

coupling with membrane receptors and second messenger systems. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 2003. Vol. 89. N 12. P. 1478-1490.

10. Karen B. Jourdan, Nicola A. Mason, Lu Long, Peter G. Philips, Martin R. Wilkins, Nicholas W. Morrell. //Characterization of adenylyl cyclase isoforms in rat peripheral pulmonary arteries. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology Published 2001 Vol. 280, N. 6, L1359-L1369.

11. Jeffrey A. Whitsett, Charlotte Darovec-Beckerman and Ward R. Rice //Ontogeny of Ad-enylyl Cyclase Activity in the Rat Lung: Guanine Nucleotides and Cytosolic Factors. *Pediatr. Res.* 1983. N17, P. 553-561.

12. Philip W. Shaul, Kathryn H. Muntz, Donald DeBeltz and L. Maximilian Buja //Effects of Prolonged Hypoxia on Adenylyl Cyclase Activity and β -Adrenergic Receptors in Pulmonary and Systemic Arteries of the Rat. *J. Circulation Research* 1990. Vol. 66, N 6. P. 1526-1534.

13. Chaudhary K. C., Nijjar M. S. //Endocrine Control of Cytosolic Factors Stimulating Adenylyl Cyclase in Rat Lung. *Horm. Metab. Res.* 1988; Vol. 20, N10. P 624-629.

14. Schmid Andreas, Meili Dimirela, and Salathe Matthias // Soluble Adenylyl Cyclase in Health and Disease, *Biochim Biophys Acta.* 2014. N. 1842. P. 2584-2592.

15. Schmitz B.1., Nedele J., Guske K., Maase M., Lenders M., Schelleckes M., Kusche-Vihrog K., Brand S.M., Brand E.//Soluble adenylyl cyclase in vascular endothelium: gene expression control of epithelial sodium channel- α , Na⁺/K⁺-ATPase- α/β , and mineralocorticoid receptor. *Hypertension.* 2014. Vol.63, N. 4. P. 753-761.

16. Krupinski J., Coussen F., Bakalayr H.A., Tang N.-l., Feinstein P.G., Orth K., Slaughter C., Reed R.R., Gilman A.G.//Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transpottez-like structure. *Science.* 1989. Vol. 244. P. 1558-1564.

17. Jason Michael Conley//Novel Modulation of Adenylyl Cyclase Type 2. 2013, 276 p.

Статья поступила в редакцию 10.06.2017

Координаты для связи

Целуйко Сергей Семёнович, д. м. н., профессор, проректор по НР ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России, заведующий кафедрой гистологии и биологии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. Красавина Надежда Павловна, д. м. н., профессор кафедры гистологии и биологии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Почтовый адрес ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России: 675000 Благовещенск Амурской области, ул. Горького, 95.

E-mail: agma.agma@ya.ru, agma@nm.ru

УДК 14.03.08: 616.018.

С.В. Зиновьев, С.С. Целуйко

ФГБОУ ВО Амурская ГМА
Минздрава России
г. Благовещенск.

ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОМ ВЫВЕШИВАНИИ КРЫС

Адаптация – базовый процесс жизнедеятельности биосистем, который касается биологии живого и клиники заболеваний человека. Большой актуальностью для современной медицины обладает направление, которое изучает адаптацию человеческого организма к воздействию невесомости. Оно привлекает внимание исследователей к роли силы гравитации в формировании организма в ходе онтогенеза и филогенеза. Адаптация морфобиохимических процессов к воздействию окружающей среды формируется при участии десенситизации адренорецепторов клеточных мембран [9]. Ввиду этого повышается ценность классического способа А.И. Мардарь и Д.П. Кладенко [1, 7] с помощью которого выявляется хромаффинная реакция эритроцитов периферической крови. Этот унифицированный метод осуществляется с помощью окрашивания мазков крови бихроматом калия, а потом – нитратом серебра. В свою очередь, по другим данным, при окраске нитратом серебра в эритроцитах выявляются катионы кальция [5]. Во время комбинированной окраски ализарином и бихроматом калия эритроцитов крыс нами, с 1988 г., доказана специфичность выявления катехоламинов в эритроцитах [2, 3].

