

# ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

УДК 612.111

## ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОЦЕНКЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ (НА ПРИМЕРЕ ЭРИТРОЦИТОВ)

**Т.В. ПАВЛОВА<sup>1</sup>, К.И. ПРОЩАЕВ<sup>1,2</sup>**  
**Н.И. ЖЕРНАКОВА<sup>1</sup>, В.В. БАШУК<sup>1</sup>**  
**Н.М. ПОЗДНЯКОВА<sup>1,2</sup>, А.В. СЕЛИВАНОВА<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет*

*<sup>2</sup>АНО «Научно-исследовательский  
медицинский центр «Геронтология»»,  
г. Москва*

*e-mail: pavlova@bsu.edu.ru*

Изучены морфофункциональные свойства эритроцитов при заболеваниях, ассоциированных с преждевременным старением – артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца, сахарным диабетом типа 2. Описаны признаки, которые могут служить критериями преждевременного старения в клиническую, так и в доклиническую стадии заболеваний.

Ключевые слова: эритроциты, таргетные клетки, преждевременное старение.

**Введение.** С развитием цивилизации и с увеличением продолжительности жизни у людей стали наблюдаться процессы преждевременного старения. Предупреждение преждевременного старения человека и продление активного долголетия – основная задача геронтологии, как важная медицинская медико-биологическая и медико-социальная проблема, а изучение процессов преждевременного старения является ключом к разработке программ профилактики возраст-сцепленных состояний [1, 3]. Одним из объектов изучения могут быть клетки крови [2]. На сегодняшний день существует твердое убеждение в том, что характеристики крови достоверно отражают процессы, происходящие в организме [4, 6]. Поэтому параметры, отражающие характеристики крови, могут также выступать в качестве интегрального критерия преждевременного старения [2, 5].

**Цель работы** – изучить морфофункциональные характеристики эритроцитов как таргетных клеток при процессах преждевременного старения.

**Материал и методы исследования.** В исследование было включено 253 человека: 122 человека среднего возраста и 131 человек пожилого возраста. Все люди, включенные в исследование, были разделены на несколько групп:

1. Практически здоровые люди (n=61):

1.1. практические здоровые люди среднего возраста (n=31, возраст от 40 до 49 лет, средний возраст 44,1±2,2 года, мужчин – 17 чел., женщин – 14 чел.);



1.2. практические здоровые люди пожилого возраста ( $n=30$ , возраст от 60 до 69 лет, средний возраст  $64,4 \pm 2,3$  года, мужчин – 14 чел., женщин – 16 чел.).

2. Пациенты, страдающие артериальной гипертензией (АГ) ( $n=61$ ):

2.1. пациенты среднего возраста, страдающие АГ: ( $n=30$ , возраст от 40 до 49 лет, средний возраст  $44,8 \pm 3,1$  года, мужчин – 11 чел., женщин – 19 чел.);

2.2. пациенты пожилого возраста, страдающие АГ ( $n=31$ , возраст от 60 до 69 лет, средний возраст  $64,0 \pm 2,7$  года, мужчин – 13 чел., женщин – 18 чел.).

При этом все пациенты страдали АГ II-III степени, 2-й – 4-й степени риска развития сердечно-сосудистых катастроф.

3. Пациенты, страдающие АГ и ишемической болезнью сердца (ИБС) ( $n=63$ ):

3.1. пациенты среднего возраста, страдающие АГ и ИБС ( $n=31$ , возраст от 40 до 49 лет, средний возраст  $45,2 \pm 2,7$  года, мужчин – 21 чел., женщин – 10 чел.);

3.2. пациенты пожилого возраста, страдающих АГ и ИБС ( $n=32$ , возраст от 60 до 69 лет, средний возраст  $65,8 \pm 2,2$  года, мужчин – 19 чел., женщин – 13 чел.).

Все пациенты в этой группе страдали АГ II-III степени, 3-й – 4-й степени риска развития сердечно-сосудистых катастроф ИБС в виде стенокардии напряжения I-III функционального класса (ФК), хронической сердечной недостаточностью (ХСН) ФК I-II по классификации NYHA.

