

медицинской помощи населению Уральского федерального округа. Екатеринбург, 2013. С. 23–29.

4. Савельев В.С., Филимонов М.И., Бурневич С.З. Панкреонекрозы. МИА, 2008. 259 с.

5. Сахно В.Д., Майнулов А.М., Власова Н.В., Бочкарева И.В. Некротический панкреатит, протоколы лечения. Анналы хирургической гепатологии. 2005. Т.10. № 1. С.107–112.

6. Савельев В.С., Филимонов М.И., Бурневич С.З. Острый панкреатит. Национальное руководство по хирургии. 2009. Т. 2. С. 196–229.

7. Международная ассоциация панкреатологов (Индия, г. Кочин). 2012 г. 256 (6): 875–880).

Статья поступила в редакцию 21.03.2017
Координаты для связи

Володченко Нина Петровна, д.м.н., заведующая кафедрой хирургии с курсом урологии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: ninavolodcenko@gmail.com

Почтовый адрес ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России: 675000, г. Благовещенск Амурской области, ул. Горького, 95. E-mail: amurgma@list.ru, agma@nm.ru

Иванощук Пётр Иванович, заведующий хирургическим отделением ГАУЗ АО «Благовещенская городская клиническая больница». E-mail: Petr.Ivanoscuk@yandex.ru

Денискин Олег Николаевич, врач-рентгенолог ГАУЗ АО «Благовещенская городская клиническая больница».

Полянский Сергей Александрович, врач-хирург ГАУЗ АО «Благовещенская городская клиническая больница».

Почтовый адрес ГАУЗ АО «Благовещенская городская клиническая больница»: 675000, г. Благовещенск, ул. Больничная, 32. E-mail:1@muzgkb.ru

С.С. Целуйко, Н.П. Красавина

ФГБОУ ВО Амурская ГМА
Минздрава России
г. Благовещенск

**ЭЛЕКТРОННО-
МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ
ЛОКАЛИЗАЦИЯ
АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В СЛИЗИСТОЙ
ОБОЛОЧКЕ ТРАХЕИ КРЫС ПРИ
ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

Изучение регуляторных механизмов клетки и путей управления ими – задача чрезвычайной важности. Изменения внутриклеточных процессов при участии аденилатциклазного механизма реагирования тканей легкого происходит при воздействии различных физических, химических и биологических факторов [4, 5].

В процессе передачи сигнала аденилатциклаза (АЦ) может быть активирована связанными с плазматической мембраной рецепторами, влияющими на G-белки, которые передают гормональные и иные стимулы в клетку [1–3, 7]. Активация аденилатциклазы приводит к образованию циклического аденозин-3'-5'-монофосфата (цАМФ), действующего как вторичный посредник, который уже давно известен как биологически активный мессенджер. Он обладает способностью активировать особые ферменты – протеинкиназы, катализирующие реакции фосфорилирования различных белков с участием АТФ [8, 10]. Главным результатом этого процесса является изменение активности фосфорилированного белка, что приводит к повышению либо к снижению скорости биохимических реакций в клетке-мишени. Установлено, что цАМФ действует как внутриклеточный регулятор многих физиологических процессов [8, 15]. Аденилатциклаза играет важную роль в регуляции концентрации циклических нуклеотидов, обеспечивающих функционирование мукоцилиарного конвейера слизистой оболочки воздухоносного отдела легких [4–6]. Существует 10 разнообразно регулируемых изоформ аденилатциклазы, активация некоторых из них важна для регулирования функции мукоцилиарного конвейера воздухоносных путей. Иммуногистохимия аденилатциклазы в легких крыс показала, что АЦ-2, АЦ-3, АЦ-5, АЦ-6 преобладают в гладких мышцах сосудов и бронхов, а изоформы АЦ-1, АЦ-4, АЦ-7 и АЦ-8 – в бронхиальном эпителии [9].

