

## **ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ЖЕСТКОСТЬЮ МЕМБРАН ГЕМОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И ЖЕНЩИН**

**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 показателей крови проявляются в повышении уровня холестерина и триглицеридов и снижении АСТ. Выявлена возрастная тенденция роста содержания в крови глюкозы, а также жесткости мембран клеток крови, более выраженная у женщин. Корреляционный анализ показал зависимость средней жесткости мембраны эритроцита от содержания ионов кальция в плазме крови женщин.

Ключевые слова: биохимические показатели, эритроциты, лейкоциты, жесткость мембраны, атомно-силовая микроскопия.

### **Введение**

В современных медико-биологических исследованиях особую актуальность приобретает необходимость применения в качестве контроля за состоянием здоровья надежных тестов диагностики. Для того, чтобы получить полное представление о работе того или иного органа тела человека, уже не одно десятилетие успешно применяют метод биохимического анализа крови. Это один из способов лабораторной диагностики, который очень информативен и отличается высокой степенью достоверности [1, 2]. К числу диагностических тестов также относятся пробы, позволяющие оценить функциональные свойства клеток крови, обеспечивающих реализацию жизненно важных функций (транспорт  $O_2$ , защитные реакции) и играющих важную роль в создании местного сосудистого сопротивления и органной перфузии. Одним из перспективных методов изучения морфофункциональной организации клеток в настоящее время становится атомно-силовая микроскопия (АСМ). Экспериментальными и клиническими исследованиями показана универсальность механизма нарушений реологических свойств форменных элементов крови при измененных функциональных состояниях разного генеза. В частности, установлено повышение жесткости клеточных структур при действии на организм различных экстремальных факторов (дегидратация, гипотермия, гипертермия, острое воспаление), изменение контактных и упругих свойств клеток крови при сосудистых нарушениях [1, 2, 3, 4].

Целью данного исследования было установление возрастных изменений и наличия связи между биохимическими показателями крови и жесткостью мембран эритроцитов и лейкоцитов крови мужчин и женщин. Задачи исследования: 1) изучить возрастную динамику биохимических показателей крови у мужчин и женщин; 2) методами атомно-силовой микроскопии определить показатели жесткости мембран эритроцитов и лейкоцитов; 3) выявить наличие корреляционных связей между полученными данными.

### **Материал и методы**

Объектом исследования служила кровь 50 практически здоровых доноров Белгородской областной станции переливания крови. Мужчины и женщины были разделены на 2 возрастные группы (взрослый и зрелый возраст). Среди мужчин – 1 группа ( $n=14$ ) – мужчины от 21 до 34 лет (взрослые), 2 группа ( $n=12$ ) – от 35 до 60 лет (зрелый возраст). Среди женщин – 1 группа ( $n=12$ ) – женщины от 20 до 34 лет (взрослые), 2 группа ( $n=12$ ) – от 35 до 55 лет (зрелый возраст).



Кровь для исследования получали из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 20 ед./мл. Производили разделение проб крови на плазму, лейкоциты и эритроциты. Кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин, отделяли верхнюю часть плазмы для биохимических исследований, собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами, и лейкоцитарное кольцо. Примесь эритроцитов в этой фракции разрушали 0.83%-ным раствором хлорида аммония. Клетки дважды отмывали изотоничным буферным раствором (раствор Дульбекко,  $pH=7.4$ ). В плазме унифицированными методиками, применяемыми в клинической лабораторной диагностике, определяли концентрацию глюкозы, общего белка, холестерина (ХЛ), триглицеридов (ТГ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ). Биохимические исследования крови проводили на аппарате HITACHI INTEGRA 800 следующими методами: концентрация глюкозы – реверсный энзиматический метод с гексокиназой, общий белок – биуретовый метод, холестерол, триглицеролы – энзиматический метод. Концентрацию ионов  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  определяли методом плазменной атомно-абсорбционной спектроскопии. На атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА ВИТА (Россия, Зеленоград) проводили определение жесткости мембран лейкоцитов и эритроцитов с использованием программного обеспечения «Nova 1.0.26 Build 1397» (НТ МДТ). Сканировали нативные клетки в условиях, предотвращающих их высыхание, при комнатной температуре.