4. Пациенты, страдающие АГ, ИБС и сахарным диабетом (СД) 2 типа ( $n=68$ ):

4.1. пациенты среднего возраста, страдающие АГ, ИБС и СД 2 типа ( $n=30$ ) (возраст от 40 до 54 лет, средний возраст  $48,2 \pm 2,6$  года, мужчин – 8 чел., женщин – 22 чел.);

4.2. пациенты среднего возраста, страдающие АГ, ИБС и СД 2 типа ( $n=38$ , возраст от 60 до 69 лет, средний возраст  $65,6 \pm 2,1$  года, мужчин – 13 чел., женщин – 25 чел.).

Все пациенты в этой группе страдали АГ II-III степени, 4-й степени риска развития сердечно-сосудистых катастроф и ИБС в виде стенокардии напряжения I-III функционального класса (ФК), хронической сердечной недостаточностью (ХСН) ФК I-II по классификации NYHA, СД II типа легкой и средней степени тяжести.

Проводили сканирование эритроцитов методом зондовой и растровой микроскопии с элементным анализом. Зондовую сканирующую микроскопию проводили на сканирующем зондовом микроскопе Ntegra-Aura. Осуществлялся забор крови, проводилось приготовление образцов крови, сканирование клеток в режиме полуконтактной атомно-силовой микроскопии и проводилось измерение геометрических параметров клеток. При этом образец готовился из суспензии нативных эритроцитов, предварительно отмытых от плазмы, путем нанесения капли на чистое обезжиренное предметное стекло (особенностью является то, что брались стекла для иммуногистохимии, что исключало искажение результатов вследствие иммунных реакций), помещался образец во влажную камеру, насыщенную парами воды, закрытую мембраной, и проводилось сканирование в парах воды в полуконтактном режиме, используя коммерческие Si или SiN-кантилеверы серии NSG 01 (NT-MDT, Россия) в режимах постоянного или прерывистого контактов на приборе «Ntegra-Aura» (Компания НТ-МДТ, г. Зеленоград, Россия). Обработку и построение АСМ-изображений проводили при помощи программного обеспечения «NOVA» (НТ-МДТ, Россия) и «ImageAnalysis» (НТ-МДТ, Россия). Использование способа позволяет сократить время исследования и получать сканы клеток с высоким разрешением, сохраняя их жизнеспособность, нативные размеры и форму.

Для электронной микроскопии образцы готовились таким же образом и затем просматривали в растровых микроскопах FE1 Quanta 200 3D, а также FE1 Quanta 600 FEG.

Статистическую обработку материала выполняли на персональном компьютере типа IBM PC (программы Microsoft Excel, Statistica 6.0). При статистическом анализе материала выполняли расчет интенсивных и экстенсивных показателей средних величин, определяли достоверность различий средних и относительных величин по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** При анализе результатов проведения атомно-силовой микроскопии эритроцитов, оказалось, что у практически здоровых людей среднего возраста в абсолютном большинстве случаев были получены сканы клеток правильной формы и размеров ( $97,5 \pm 0,3\%$  клеток от общего числа сканированных эритроцитов) (рис. 1, 2). В полях зрения встречались эритроциты с явлениями сладжа ( $2,0 \pm 0,2\%$ ) и клетки-тени ( $3,5 \pm 0,3\%$  клеток).