С другой стороны, известно, что уровень внутриклеточного цАМФ может варьировать в зависимости от различных физиологических условий [10, 13]. Температурные изменения могут приводить к нарушению образования цАМФ стимулирующих кинетику ресничек эпителия трахеи у млекопитающих путем фосфорилирования легкой цепи внешних динеиновых ручек, обеспечивая скользящее движение периферических дублетов аксонемы друг относительно друга [15]. Фосфорилирование легкой цепи динеина достаточно для ускорения микротубулярного скольжения. Роль АЦ в этом процессе остается не полностью изучена, так как ранее были показаны нарушения мукоцилиарного клиренса при холодовом воздействии [5, 13]. Клетка имеет множество возможностей для увеличения цАМФ через рецепторы, связанные с G-белком, такие, как β 2-адренергические и аденозиновые рецепторы [10–17], но неясно, может ли цАМФ, производимый в цитозоле, диффундировать в реснички в соответствующих концентрациях или этот механизм связан с АЦ, локализованной в мембранах ресничек? Точная локализация аденилатциклазы в эпителиальных клетках слизистой трахеи и механизмы того, как рецепторы, связанные с G-белком, влияют на частоту биения ресничек, остаются неизученными. Мы предполагаем, что АЦ должна играть важную роль, поскольку она является единственным известным внутриклеточным мессенджером цАМФ.

Целью нашего исследования было выявление локализации аденилатциклазы на светоптическом и электронно-микроскопическом уровнях в слизистой оболочке трахеи крыс в норме и при холодовом воздействии.

РЕЗЮМЕ

В данном исследовании была изучена реакция, указывающая на локализацию и активность аденилатциклазы в слизистой оболочке трахеи в норме и при длительном холодовом воздействии на организм. Полученные данные позволяют прийти к заключению, что у интактных крыс в слизистой оболочке наибольшая активность аденилатциклазы выявляется на поверхности ресничек однослойного многорядного реснитчатого эпителия и на поверхности эндотелия кровеносных капилляров слизистой оболочки трахеи. Анализ активности аденилатциклазы при длительном холодовом воздействии указывает, что наибольшее снижение интенсивности фермента происходит в эпителиальной выстилке.

Ключевые слова: аденилатциклаза, многорядный реснитчатый эпителий трахеи, эндотелий капилляров, холодовое воздействие. DOI 10.22448/AMJ.2017.2.49-54

Материал и методы

Исследование проведено на 20 белых беспородных половозрелых крысах-самцах с массой тела 150–200 г. При исследовании животные были разбиты на 2 группы: первая – контрольная – состояла из 10 животных, которые содержались в условиях вивария в течение всего эксперимента при T-22°C. Вторая группа, состоящая из 10 животных, подвергалась ежедневному 3-х часовому общему холодовому воздействию в течение 28 дней при T-минус 15°C.

Объектом нашего исследования был каудальный отдел слизистой оболочки трахеи крыс. Взятые образцы тканей использовали для изготовления срезов: на замораживающем микротоме, толщиной 25–30 мкм, а также полутонких и ультратонких срезов. Для этого из каудального отдела трахеи вырезали кусочки ткани размером 1x1 мм. С целью изучения локализации и активности аденилатциклазы применяли метод электронной гистохимии по Райку и соавт. (Гайер Г., 1974). Исследование ультратонких срезов проводили на электронном микроскопе просвечивающего типа Technai G2 Spirit Twin (Голландия).

Для изучения на светооптическом уровне реакции на АЦ применяли модифицированный метод по Райку и соавт., где образующийся нерегистрируемый пирофосфат свинца переводили в сульфид свинца, помещая срезы в 1% раствор сульфида свинца. Время инкубации – 30 минут при температуре 37°C.

Результаты и обсуждение

Поверхность слизистой оболочки трахеи выстлана многорядным мерцательным эпителием, состоящим из базальных, промежуточных, бокаловидных и реснитчатых клеток. При световой микроскопии в трахее интакт-

ELECTRONIC AND MICROSCOPIC LOCALIZATION OF ADENYLATE CYCLASE IN THE MUCOUS MEMBRANE OF THE TRACHEA OF RATS AT COLD EXPOSURE

S.S. Tseluyko, N.P. Krasavina

Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk

Abstract

In this study, a reaction was studied that indicates the localization and activity of adenylate cyclase in the mucosa of the trachea in normal and with prolonged cold exposure to the body was studied. The obtained data allow to conclude that in intact rats in the mucosa the greatest activity of adenylate cyclase is detected on the surface of the cilia of the simple ciliated epithelium and on the surface of the endothelium of the blood capillaries of the tracheal mucosa. Analysis of the activity of adenylate cyclase during prolonged cold exposure indicates that the greatest decrease in enzyme intensity occurs in the epithelial lining.

Key words: Adenylate cyclase, ciliated epithelium of the trachea, endothelium of capillaries, cold exposure.

ных крыс аденилатциклаза выявляется в виде гранул сульфида свинца в апикальной зоне эпителиальных клеток слизистой оболочки в виде сплошной чёрной полосы (рис.1).