### Результаты и обсуждение

Биохимический анализ плазмы крови здоровых мужчин двух возрастных групп выявил, что у мужчин зрелого возраста наблюдается достоверное повышение уровня холестерина и триглицеридов, а также снижение содержания активности АСТ (табл. 1). Выявлена тенденция повышения с возрастом уровня глюкозы и ионов натрия и снижение уровня общего белка, ионов хлора, кальция и калия, а также увеличения активности АЛТ. У женщин, как и у мужчин, с возрастом достоверно повышается уровень холестерина и триглицеридов, снижается активность АСТ (табл. 2). Показатель уровня холестерина у лиц обоего пола не превышал допустимую норму, но находился на верхней её границе. Выявленное повышение можно рассматривать как показатель риска возникновения заболеваний сердечно-сосудистой системы (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда), атеросклероза и заболеваний печени.

**Биохимические показатели крови здоровых мужчин ( $M \pm m$ )**

Показатель, ед. измерения	Мужчины	
	1 группа (n=14)	2 группа (n=12)
Глюкоза, ммоль $\times$ л $^{-1}$	4.30 $\pm$ 0.11	4.44 $\pm$ 0.14
Холестерин, ммоль $\times$ л $^{-1}$	4.64 $\pm$ 0.10	5.72 $\pm$ 0.09*
Триглицериды, ммоль $\times$ л $^{-1}$	1.86 $\pm$ 0.04	2.69 $\pm$ 0.04*
Общий белок, г $\times$ л $^{-1}$	76.62 $\pm$ 0.80	74.22 $\pm$ 0.72
АСТ, Ед/л	39.87 $\pm$ 2.01	31.22 $\pm$ 1.45*
АЛТ, Ед/л	27.92 $\pm$ 1.73	24.09 $\pm$ 2.15
$Na^+$ , ммоль $\times$ л $^{-1}$	139.23 $\pm$ 1.14	139.69 $\pm$ 1.04
$K^+$ ммоль $\times$ л $^{-1}$	4.41 $\pm$ 0.11	4.15 $\pm$ 0.12
$Cl^-$ ммоль $\times$ л $^{-1}$	105.08 $\pm$ 0.78	103.07 $\pm$ 0.73
$Mg^{2+}$ , ммоль $\times$ л $^{-1}$	0.90 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.03
$Ca^{2+}$ , ммоль $\times$ л $^{-1}$	2.50 $\pm$ 0.04	2.43 $\pm$ 0.04

Примечание: \* – достоверность различий по критерию Стьюдента между разными возрастными группами мужчин ( $p < 0.05$ ).

Снижение общего белка плазмы у зрелых женщин, по сравнению с молодыми, вероятно связано с возрастной перестройкой гормональной системы, и, как следствие, изменением общего метаболизма [5, 6, 7, 8]. Повышенное содержание (разница 6% и более) ионов калия у зрелых мужчин и женщин, по сравнению с молодыми, не выходило за пределы возрастной нормы и, вероятно, связано с возрастными изменениями системы ионного гомеостаза, которые не приводят к появлению патологий [7]. Активность АСТ у женщин младшей возрастной группы пре-

Таблица 2  
**Биохимические показатели крови  
здоровых женщин (M±m)**

Показатель, ед. измерения	Женщины	
	1 группа (n=12)	2 группа (n=12)
Глюкоза, ммоль×л <sup>-1</sup>	4.44±0.12	4.69±0.13
Холестерин, ммоль×л <sup>-1</sup>	4.54±0.09	5.88±0.09*
Триглицериды, ммоль×л <sup>-1</sup>	1.92±0.05	2.89±0.05*
Общий белок, г×л <sup>-1</sup>	76.20±0.82	72.80±0.78*
АСТ, Ед/л	32.83±1.83	22.20±1.70*#
АЛТ, Ед/л	31.60±1.53	22.60±2.10*
Na <sup>+</sup> , ммоль×л <sup>-1</sup>	140.83±1.14	141.00±1.08
K <sup>+</sup> , ммоль×л <sup>-1</sup>	4.43±0.10	4.17±0.13
Cl <sup>-</sup> , ммоль×л <sup>-1</sup>	107.01±0.71	102.80±0.65*
Mg <sup>2+</sup> , ммоль×л <sup>-1</sup>	0.86±0.04	0.89±0.03
Ca <sup>2+</sup> , ммоль×л <sup>-1</sup>	2.43±0.04	2.45±0.03

Примечание: \* – достоверность различий по критерию Стьюдента между разными возрастными группами женщин ( $p < 0.05$ ); # – достоверность различий по критерию Стьюдента между лицами разного пола в пределах одновозрастных групп ( $p < 0.05$ )

