

УДК: 591.3

Морфофизиологические показатели эритроцитов при оксидативном стрессе на разных этапах онтогенеза

Нестеров Ю. В., Теплый Д. Д.

Получены результаты, свидетельствующие о возрастзависимых отклонениях от физиологического уровня преобладающего числа исследованных морфофизиологических параметров функционального состояния эритроцитов периферической крови, указывая на отсутствие стабильности этих показателей в позднем онтогенезе, на значительные нарушения газотранспортной функции эритроцитов, особенно выраженных при ингаляции животных сероводородсодержащим газом.

Ключевые слова: эритроциты, онтогенез, оксидативный стресс, сероводородсодержащий газ.

Morphological and physiological parameters of erythrocytes in oxidative stress at different stages of ontogenesis

Nesterov Yu. V., Teply D. D.

The results indicate the age-related deviations from physiological level of the prevailing number of the investigated morphological and physiological parameters of peripheral erythrocytes functional status, indicating the lack of these indicators stability in the late ontogenesis, significant defects of the gas transmission function of red blood cells, especially presented when inhale rats with hydrogen sulfide gas.

Keywords: erythrocytes, ontogeny, oxidative stress, hydrogen sulfide gas.

Введение

В последние десятилетия появились исследования, указывающие на особенности морфофизиологических показателей эритроцитов периферической крови на ранних критических этапах постнатального онтогенеза, указывающие на возможность суждения о стадиях онтогенеза по показателям структуры и функции эритроцитов [5, 6]. Между тем, состояние эритроцитов —

чувствительных индикаторов изменений нормального хода физиологических, биохимических и биофизических процессов в онтогенезе, особенно позднем, изучены недостаточно. Исследование возрастных особенностей структурно-функциональной организации эритроцитов при хроническом действии экстремальных, особенно токсических, факторов, может иметь, помимо теоретического, диагностическое и прогностическое значение для оценки биологической зрелости и способности организма к адаптации.

Цель исследования

Целью настоящей работы было экспериментальное изучение возрастных особенностей морфофизиологической организации эритроцитов периферической крови белых крыс в норме и при окислительном стрессе, вызванном хроническим действием сероводородсодержащих газовых поллютантов (СВСГ).

Материал и методы

Опыты поставлены на беспородных белых крысах-самцах: молодых (возраст — 180 дней) и старых (820 дней). Животные были разделены по две группы соответственно для каждой возрастной группы: интактные крысы (контроль), СВСГ — сероводородсодержащий газ ингаляционно в дозе 150 мг/м³ (по H₂S), экспозиция 240 мин в течение 6 недель по 5 дней в неделю. Ингаляционные затравки животных осуществлялись в лаборатории кафедры патофизиологии Астраханской государственной медицинской академии в специальных камерах производства Московского института профзаболеваний им. Эрисмана объемом 200 л [9]. Микроклимат в камере в течение экспериментов поддерживался при температуре 27°C и влажности в начале эксперимента 64 %, в конце — 72—74 %. С целью подтверждения развития стресс-реакции определяли количество эозинофильных гранулоцитов в периферической крови с использованием эозинопенической пробы Торна [8]. Изучались следующие гематологические показатели: величина гематокрита (НСТ) — методом центрифугирования в микрокапиллярах, обработанных антикоагулянтом, на специальной микроцентрифуге; определение количества эритроцитов (RBC) периферической крови — с применением камеры Горяева; определение содержания гемоглобина (HGB) с применением гемоглобинцианидного спектрофотометрического метода (Drabkin); вычисление цветного показателя (ЦП) традиционным клиническим методом. Определяли следующие индексы эритроцитов с помощью методик, применяемых в лабораторной практике [2]: средний объем эритроцитов (MCV в фл); среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH в пг); среднюю концентрацию гемоглобина

в эритроците (МСНС в г/дл); показатель анизоцитоза эритроцитов (RDW в %). Определение морфологических и геометрических показателей эритроцитов производили с помощью аппаратно-программного комплекса «МЕКОС-Ц» в программе «Эритроцитометрия» в монослое мазков периферической крови, окрашенных по Гимза-Романовскому, в составе комплекса — тринокулярный микроскоп «NIKON», цифровая фотокамера «Delta-Pix-300», персональный компьютер.