Катионы кальция, участвующие в регуляции функции адренорецепторов, недостаточно изучены в условиях воздействия гипогравитации на организм. Актуальность этого исследования обусловлена тем, что в условиях гипогравитации в организме существенно изменяется метаболизм кальция [11].

Цель исследования заключается в оценке участия катехоламинов и катионов кальция в окислительно-восстановительных реакциях в эритроцитах крыс, подвергнутых воздействию гипогравитации.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись аутбредные крысы самцы весом 240 грамм в возрасте 3 месяцев. Исследование проведено на двух

Таблица 1.

Группа животных	1	2	3	4	5	6
	группа	группа	группа	группа	группа	группа
	клеток	клеток	клеток	клеток	клеток	клеток
	%	%	%	%	%	%
Контроль	30±1,9	30±3	30±1,8	4±1,0	3±0,2	3±0,2
Гипогравитация	40±1,5	30±1,1	20±2,05	5±0,3	3±0,3	2±0,25
	P <0,01	P >0,05	P <0,01	P >0,05	P >0,05	P >0,05

группах животных. Первая группа – контроль (10 животных). Вторая группа (10 животных) подвергалась экспериментальному воздействию гипогравитации по классическому методу Ильина-Новикова [4, 10]. Животных подвергали экспериментальному воздействию на протяжении 10 дней. Для цитохимического исследования депонированных в эритроцитах катехоламинов использовали методику А.И. Мардарь, Д.П. Кладиенко [6, 7, 8]. Свежие мазки крови на предметных стеклах в течение 2 часов фиксировали в 2% водном растворе калия бихромата при температуре 37°C. Затем мазки промывали в нескольких порциях дистиллированной воды и 5 минут окрашивали 5% водным раствором серебра нитрата. Избыток красителя смывали дистиллированной водой, затем эритроциты окрашивали 1% спиртовым раствором эозина и промывали дистиллированной водой. С целью одновременного выявления катехоламинов и катионов кальция в клетках крови окрашивали мазки периферической крови крыс ализари-

ном красным С и бихроматом калия оригинальным методом [3]. Статистическую оценку полученных данных оценивали по Стьюденту.

Результаты исследования

При исследовании мазков крови с помощью способа А.И. Мардарь, Д.П. Кладиенко по количеству и качеству включений катехоламинов в эритроцитах последние были разделены на 6 групп: 1 – отсутствие включений; 2 – 1–3 мелких включения; 3 – 4–6 средних включений; 4 – 7–10 средних включений; 5 – более 10 средних включений и скопления крупных включений; 6 – множественные включения, дающие диффузную окраску (темные клетки). У крыс в случае экспериментальной гипогравитации выявлена тенденция, указывающая на снижение значений цитохимических маркеров катехоламинов, которые содержатся в эритроцитах (табл. 1). В мазках преобладают 1, 2, 3 группы клеток, содержание в 4–6 группах клеток – 10%.

Способ окраски эритроцитов ализарином красным С с целью выявления катионов каль-

РЕЗЮМЕ

Оценивалось участие катехоламинов и катионов кальция в окислительно-восстановительных реакциях в эритроцитах крыс, подвергнутых воздействию гипогравитации на протяжении 10 дней. Проведено комплексное цитохимическое исследование депонирования катехоламинов в эритроцитах. Установлено снижение содержания катехоламинов в эритроцитах крыс во время моделирования эффектов невесомости. Разработаны новые способы цитохимического выявления катехоламинов в эритроцитах крыс.

Ключевые слова: гипогравитация, эритроциты, катехоламины. DOI 10.22448/AMJ.2017.2.54-57

CYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ERYTHROCYTES DURING EXPERIMENTAL ANTIARTHOSTATIC STIFFENING OF RATS

S.V. Zinoviev, S.S. Tseluyko

Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk

Abstract

The participation of catecholamines and calcium cations in oxidation-reduction reactions in erythrocytes of rats subjected to exposure to hypogravitation for 10 days was evaluated. A complex cytochemical study of the deposition of catecholamines in erythrocytes has been carried out. A decrease in the content of catecholamines in rat erythrocytes during modeling the effects of weightlessness has been established. New methods of cytochemical detection of catecholamines in rat erythrocytes have been developed.

