geometrical parameters of white blood cells of healthy men and women appear as an increase in the diameter, surface area and volume of cells. The increasing with age rigidity of membranes of leukocytes in individuals of both sexes is recorded. All identified changes were more pronounced in women.

Key words: neutrophils, lymphocytes, morphometric parameters, the rigidity of membranes, atomic force microscopy.