У практически здоровых людей пожилого возраста наблюдалась схожая картина. В абсолютном большинстве случаев были получены сканы клеток правильной формы ( $96,8 \pm 0,4\%$  клеток от общего числа сканированных эритроцитов), в полях зрения встречались эритроциты с явлениями сладжа ( $2,3 \pm 0,2\%$ ) и клетки-тени ( $3,9 \pm 0,3\%$  клеток). При этом достоверных отличий по сравнению с параметрами эритроцитов у людей среднего возраста выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

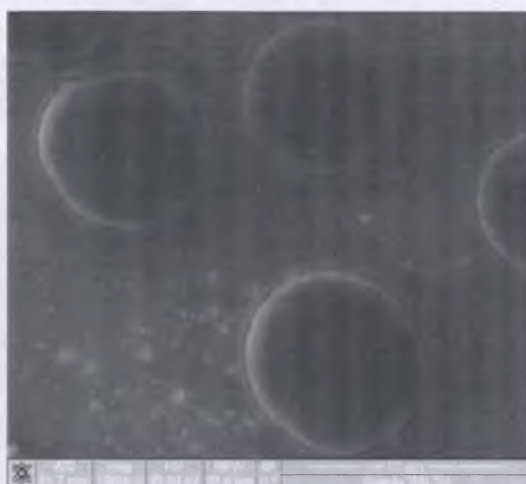


Рис. 1. Эритроциты у практически здоровых людей (x 10000)

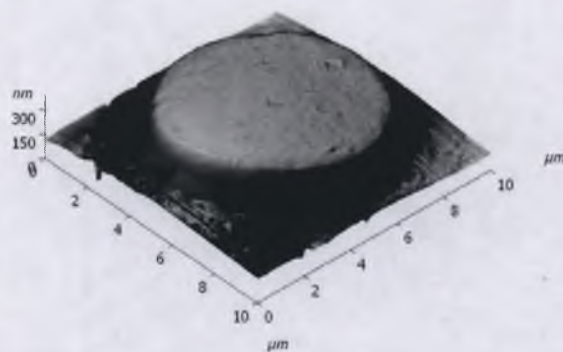


Рис. 2. Трехмерная гистограмма нормальных эритроцитов у практически здоровых людей (атомно-силовая микроскопия, x 20000)

При сканировании эритроцитов больных АГ среднего возраста наблюдались следующие изменения – появлялись эритроциты с эффектом «спущенного мяча» ( $2,0 \pm 0,1\%$  эритроцитов от общего числа сканированных клеток), что не наблюдалось у практически здоровых людей и свидетельствовало о нарушении эластичности мембран, повышалась сладжированность ( $7,1 \pm 0,2\%$  клеток,  $p < 0,05$  по сравнению с практически здоровыми людьми среднего возраста), увеличивалось вследствие нарушения стабильности плазмолемм количество клеток неправильной формы (до  $6,1 \pm 0,3\%$ ,  $p < 0,05$  по сравнению с практически здоровыми людьми среднего возраста),



при этом количество клеток-теней достоверно не отличалось ( $p > 0,05$ ) от их содержания в крови здоровых людей и составило  $3,7 \pm 0,3\%$  от общего числа сканированных эритроцитов.

Аналогичные данные были получены при сканировании крови у людей пожилого возраста, страдающих АГ. При сканировании эритроцитов больных АГ пожилого возраста наблюдались следующие изменения – появлялись эритроциты с эффектом «спущенного мяча» ( $2,2 \pm 0,2\%$  эритроцитов от общего числа сканированных клеток), что не наблюдалось у практически здоровых людей, повышалась сладжированность ( $7,4 \pm 0,2\%$  клеток,  $p < 0,05$  по сравнению с практически здоровыми людьми пожилого возраста), увеличивалось вследствие нарушения стабильности плазмолемм количество клеток неправильной формы (до  $6,2 \pm 0,4\%$ ,  $p < 0,05$  по сравнению с практически здоровыми людьми пожилого возраста), при этом количество клеток-теней достоверно не отличалось ( $p > 0,05$ ) от их содержания в крови здоровых людей и составило  $3,8 \pm 0,2\%$  от общего числа сканированных эритроцитов. В целом, при АГ достоверных отличий между группами людей среднего и пожилого возраста выявлено не было.

В то же время, при сканировании эритроцитов больных АГ в сочетании с ИБС наблюдались более выраженные изменения.