или *L*-аланином и  $\alpha$ -кетоглутаратом, в крови здоровых людей незначительная, но существенное снижение ее активности свидетельствует об изменении метаболических процессов в печени, так как аспартат и *L*-аланин необходимы для процесса глюконеогенеза [8]. Установленное снижение уровня кальция у женщин зрелого возраста говорит о потенциальном риске возникновения остеопороза и снижении функции щитовидной железы [6, 7]. При сравнении биохимических показателей крови взрослых (1 группа) и зрелых (2 группа) людей разного пола выявлено, что достоверные межполовые различия начинают проявляться только в зрелом возрасте. У зрелых женщин, по сравнению с мужчинами, выше концентрация глюкозы, холестерина и триглицеридов и ниже активность АСТ. Эти отличия отражают различную степень возрастных изменений общего метаболизма у лиц разного пола.

Таблица 3  
**Морфометрические и микрореологические показатели гемоцитов мужчин**

Показатель, ед. измерения	1 группа (n=14)	2 группа (n=12)
Площадь поверхности эритроцита, мкм <sup>2</sup>	130.77±1.56	138.11±1.43*
Площадь поверхности лимфоцита, мкм <sup>2</sup>	95.05±2.84	116.26±4.18*
Площадь поверхности нейтрофила, мкм <sup>2</sup>	144.89±3.18	150.44±6.17
Диаметр эритроцита, мкм	7.31±0.05	7.50±0.05*
Диаметр нейтрофила, мкм	12.64±0.08	13.26±0.11
Диаметр лимфоцита, мкм	8.16±0.07	7.73±0.09
Объем эритроцита, мкм <sup>3</sup>	89.72±0.99	92.31±0.84*
Объем нейтрофила, мкм <sup>3</sup>	103.17±5.89	104.95±6.08
Объем лимфоцита, мкм <sup>3</sup>	130.02±5.21	129.28±5.71
Средняя жесткость мембраны эритроцита, Pa	10.64±0.71	11.07±0.65
Средняя жесткость мембраны нейтрофила, Pa	9.10±1.03	9.48±1.45
Средняя жесткость мембраны лимфоцита, Pa	8.70±0.93	9.17±1.11

Примечание: \* – достоверность различий по критерию Стьюдента между разными возрастными группами мужчин ( $p < 0.05$ ).

вышла физиологическую норму (норма до 31 Ед/л), но не значительно. У женщин зрелого возраста (группа 2), выявлено достоверное снижение содержания общего белка, концентрации ионов хлора и снижение активности АЛТ. Наиболее выраженным возрастным изменением является существенное снижение (на 42% у мужчин и 32% у женщин) активности АСТ. В меньшей степени с возрастом уменьшалась активность АЛТ (на 14% у мужчин и на 28% у женщин). Эти результаты совпадают с возрастным снижением общего белка (у мужчин на 3.1% и у женщин на 4.5%). Известно, что активность АСТ и АЛТ-ферментов, катализирующих реакцию трансаминирования между аспартатом



Методами атомно-силовой микроскопии установлено, что с возрастом у мужчин происходит увеличение площади поверхности всех клеток крови: эритроцитов (на 6%), лимфоцитов (18%) и нейтрофилов (4%). Однако морфологические основы этих изменений разные. Рост площади поверхности эритроцитов и нейтрофилов происходит при увеличении диаметра клеток (соответственно на 5% и 4%), а лимфоцитов – на фоне снижения (на 5%). Средняя жесткость мембраны эритроцитов с возрастом не изменяется, а у лимфоцитов (5%) и нейтрофилов (4%) возрастает.

Таблица 4

**Морфометрические и микрореологические показатели гемоцитов женщин**

Показатель, ед. измерения	1 группа (n=12)	2 группа (n=12)
Площадь поверхности эритроцитов, мкм <sup>2</sup>	140.30±1.69#	146.18±1.59*#
Площадь поверхности лимфоцитов, мкм <sup>2</sup>	107.05±2.53#	131.26±3.68*#
Площадь поверхности нейтрофилов, мкм <sup>2</sup>	155.89±3.10#	159.44±6.07
Диаметр эритроцита, мкм	7.39±0.06	7.62±0.06*
Диаметр лимфоцитов, мкм	8.24±0.06	8.70±0.08#
Диаметр нейтрофилов, мкм	12.82±0.08	14.01±0.12*#
Объем эритроцита, мкм <sup>3</sup>	92.99±0.97#	99.98±0.99*#
Объем лимфоцитов, мкм <sup>3</sup>	141.07±5.01	137.28±4.99
Объем нейтрофилов, мкм <sup>3</sup>	105.88±5.99	109.95±5.22
Средняя жесткость мембраны эритроцита, Pa	11.32±0.77	12.15±0.73
Средняя жесткость мембраны лимфоцита, Pa	8.82±1.02	9.04±0.96
Средняя жесткость мембраны нейтрофила, Pa	9.16±1.12	9.49±1.32

Примечание: \* – достоверность различий по критерию Стьюдента между разными возрастными группами женщин ( $p < 0.05$ ); # – достоверность различий по критерию Стьюдента между лицами разного пола в пределах одновозрастных групп ( $p < 0.05$ ).