При анализе геометрических показателей оценивали: средний диаметр эритроцита по формуле $S = N/K-1$, где N — сумма всех пикселей, составляющих объект, $K-1$ — коэффициент линейного разрешения (число пикселей на 1 мкм); фактор формы эритроцитов как отношение квадрата диаметра к площади поперечного сечения эритроцита: $F = L^2/S$ — характеристика изрезанности контура клетки; поляризацию эритроцита (характеристика степени эллиптичности) по формуле: $P*2x(a-b)(a+b)$, где a — наибольшая, b — наименьшая величина диаметра эритроцита, распластанного по стенке; формулу эритроцита (распределение на основные типы: нормальные, обратимо измененные, необратимо измененные, патологические (в у.е.). Для оценки свободнорадикального окисления и, в связи с этим, степени изменения проницаемости мембраны эритроцитов определяли уровень перекисного гемолиза эритроцитов (ПГЭ), используя методику А.А.Покровского и А.А. Абрарова (1964) в модификации А.Е. Лазько и соавт. (1993) [4].

Результаты и обсуждение

По эозинопеническому критерию длительное воздействие сероводородсодержащего газа оказалось стресс-реализующим, что подтверждалось результатами пробы Торна. Так, у молодых животных после воздействия СВСГ число эозинофилов в периферической крови уменьшалось с $395, 0 \pm 14, 6$ (в контроле) до $262, 4 \pm 10, 1$ в 1мм^3 ($p < 0, 05$); у старых крыс соответственно с $495, 1 \pm 21, 2$ до $415, 3 \pm 14, 3$ в 1мм^3 ($p < 0, 05$). При сравнении возрастной динамики количества эритроцитов периферической крови крыс найдено их увеличение у старых животных на 37 % в сравнении с молодыми ($p < 0, 001$, таблица 1). Эритроцитоз, характерный для позднего онтогенеза, может быть следствием компенсаторного усиления эритропоэза и выходом в периферическое русло крови клеток со значительно меньшим индивидуальным объемом ($p < 0, 001$), что и наблюдалось в наших опытах, а также повышенным гемолизом эритроцитов при старении ($p < 0, 01$ в сравнении с молодыми), индуцированным усилением свободнорадикальных процессов, характерных для этапа инволюции. Значительное уменьшение объема эритроцитов при старении компенсируется ростом их концентрации в крови, что, в какой-то

мере, способствует поддержанию общей дыхательной поверхности циркулирующей крови. Как известно, удаление неполноценных клеток из крови — генетически контролируемая программа. В связи с этим при старении, возможно, имеет место не только выраженное старение эритроцитов, но и недостаточно эффективное удаление дефектных клеток из периферического русла крови.

Таблица 1 — Гематологические показатели у молодых и старых крыс при действии сероводородсодержащего газа

Показатели	Молодые		Старые	
	Контроль	СВСГ	Контроль	СВСГ
НСТ, %	37, 81 ± 0, 395	39, 80 ± 1, 933*	43, 13 ± 0, 641▲	37, 25 ± 0, 707*
RBC, 10 ¹² /л	6, 42 ± 0, 065	7, 05 ± 0, 223*	8, 8 ± 0, 014▲	4, 98 ± 0, 132*
HGB, г/л	14, 34 ± 0, 533	15, 42 ± 0, 094*	14, 78 ± 0, 164	10, 95 ± 0, 314*
ЦП	1, 19	1, 12	0, 89	1, 17
RDW, %	12, 65	6, 20	14, 25	9, 34
MCV, фл	58, 8 ± 1, 50	56, 38 ± 1, 061	49, 02 ± 2, 472▲	75, 22 ± 2, 507*
MCHC, г/дл	38, 08 ± 1, 267	39, 41 ± 1, 635	34, 34 ± 0, 669▲	29, 45 ± 0, 945*
MCH, пг	22, 36 ± 0, 808	22, 11 ± 1, 272	16, 86 ± 0, 264▲	22, 03 ± 0, 583*
ПГЭ, %	3, 97 ± 0, 130	4, 96 ± 0, 061*	4, 6 ± 0, 155▲	7, 23 ± 0, 548*