Рисунок 1. Слизистая оболочка трахеи интактной крысы. Высокая активность аденилатциклазы выявляется на апикальном полюсе эпителиальных клеток слизистой оболочки трахеи (стрелки). Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. в модификации. Увеличение: 600.

При этом необходимо отметить, что уровень реакции на аденилатциклазу наряду с высокой активностью в апикальном полюсе показывает почти полное отсутствие ее в зоне, прилегающей к базальной мембране. При электронной микроскопии гранулы пиррофосфата свинца хорошо выявляются в зоне ресничек (рис. 2, 3).

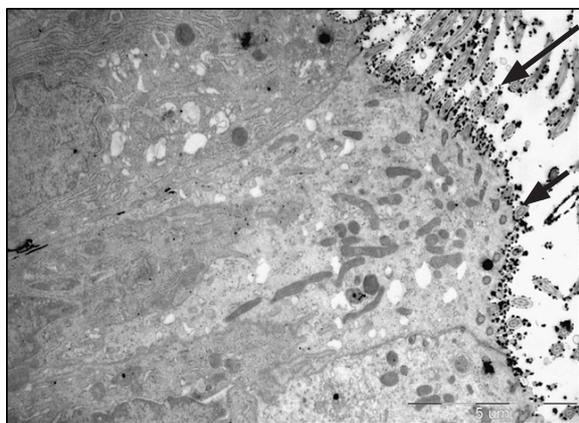


Рисунок 2. Электронограмма кадуального отдела эпителия слизистой оболочки трахеи у интактных крыс. Гранулы пиррофосфата свинца локализуются в апикальной зоне (стрелки). Заливка – аралдит, эпон. Окраска: уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. Увеличение: 13500.

Гистохимическая реакция на АЦ выявляется в виде хлопьевидных скоплений на наружной поверхности ресничек. Одновременно гранулы пиррофосфата свинца неоднородно маркируют поверхность микровосинок (рис. 3). На поперечном срезе ресничек выявляются до 10–15 отдельных, либо связанных хлопьевидных гранул. На микровосинках ло-

кализуется от 3 до 6 отдельных, либо связанных гранул пиррофосфата свинца – продукта гистохимической реакции. Внутренние структуры ресничек и микровосинок, а также цитоплазма эпителиальных клеток слизистой оболочки, не проявляют активности к АЦ.

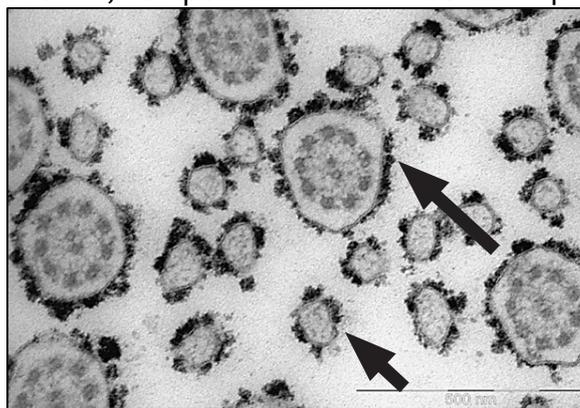


Рисунок 3. Электронограмма поперечных срезов ресничек и микровосинок мерцательного эпителия слизистой оболочки трахеи интактных крыс. На поперечном срезе ресничек и микровосинок выявляются хлопьевидные гранулы (стрелки). Заливка – аралдит, эпон. Окраска – уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. Увеличение: 135000.

На апикальной поверхности бокаловидных (рис. 4А) и безреснитчатых (рис. 4Б) эпителиальных клеток продукты гистохимической реакции выявляются в виде гранул. Небольшое количество гранул пиррофосфата свинца локализуется между боковыми поверхностями реснитчатых клеток.