Key words: hypogravitation, erythrocytes, catecholamines

Таблица 2.

Группа животных	Средний цитохимический коэффициент хромаффинной реакции
Контроль	2,6±0,32
Гипогравитация	1,2±0,24
	P < 0,01

ция, предложенной нами цитохимической реакции, остается до сих пор не полностью изученным. Уже подтверждено клиническое значение этого способа в случае диагностики заболеваний сердца у человека [2, 12]. В настоящем исследовании мы существенно модифицировали окраску ализарином и бихроматом клеток крови. Это делалось с целью уточнения количественной оценки предложенной нами цитохимической реакции. Мы использовали два этапа окраски мазков крови.

1 этап – хромаффинный. Нами установлено, что при окрашивании препаратов ализарином красным С в течение 90 секунд с последующей отмывкой водным раствором бихромата калия превалирует хромаффинная реакция цитоплазмы эритроцитов. Под микроскопом подсчитывали количество различно окрашенных 300 эритроцитов. После этого рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле:

$$СЦК = 1 \text{ балл} \times \text{количество эритроцитов} + 2 \text{ балла} \times \text{количество эритроцитов} + 3 \text{ балла} \times \text{количество эритроцитов} : 300,$$

в которой 1 балл – эритроциты не окрашены; 2 балла – гранулярная окраска периферии эритроцита, центральная часть клетки не окрашена; 3 балла – эритроциты целиком гранулярно окрашены.

2 этап – выявление катионов кальция. При увеличении сроков окрашивания мазка крови до 420 секунд ализарин красный С окра-

шивает хромаффинные гранулы – реакция выявления кальция. В большинстве полей зрения гранулы исчезают в результате интенсивной окраски цитоплазмы эритроцитов. В мазках обнаруживаются крупные отложения продуктов гистохимической реакции в виде гранул размером до 2 мкм. Продукт реакции в количестве от одной до 5 гранул обнаруживается в цитоплазме эритроцитов. Кирпичного цвета осадок ализаринового лака, появляясь в мазках, становится нерастворимым в воде, что характерно для присутствия катионов кальция. Аммиак усиливает эту реакцию, что подтверждает реакцию Борнтрегера для аминокрупп. Оценка этого этапа цитохимической реакции оценивали следующим образом. Подсчитывали процент клеток: 1 балл – в эритроцитах отсутствует продукт реакции; 2 балла – в эритроцитах обнаруживаются единичные гранулы (1–5 гранул); 3 балла – в эритроцитах обнаруживается большое количество гранул (они целиком заполняют цитоплазму). После подсчета 300 эритроцитов рассчитывали средний цитохимический коэффициент СЦК.

Поскольку часть эритроцитов сохраняет хромаффинную реакцию, дополнительно считали процент клеток, содержащих катехоламины.

При антиортостатическом вывешивании крыс нами установлено достоверное снижение содержания катехоламинов в эритроцитах (табл. 2). В контрольной группе животных

Таблица 3.

Группа животных	СЦК кальция	Хромаффинная реакция эритроцитов в %.
Контроль	1,15±0,032	5,0±0,5
Гипогравитация	1,0±0,02	0,01±0,01
	P < 0,01	P < 0,01

при длительном окрашивании эритроцитов ализарином частично сохраняется хромафинная реакция в $5 \pm 0,5$ % эритроцитов. В случае воздействия гипогравитации на крыс второй этап цитохимической реакции приводит к полному окрашиванию эритроцитарных клеток. При этом существенно снижается содержание кальция в эритроцитах в сравнении с контрольной группой животных (табл. 3).

Установлено, что в условиях космического полета и экспериментальной гипогравитации выявляется тенденция к ионизации кальция и гипокальциемии [11]. Поэтому можно предположить, что нарушение метаболизма кальция может привести к изменению реактивности адренорецепторов клеточных мембран. Эта точка зрения подтверждается в нашем эксперименте, что отражает механизм десенситизации адренорецепторов эритроцитов в случае экспериментального моделирования воздействия невесомости на организм.