Примечание: * — $p < 0, 05$ — $0, 001$ в сравнении с контролем; ▲ — $p < 0, 05$ — $0, 001$ в сравнении с другой возрастной группой

Изучение степени анизоцитоза показало несколько большую гетерогенность размеров эритроцитов у старых крыс в сравнении с молодыми и значительное (втрое) увеличение аномальных форм эритроцитов у старых животных. Старение организма не сказалось на общем уровне гемоглобина крови, однако у старых крыс среднее содержание гемоглобина (MCH) и средняя концентрация гемоглобина в клетке (MCHC) значительно уменьшились в сравнении с молодыми животными ($p < 0, 001$), что свидетельствует о развитии гипохромии, вызванной нарушением синтеза гемоглобина [2]. Это подтвердилось и данными о некотором снижении у старых крыс величины гематокрита (на 15—20 % в сравнении с молодыми животными).

Результаты экспериментов показали наличие слабой корреляции между количеством эритроцитов (RBC) и их индивидуальным объемом (MCV): у молодых крыс $r = +0, 21$, у старых — $r = -0, 10$, что соответствует корреляции между RBC и MCV у взрослого человека.

Изучение возрастной динамики адаптивных возможностей выявило эзифилию у старых крыс ($p < 0, 05$, на 25 % выше в сравнении с молодыми животными), что свидетельствует о возрастном снижении стресс-

реактивности, связанном с возможным возраст зависимым ослаблением секреторной активности надпочечников [1]. Известно, что основной мишенью активных кислородных метаболитов, уровень которых возрастает при старении, является мембрана эритроцитов. В наших экспериментах уровень перекисного гемолиза эритроцитов (ПГЭ) у старых крыс оказался значительно большим, чем у молодых ($p < 0,01$), что указывало на возрастное истощение антиоксидантной системы эритроцитов и их микроокружения. При характеристике онтогенетических особенностей морфометрических показателей эритроцитов были найдены существенные возрастные различия количества аномальных форм эритроцитов: у молодых крыс — 2,44 %, у старых — 8,40 %. Такая ситуация характерна для условий напряжения эритропоэза, формирующегося при усилении гемолиза эритроцитов [7] и усилении свободнорадикальных процессов в позднем онтогенезе. По мнению других авторов в механизме увеличения аномальных форм эритроцитов участвует снижение внутриклеточной АТФ (АТФ-зависимые системы). Характерно, что заметно больший процент аномальных клеток у старых крыс представляли сфероциты, появление которых в крови связано с изменением содержания спектрина, приводящего к нарушению устойчивости эритроцитарных мембран [3].

В ходе морфометрических исследований у молодых животных не выявлено существенных отклонений от нормы ни одного из геометрических показателей. При этом, у старых крыс существенно увеличилась площадь эритроцитов ($p < 0,001$), средний диаметр ($p < 0,001$), отмечены некоторые изменения уровня поляризации. Увеличение среднего диаметра эритроцитов определило обратную корреляцию между этим показателем и средним объемом эритроцитов при старении ($r = -0,71$). Старение способствовало некоторому уменьшению эластичности эритроцитов (у молодых крыс — $0,091 \pm 0,015$ у.е.; у старых — $0,072 \pm 0,017$ у.е.).

Далее, после действия СВСГ, полученные результаты отличались рядом возрастных особенностей как в отношении концентрации эритроцитов (RBC), так и гематокрита (HCT) и объема клеток (MCV): у молодых животных СВСГ привел к эритроцитозу ($p < 0,001$) и увеличению HCT, некоторому уменьшению MCV, увеличению общего содержания гемоглобина (HGB) и изменению других показателей. В популяции эритроцитов старых животных общее количество эритроцитов, напротив, существенно уменьшилось ($p < 0,001$), как и среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH) ($p < 0,001$), а индивидуальный объем эритроцитов (MCV) резко возрос (на 53 % в сравнении с контролем — $p < 0,001$). Эти данные свидетельствуют о значительном нарушении газотранспортной функции эритроцитов и гемоглобинсинтезирующих процессов эритроидных элементов костного мозга.