Установлено, что с возрастом у женщин наблюдается увеличение площади поверхности эритроцитов (на 4%), их диаметра (на 3%), объема (на 7%), что свидетельствует об изменении их формы, и средней жесткости мембраны. Выявлено, что с возрастом у женщин возрастает площадь поверхности лимфоцитов (на 19%) и диаметр (на 5%), объем снижается (на 3%), а средняя жесткость мембран увеличивается (на 3%). Диаметр, площадь поверхности, объем и средняя жесткость мембраны нейтрофилов у женщин также увеличивается (на 9, 2, 4, 4% соответственно). Выявленное повышение жесткости клеточных структур создает условия для затруднения кровотока в микрососудах.

Корреляционный анализ, проведенный для изучения взаимосвязей между биохимическими показателями крови и жесткостью мембран гемоцитов, выявил, что в обеих возрастных группах женщин регистрируется положительная корреляция ( $r=0.87$  у женщин 1 группы;  $r=0.90$  у женщин 2 группы,  $p \leq 0.05$ ) между средней жесткостью мембраны эритроцита и содержанием ионов кальция в плазме. Содержание ионов кальция в плазме крови женщин обеих групп не отличалось достоверно от показателей мужчин и не выходило за пределы физиологической нормы. Выявленное увеличение жесткости может быть следствием усиления связывания кальция с белками плазмалеммы, что, по мнению ряда авторов, приводит к снижению текучести мембраны эритроцитов [9]. У лейкоцитов такой зависимости не выявлено.

Таким образом, повышение с возрастом у женщин морфометрических показателей эритроцитов сопровождается увеличением жесткости их мембраны, в то время как у мужчин такой взаимосвязи не установлено. Изменения площади и объема эритроцитов свидетельствуют об изменении их формы. Известно, что изменение формы эритроцитов может быть следствием увеличения содержания ионов кальция в крови, оказывающего влияние на транспорт ионов калия и натрия и, тем самым, влияющего на форму эритроцитов [10, 11]. Полученные данные позволяют

говорить, что с возрастом у женщин изменение формы и жесткости мембран эритроцитов происходит более выражено, чем у мужчин. Вероятно, эти различия являются следствием более существенных возрастных сдвигов ионного гомеостаза у женщин по сравнению с мужчинами.

Интересным фактом является то, что значительное увеличение площади поверхности лимфоцитов (на 18.2% у мужчин и на 18.5% у женщин) у женщин приводит к увеличению их диаметра (на 5.3%), а у мужчин, напротив, к его снижению (на 5%). При этом с возрастом степень увеличения средней жесткости мембраны лимфоцитов выше у мужчин. Одной из возможных причин этого может являться различный характер изменений липидного состава и, как следствие, жесткости цитоплазматической мембраны. Известно, что в лимфоцитах человека присутствует фермент НАДФН-оксидаза, способствующий образованию свободных форм кислорода [12]. Существуют механизмы, способствующие быстрому накоплению активных форм кислорода при активации лимфоцитов [10]. С одной стороны, свободно-радикальное окисление является важным звеном окислительного метаболизма клеток, лимитирующим модификацию и проницаемость биомембран, играющим роль специфического звена, обеспечивающего фагоцитарную активность макрофагов и функционирование иммунокомпетентных клеток. С другой стороны, продукты частичного восстановления кислорода — перекись водорода, и свободные радикалы вызывают перекисное окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот, определяя бактерио- и вирусотоксический эффект лимфоцитов. Однако постоянная генерация активных форм кислорода в лимфоцитах может способствовать также и окислительным модификациям собственных клеточных компонентов [13, 14]. Показано, что увеличение окислительного стресса при различных вирусных инфекциях [10] приводит к повышению микровязкости поверхностных мембран лимфоцитов крови, что свидетельствует о приобретении мембранами лимфоцитов более жестких и менее пластичных свойств. Увеличение жесткости мембраны лимфоцитов указывает на угасание метаболических процессов в мембране клетки, тем самым затрудняя активацию лимфоцитов и процессов распознавания лимфоцитами своих или чужих клеточных рецепторов, что в конечном итоге приводит к формированию неадекватного иммунного ответа. Можно предположить, что различия возрастных изменения морфометрических характеристик лимфоцитов у мужчин по сравнению с женщинами связаны с более высоким уровнем окислительного стресса и является следствием изменения липидного компонента мембран.