Результаты нашего исследования подтверждают информативность стандартного цитохимического способа выявления катехоламинов с помощью бихромата калия и нитрата серебра. Наш способ информативен в случае исследования животных, у которых существенно нарушен обмен тирозина. При этом он значительно и выгодно отличается ввиду качественного окрашивания цитоплазмы клеток. При окраске спиртовым раствором ализарина отсутствует выщелачивание цитоплазмы эритроцитов, которое происходит в случае обработки гипотоническим раствором бихромата. С помощью этого метода можно выявить кальций в лейкоцитах. Результаты исследования говорят о репрезентативном характере выбранной нами схемы цитохимической оценки воздействия гипогравитации на организм крыс.

Результаты исследования показали, что экспериментальное моделирование с антиортостатическим вывешиванием крыс на протяжении 10 дней приводит к десенситизации адренорецепторов мембран эритроцитов.

Выводы

Воздействие экспериментальной гипогравитации приводит к десенситизации адренорецепторов мембран эритроцитов периферической крови.

Литература

1. Грабовская Е.Ю. Чувствительность адренорецепторов у пациентов с нарушениями сердечного ритма на фоне дисплазии соединительной ткани при курсовом приеме препарата магния / Е.Ю. Грабовская, Г.И. Нечаева, Ю.В. Москвина, С.С. Бунова // Российский кардиологический журнал. 2012. №4. С. 69–73.

2. Зиновьев С.В. Локализация ионов кальция на мембране эритроцитов кролика при общем охлаждении организма // Диагностика состояния дыхательной системы. Материалы XVII сессии СО АМН СССР. Благовещенск, 1988. С. 5–8.

3. Зиновьев С.В. Способ количественной цитохимической оценки хромафинной реакции эритроцитов крыс при общем охлаждении организма / С.В. Зиновьев, С.С. Целуйко, С.С. Селиверстов, М.М. Горбунов. Патент России 2617201. 2017. Бюллетень №12.

4. Ильин Е.А., Новиков В.Е. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных экспериментах с крысами // Косм. биол. и авиакосм. мед. 1980. Т. 24. № 3. С. 79–80.

5. Луценко М.Т., Андриевская И.А. Способ оценки устойчивости мембран эритроцитов при обострении цитомегаловирусной инфекции путем измерения гистохимическим методом содержания ионов кальция в эритроцитах периферической крови беременных. Патент России 2563827. 2015., Бюллетень №26.

6. Маколкин В.И., Овчаренко С.И. Внутренние болезни. М.: Медицина, 1999. 592 с.

7. Мардарь А.И., Кладиенко Д.П. Цитохимический способ выявления катехоламинов в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. №10. С. 586–588.

8. Мардарь А.И. Способ прогнозирования течения ишемической болезни сердца / А.И. Мардарь, О.С. Полянская, И.К. Владковский. Патент России, 1803767. 1993. Бюллетень №11.

9. Панченков Д.Н. Моделирование как подход к изучению хирургической патологии в условиях невесомости / Д.Н. Панченков, Д.А. Астахов, Р.Б. Алиханов, А.В. Баранов, А.А. Нечунаев // Клиническая практика. 2011. №3. С. 78–84.

10. Оганов В.С. Изменения костной ткани человека в космическом полете: о возможных механизмах остеопении / В.С. Оганов, А.В. Бакулин, В.Е. Новиков и др. // Журнал остеопороз и остеопатии. 2005. Вып. № 2. С. 2–7.

11. Kyiik Yu.H. Calcification and apoptosis of blood cells as a marker of the presence, severity and progression of coronary heart disease associated with type 2 diabetes mellitus: ultrastructural and cytological studies / Yu.H. Kyiik, M.A. Kohut, O.Yu., Andrushevska et al. // Международный эндокринологический журнал. 2016. № 4 (76). С. 15–21.

Статья поступила в редакцию 01.06.2017

Координаты для связи

Зиновьев Сергей Викторович, с. н. с. ЦНИЛ ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: sinowev@mail.ru

Сергей Семенович Целуйко, д. м. н., профессор, проректор по НР ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России, заведующий кафедрой гистологии и биологии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Почтовый адрес ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России: 675000 г. Благовещенск, ул. Горького, 95. E-mail: agma@mn.ru