Результаты анализа корреляционных отношений между MCV и RBC у молодых крыс при действии СВСГ демонстрируют формирование слабой положительной корреляции ($r = 0,33$). В тех же условиях у старых крыс обозначилась высокая отрицательная взаимосвязь ($r = -0,82$). Изучение степени анизоцитоза (RDW) у крыс, подвергшихся действию СВСГ, показало на уменьшение этого показателя, особенно у молодых крыс — на 51 %, у старых — на 45 %. Под влиянием СВСГ у молодых крыс общий уровень гемоглобина увеличился ($p < 0,01$). Показатели MCH и MCHC изменились незначительно. В тех же условиях у старых крыс СВСГ резко уменьшил содержание HGB ($p < 0,001$) и способствовал увеличению MCH и MCHC ($p < 0,001$ в обоих случаях).

Оценка морфологии эритроцитов играет важную роль в анализе изменений функционального состояния эритроцитов и распознавании патогенетического варианта, в том числе в анализе гипоксического состояния, вызванного воздействием СВСГ. Такое воздействие в наших опытах вызвало уменьшение уровня дискоцитов вне зависимости от возраста (у молодых — на 22 %, у старых крыс — на 18 % в сравнении с контролем). В 4, 7 раза возросло количество обратимо и необратимо измененных форм эритроцитов у молодых крыс и в 4 раза — у старых. При этом в 12 раз (в сравнении с контролем) возросло количество эхиноцитов у молодых и появились эхиноциты в крови старых крыс.

Следует особо подчеркнуть большую, чем у старых животных реактивность крови молодых крыс к действию СВСГ, что, вероятно, связано с менее зрелыми механизмами адаптации к действию неблагоприятных факторов и менее выраженными компенсаторными возможностями эритропоэза на ранних этапах постнатального онтогенеза. Это нашло подтверждение в развитии более выраженной у молодых крыс эозинопении под влиянием СВСГ (у молодых $262,4 \pm 10,11$, в контроле $395,0 \pm 15,64$, $p < 0,01$; у старых $415 \pm 21,06$, в контроле $495,1 \pm 30,62$, $p < 0,05$).

Анализ изменений геометрических показателей функционального состояния эритроцитов и их изменений под влиянием серосодержащего газа показал значительное увеличение площади эритроцитов ($p < 0,01$) без существенных изменений других геометрических показателей у молодых животных. В тех же условиях у старых крыс под действием СВСГ значительно уменьшились площадь эритроцитов ($p < 0,001$), средний диаметр ($p < 0,01$) и поляризация клеток ($p < 0,01$). При этом фактор формы значительно превзошел тот же показатель у молодых крыс ($p < 0,01$).

Выводы

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о возрастзависимых отклонениях от физиологического уровня преобладающего числа исследованных морфофизиологических параметров функционального состояния эритроцитов периферической крови, указывая на отсутствие стабильности этих показателей в позднем онтогенезе, на значительные нарушения газотранспортной функции эритроцитов и гемоглобинсинтезирующих процессов, особенно четко выраженных при ингаляции животных сероводородсодержащим газом. При старении обнаружены изменения морфофизиологических показателей эритроцитов, характерные для микроцитарной анемии: увеличение гематокрита, числа эритроцитов, уменьшение индивидуального объема клеток, среднего содержания и средней концентрации эритроцитов при сохранении общего уровня гемоглобина, увеличение количества аномальных форм и геометрических показателей эритроцитов, рост анизоцитоза.

Литература

1. Агаджанян, Н. А. Физиология человека / Н. А. Агаджанян, Л. З. Тель, В. И. Циркин, С. А. Чеснокова // Санкт-Петербург. Изд-во «СОГИС», 1998. С. 500—503.
2. Бондарь, Т. П. Лабораторная гемоцитология: методы исследования и клинико-диагностическое значение изучения эритроцитов / Т. П. Бондарь, О. И. Запорожцева, Т. В. Карчинская, Е. В. Верщак // Ставрополь. Изд-во СГУ, 2007. — 62 с.
3. Зинчук, В. В. Дифференцируемость эритроцитов: физиологические аспекты / В. В. Зинчук // Успехи физиологических наук. — 2001. — Т.32, №3. — С. 66—78.
4. Лазько, А.Е. Состояние газотранспортирующего компартмента мимтемы микроциркуляции при воздействии серосодержащего газа / А.Е. Лазько, А.А. Резаев // Материалы юбилейной научной конференции Астраханского государственного медицинского института // Астрахань. Изд-во АГМИ, 1993. — С. 179—182.
5. Леонова, В. Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека / В. Г. Леонова // Новосибирск. Изд-во «Наука», Сибирское отделение, 1987. — 242 с.
6. Новожилов, А. В. Динамика гематолитических показателей крови белых крыс в постнатальном онтогенезе / А. В. Новожилов, Л. Н. Катюхин // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2008. — Т.44, №6. — С. 613—621.