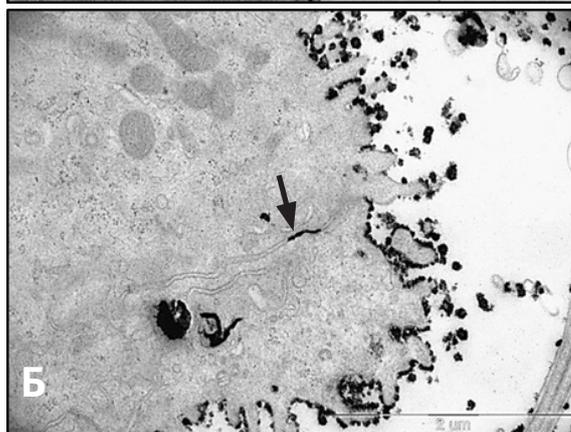
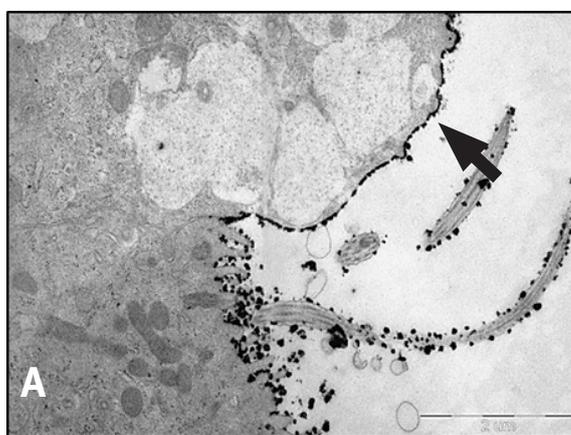


Рисунок 4. Электронограммы бокаловидных и безреснитчатых клеток эпителия слизистой оболочки трахеи интактных крыс. А – бокаловидная эпителиальная клетка (стрелка). Б – безреснитчатая эпителиальная клетка (стрелка – АЦ между боковыми поверхностями клеток). Заливка – аралдит, эпон. Окраска – уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. Увеличение: 23000.

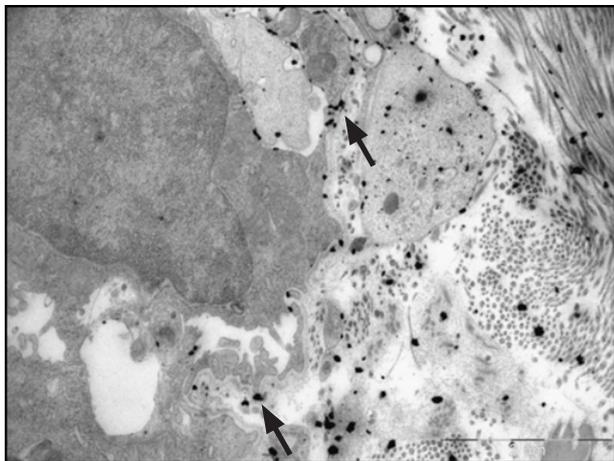


Рисунок 5. Электронограмма базального полюса эпителия слизистой оболочки трахеи интактных крыс. Единичные гранулы (стрелки) пирофосфата свинца выявляются в собственной пластинке слизистой оболочки (Б – базальная мембрана). Заливка – аралдит, эпон. Окраска – уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. Увеличение: 23000.

Наибольшая активность продуктов гистохимической реакции выявляется в кровеносных капиллярах, прилегающих к базальной мембране (рис. 5). При этом гранулы пирофосфата свинца локализуются на поверхности эндотелиальных клеток (рис. 6).

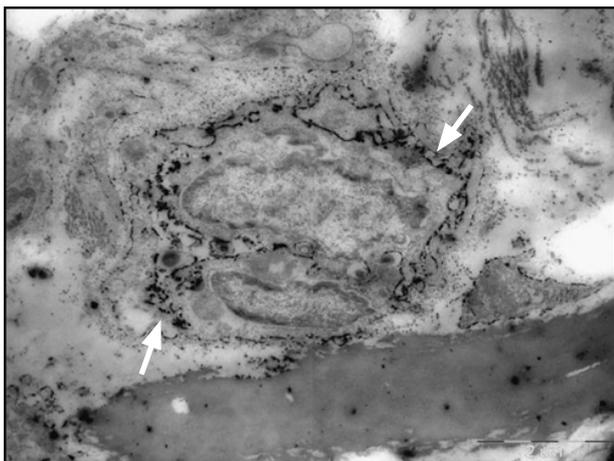


Рисунок 6. Электронограмма кровеносного капилляра эпителия слизистой оболочки трахеи интактных крыс. Многочисленные гранулы локализуются на поверхности эндотелия (стрелки). Заливка – аралдит, эпон. Окраска – уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. Увеличение: 23000.

Действие низкой температуры в течение 28 дней несколько уменьшает степень выра-

женности гистохимической активности аденилатциклазы на апикальном полюсе эпителиальных клеток в слизистой оболочке трахеи.

При световой микроскопии уровень гистохимической реакции неоднороден. Наблюдается снижение АЦ на апикальном полюсе реснитчатого эпителия на ресничках. В других участках эпителия выявляется очень высокая активность аденилатциклазы, в ряде зон регистрируется полное отсутствие продуктов реакции на фермент (рис. 7).