У людей среднего возраста, страдающих АГ и ИБС, наблюдались следующие изменения: количество эритроцитов с эффектом «спущенного мяча» возросло до  $5,1 \pm 0,1\%$  от общего числа сканированных эритроцитов, повышалась сладжированность –  $11,1 \pm 0,2\%$ , количество неправильных форм эритроцитов также возросло –  $9,1 \pm 0,1\%$ , увеличивалось количество клеток-теней до  $5,2 \pm 0,2\%$  (для всех показателей  $p < 0,05$  по сравнению с пациентами среднего возраста, страдающими АГ).

У людей пожилого возраста, страдающих АГ и ИБС, наблюдались следующие изменения: количество эритроцитов с эффектом «спущенного мяча» возросло до  $5,1 \pm 0,1\%$  от общего числа сканированных эритроцитов, повышалась сладжированность –  $15,1 \pm 0,2\%$ , количество неправильных форм эритроцитов также возросло –  $12,2 \pm 0,1\%$ , увеличивалось количество клеток-теней до  $5,2 \pm 0,2\%$  (для всех показателей  $p < 0,05$  по сравнению с пациентами пожилого возраста, страдающими АГ). При этом количество неправильных форм эритроцитов и степень сладжированности была достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у людей среднего возраста с сочетанием АГ и ИБС (рис 3, 4).

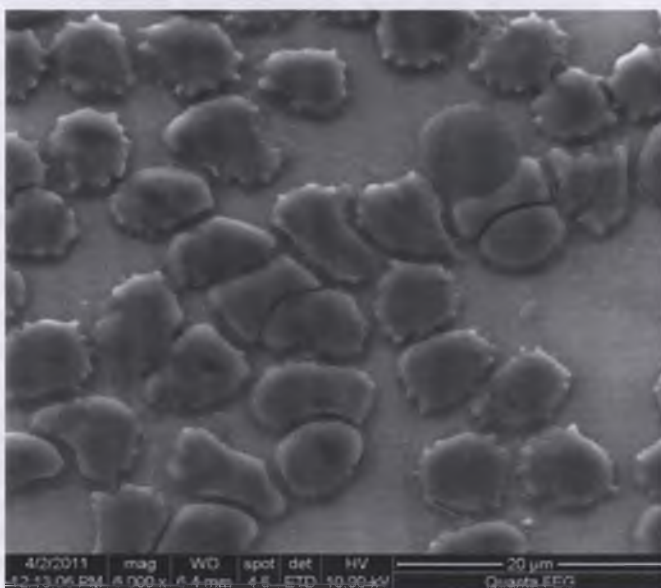


Рис. 3. Эритроциты у больных с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца (изменение формы клеток, сладжированность клеток, наличие эритроцитов с эффектом спущенного мяча, клеток-теней) (x 6000)

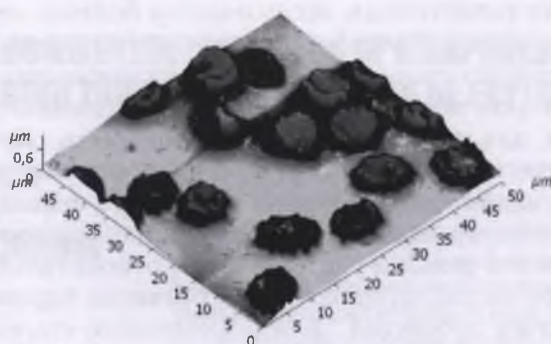


Рис. 4. Трехмерная гистограмма эритроцитов у больных с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца (атомносиловая микрокопия, x 5000)