### Заключение

Изменения биохимических показателей с возрастом проявляются в виде повышения содержания в крови холестерина, триглицеридов и снижения содержания фермента АСТ; у женщин также выявлено достоверное снижение содержания общего белка, АЛТ и ионов хлора. В качестве тенденции у зрелых лиц обоего пола наблюдается повышение содержания глюкозы в крови. С возрастом повышается жесткость мембран эритроцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, причем данные изменения более выражены у женщин.

Корреляционный анализ между изученными показателями у мужчин в обеих возрастных группах не выявил достоверных взаимосвязей, что свидетельствует об отсутствии напряженности функционирования системы крови, как у молодых, так и зрелых здоровых мужчин. У женщин выявлено наличие корреляции между средней жесткостью мембраны эритроцита и содержанием ионов  $Ca^{2+}$  в плазме обеих возрастных групп, что позволяет говорить о возникновении напряженности функционирования системы крови у женщин зрелого возраста. У мужчин изменения микрореологических показателей лимфоцитов связаны с изменением жесткости мембран вследствие возможного более высокого уровня окислительного стресса в лимфоцитах по сравнению с женщинами.



### Список литературы

1. Федорова М.З. Реактивность лейкоцитов крови при различных функциональных нарушениях. – М.; Ярославль, 2001. – 68 с.
2. Федорова М.З. Функциональная активность нейтрофилов при перегревании, охлаждении и дегидратации организма // Тез. докл. XVIII съезда физиол. об-ва им. И.П. Павлова. – Казань, 2001. – С. 442.
3. Агаджанян Н.А. Реактивность лейкоцитов в различных условиях среды // Экология человека. – 2001. – № 4. – С. 66–68.
4. Федорова М.З., Ключкова Г.Н. Анкудинов И.В. Микрореологические свойства лейкоцитов при сосудистых дисфункциях разного генеза // Материалы III Всерос. науч. конф. «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии». – М., 2007. – С. 247–248.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2000. – 495 с.
6. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф. Биохимические показатели в клинике внутренних болезней. – М.: МЕДпресс-информ, 2002. – 208 с.
7. Кутина А.В., Кузнецова А.А., Наточин Ю.В. Катионы в сыворотке крови человека // Успехи физиол. наук. – 2005. – Т. 36, №3. – С. 3–32.
8. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987. – 364 с.
9. Dunn M.J. Red blood cell calcium and magnesium: effects upon sodium and potassium transport and cellular morphology // Biochim Biophys Acta. – 1974. – Vol. 352. – P. 97–116.
10. Jackson S.H., Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation // Nat. Immunol. – 2004. – Vol. 5, № 8. – P. 818–827.
11. Lorand L., Weissmann L.B., Epel D.L. Role of the intrinsic transglutaminase in the  $Ca^{2+}$ -mediated crosslinking of erythrocyte proteins // Proc. Nat. Academic Science USA – 1976. – № 73. – P. 4479–4481.
12. Romero P.J., Whittam R. The control by internal calcium of membrane permeability to sodium and potassium // J. Physiology. – 1971. – № 214. – P. 481–507.
13. Vignais P.V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism // Cell. Mol. Life. Sci. – 2002. – № 59. – P. 1428–1450.
14. Walee Chamulitrata. Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of intestinal lymphocytes produces highly reactive free radicals from sulfite // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 27, Iss. 3-4, – P. 411–421.

## AGE-DEPENDENT CHANGES IN BIOCHEMICAL INDICES OF BLOOD AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE STIFFNESS OF MEMBRANES OF HEMOCYTES IN THE BLOOD OF HEALTHY 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-dependent changes in blood indices are manifested in the increase of cholesterol and triglyceride levels and the decrease of AST. The age trend of growth of glucose in blood was detected, as well as the stiffness of the membranes of blood cells more expressed in the blood of women. Correlation analysis showed the relationship of the middle stiffness of the erythrocyte membrane with the content of calcium ions in the plasma in the blood of women.

Key words: biochemical markers, red blood cells, white blood cells, the rigidity of the membrane, atomic force microscopy.