7. Новицкий, В. В. Патоморфоз эритроцита у больных с приобретенными пороками сердца и в условиях их хирургической коррекции / В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева, Ю. Ю. Вечерский, О. И. Липицкая, Е. А. Степанова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2004. — Т. 137, №3. — С.336—340.

8. Ронин, В.С. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований // В.С. Ронин, Г.М. Старобинец // Москва. Изд-во «Медицина», 1989. — 320 с.

9. Тризно, Н.Н. К вопросу о моделировании эколого-патологического состояния — токсического отека легких / Н.Н. Тризно // Медико-биологические аспекты адаптации // Астрахань. Изд-во Астраханской государственной медицинской академии, 1996. — С.121—135.

Literature

1. Agadzhanjan, N. A. Fiziologija cheloveka / N. A. Agadzhanjan, L. Z. Tel', V. I. Cirkin, S. A. Chesnokova // Sankt-Peterburg. Izd-vo «SOGIS», 1998. S. 500—503.

2. Bondar', T. P. Laboratornaja gemocitologija: metody issledovanija i kliniko-diagnosticheskoe znachenie izuchenija yeritrocitov / T. P. Bondar', O. I. Zaporozhceva, T.V. Karchinskaja, E. V. Vershak // Stavropol'. Izd-vo SGU, 2007. — 62 s.

3. Zinchuk, V. V. Differenciruemost' yeritrocitov: fiziologicheskie aspekty / V. V. Zinchuk // Uspehi fiziologicheskikh nauk. — 2001.— Т.32, №3. — S. 66—78.

4. Lazko, A.E. Sostoyanie gazotransportiruyushego kompartmenta mimtemyi mikrotsirkulyatsii pri vozdeystvii serosoderzhashego gaza / A.E. Lazko, A.A. Rezaev // Materialyi yubileynoy nauchnoy konferentsii Astrahanskogo gosudarstvennogo meditsinskogo instituta // Astrahan. Izd-vo AGMI, 1993. — S. 179—182.

5. Leonova, V. G. Analiz yeritrocitarnyh populjatsii v ontogeneze cheloveka / V.G. Leonova // Novosibirsk. Izd-vo « Nauka», Sibirskoe otdelenie, 1987. — 242 s.

6. Novozhilov, A. V. Dinamika gematolicheskikh pokazatelei krovi belyh krys v postnatal'nom ontogeneze / A. V. Novozhilov, L. N. Katyuhin // Zhurnal yevolyucionnoi biohimii i fiziologii. — 2008. — Т.44, №6. — S. 613—621.

7. Novickii, V. V. Patomorfoz yeritrocita u bol'nyh s priobretennymi porokami serdca i v uslovijah ih hirurgicheskoi korrektsii / V. V. Novickii, N. V. Rjazanceva, YU.YU. Vecherskii, O. I. Lipickaja, E. A. Stepanova // Byulleten' yeksperimental'noi biologii i mediciny. — 2004. — Т. 137, №3. — S.336—340.

8. Ronin, V.S. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po metodam klinicheskikh laboratornykh issledovaniy // V.S. Ronin, G.M. Starobinets // Moskva. Izd-vo «Meditsina», 1989. — 320 s.

9. Trizno, N.N. K voprosu o modelirovanii ekologo-patologicheskogo sostoyaniya — toksicheskogo oteka legkih / N.N. Trizno // Mediko-biologicheskie aspekty adaptatsii // Astrahan. Izd-vo Astrahanskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii, 1996. — S.121—135.