Изучение образцов крови, полученных от больных АГ в сочетании с ИБС и СД 2 типа показало следующее. У людей среднего возраста, страдающих АГ, ИБС и СД 2 типа, наблюдались изменения, схожие с группой больных, страдающих АГ и ИБС. Количество эритроцитов с эффектом «спущенного мяча» составило  $5,2 \pm 0,2\%$  от общего числа сканированных эритроцитов, сладжированность –  $12,0 \pm 0,2\%$ , количество неправильных форм эритроцитов –  $9,0 \pm 0,1\%$ , количество клеток-теней –  $5,2 \pm 0,3\%$  (для всех показателей  $p < 0,05$  по сравнению с пациентами среднего возраста, страдающими АГ и  $p > 0,05$  по сравнению с пациентами среднего возраста, страдающими АГ и ИБС). Вместе с тем, обращал на себя внимание факт наличия пойкилоцитоза. При этом пойкилоцитоз проявлялся преимущественно в наличии макроцитов (до  $8,72 \mu\text{m}$ ) на фоне средних размеров клеток  $7,01 \pm 0,05 \mu\text{m}$ , меньшего такового у практически здоровых людей среднего возраста ( $7,50 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ).

У людей пожилого возраста, страдающих АГ, ИБС и СД 2 типа, наблюдались следующие изменения: количество эритроцитов с эффектом «спущенного мяча» составило  $5,2 \pm 0,1\%$  от общего числа сканированных эритроцитов, сладжированность –  $15,2 \pm 0,2\%$ , количество неправильных форм эритроцитов –  $12,4 \pm 0,2\%$ , количество клеток-теней –  $5,4 \pm 0,4\%$  (для всех показателей  $p < 0,05$  по сравнению с пациентами пожилого возраста, страдающими АГ и  $p > 0,05$  по сравнению с пациентами среднего возраста, страдающими АГ и ИБС). При этом количество неправильных форм эритроцитов и степень сладжированности была достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у людей среднего возраста с сочетанием АГ, ИБС и СД 2 типа (рис 3, 4). При этом также обращал на себя внимание факт наличия пойкилоцитоза, проявляющегося преимущественно в наличии макроцитов (до  $8,71 \mu\text{m}$ ) на фоне среднего размера клеток  $7,00 \pm 0,06 \mu\text{m}$ , меньшего такового у практически здоровых людей пожилого возраста ( $7,51 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ).

Также у людей, как среднего, так и пожилого возраста отмечалось наличие эритроцитов с одиночными выростами.

При изучении эритроцитов с помощью сканирующей микроскопии было показано, что в зависимости от наличия/отсутствия возраст-ассоциированной патологии, ее тяжести, происходило нарастание морфофункциональных изменений эритроцитов. Все эти изменения можно разделить на 5 групп: 1) изменение формы клеток (появление неправильных форм эритроцитов, эритроцитов с одиночными выростами); 2) изменение размера клеток (пойкилоцитоз с преобладанием макроцитоза на фоне уменьшенного среднего размера клеток); 3) нарушение связей между клетками (повышение степени сладжированности); 4) нарушение эластичности мембран клеток (появление эритроцитов с эффектом «спущенного мяча»); 5) повышенная деструкция клеток (увеличение количества клеток-теней).

Результаты настоящего исследования позволяют с уверенностью утверждать, что эритроциты являются таргетными клетками при процессах преждевременного



старения и ассоциированных с ним заболеваний. Наличие во многом сходных изменений как в организме пожилых людей, так и средних людей при ряде соматической патологии (артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2 типа) позволяет считать эти заболевания в среднем возрасте ассоциированными с процессами преждевременного старения, а само преждевременное старение, в свою очередь – рисковым фактором по возникновению и усугублению этих заболеваний.

В связи с этим, для таких пациентов важно иметь маркеры преждевременного старения на доклинической стадии. Для оценки процессов в доклиническую стадию согласно результатам нашего исследования могут быть использованы морфофункциональные характеристики эритроцитов (повышенная сладжированность, нарушение формы, появление клеток-теней и т.д.). С учетом относительной трудоемкости применения данного методов на сегодняшнем этапе развития здравоохранения они не могут быть способом скрининга процессов преждевременного старения для всех клинически здоровых пациентов среднего возраста. Однако из всех здоровых пациентов необходимо выделять группу риска – это пациенты с наличием известных факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета второго типа. В отношении этих пациентов можно проводить морфофункциональные исследование эритроцитов. Далее из тех пациентов, в отношении которых такое исследование проведено, необходимо выделить группу пациентов, у которых морфофункциональных изменений эритроцитов нет (лица без преждевременного старения), и тех, у кого такие изменения есть (лица с преждевременным старением). Вот в отношении последних будет необходимо проведение корректирующих программ биологического возраста.

### Выводы

1. При соматических заболеваниях, ассоциированных с процессами преждевременного старения, наблюдаются изменения морфофункциональных свойств эритроцитов, основными из которых являются следующие: увеличение количества неправильных форм эритроцитов до 9,0% клеток от общего числа эритроцитов в кровеносном русле, количества эритроцитов с эффектом «спущенного мяча» – до 5,2%, количества клеток-теней – до 5,2%, количества эритроцитов, вовлеченных в процессы сладжирования – до 12,0%.

2. Усугубление полиморбидности генерирует появление новых негативных свойств эритроцитов. В частности, при сочетании артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца и сахарного диабета 2 типа формируется пойкилоцитоз, проявляющийся в наличии макроцитов (размером до 8,7μм) на фоне среднего размера клеток 7,0μм, меньшего такового у практически здоровых людей 7,5μм.

3. Эритроциты можно рассматривать как клетки-мишени при процессах преждевременного старения. При этом все изменения крови, сопряженные с процессами преждевременного старения, характеризуются преимущественно повышением сладжированности, нарушением формы, деструкцией клеток, а также рядом других параметров.

### Литература

1. Лазебник, Л.Б. Полиморбидность у пожилых / Л.Б. Лазебник // Сердце. – 2007. – № 7. – С. 25-27.
2. Павлова, Т.В. Содержание кислорода в эритроцитах пожилых больных с полиморбидной патологией / Т.В.Павлова, Н.М.Позднякова, К.И.Процаев, В.В. Башук // Тезисы VII научно-практической геронтологической конференции «Пушковские чтения», Санкт-Петербург, 19-20 декабря 2011г. – Российский семейный врач. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 94.
3. Epstein, M. Diabetes mellitus and hypertension / M. Epstein, J.R. Sowers // Hypertension. – 1992. – Vol. 19. – P. 403-418.
4. Littarru, G.P. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments / G.P. Littarru, L. Tiano. – Mol. Biotechnol. – 2007. – № 37(1). – P. 31-37.
5. Prashchayeu, K. The possibilities of investigation of morphofunctional properties of erythrocytes in the estimation of effectiveness of fixed combination in patient with metabolic syndrome / K. Prashchayeu, T.Pavlova, N.Pozdnyakova, V.Bashuk, A.Ilnitski // The 4<sup>th</sup> International Conference on Fixed Combination in the Treatment of Hypertension, Dyslipidemia and Diabetes Mellitus, Paris, France, December 1-4, 2011. – P. 127.



6. Traxler, S.A. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity / S.A. Traxler, C.W. Deveney, B.A. Jobe // Clin. Exp. Immunol. – 2006. – №146(1). – P. 39-46.

## **INNOVATED TECHNOLOGIES IN INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF EARLY AGING TARGET CELLS (IN CASES BE ERYTHROCYTES)**

**T.V. PAVLOVA<sup>1</sup>, K.I. PRASHCHAYEU<sup>1,2</sup>**  
**N.I. JERNAKOVA<sup>1</sup>, V.V. BASHUK<sup>1</sup>**  
**N.M. POZDNYAKOVA<sup>1,2</sup>, A.V. SELIVANOVA<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Belgorod National Research University*

*<sup>2</sup>ANO "Research Medical Centre "Gerontology", Moscow*

*e-mail: pavlova@bsu.edu.ru*

The morphofunctional parameters of erythrocytes in clinical models of early ageing (arterial hypertension, coronary heart disease, diabetes mellitus type 2) are investigated. The characteristics and criteria of early ageing in clinical and pre-clinical periods of diseases are described in this article.

Keywords: erythrocytes, target cells, early ageing.