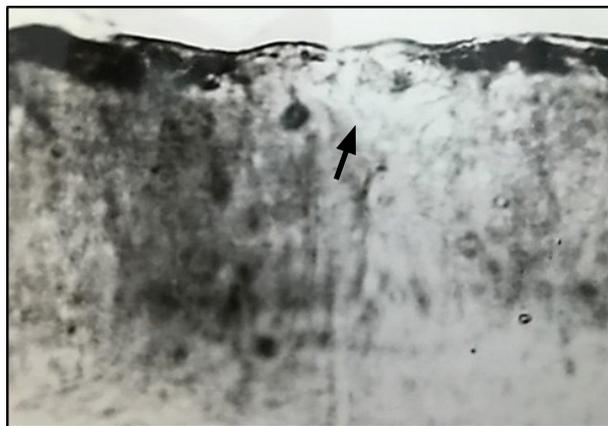


Рисунок 7. Слизистая оболочка трахеи крысы. Охлаждение организма в течение 28 дней по 3 часа ежедневно. Активность аденилатциклазы снижается на апикальном полюсе эпителиальных клеток слизистой оболочки трахеи вплоть до полного отсутствия продуктов реакции (стрелка). Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. в модификации. Увеличение: 600.

При электронно-микроскопическом исследовании отмечается уменьшение реакции на АЦ в апикальном полюсе эпителия в ресничках. Количество гранул пирофосфата свинца на поперечном срезе ресничек уменьшается до 5–8 штук. Гранулы сульфида свинца располагались диффузно, нередко между ними выявлялись значительные участки, лишенные ферментативной активности. Отмечается также низкая активность реакции на АЦ в микроворсинках реснитчатых клеток. При длительном холодном воздействии значительно возрастает активность аденилатциклазы на поверхности микроорганизмов, внедрившихся между ресничками (рис. 8).

При длительном общем охлаждении организма отмечается высокая активность АЦ на поверхности эндотелия и эритроцитов в капиллярах слизистой оболочки (рис. 9).

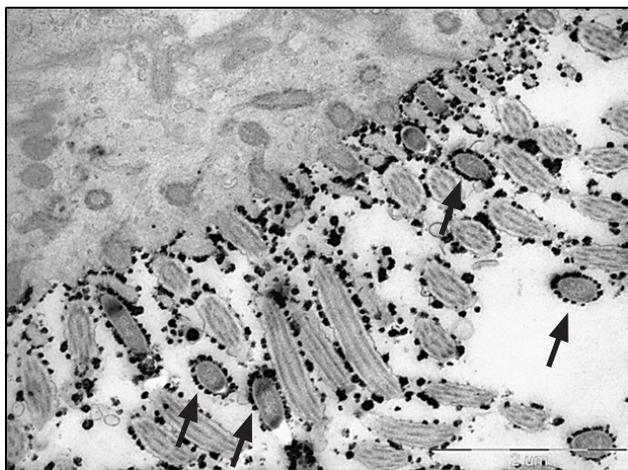


Рисунок 8. Электронограмма кадуального отдела эпителия слизистой оболочки трахеи у крыс. Охлаждение организма в течение 28 дней по 3 часа ежедневно. Высокая активность АЦ на поверхности микроорганизмов, внедрившихся между ресничками (стрелки). Заливка – аралдит, эпон. Окраска – уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. Увеличение: 23000

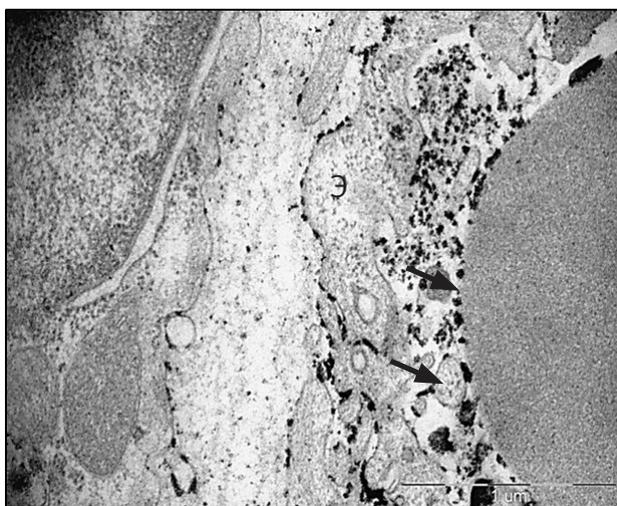


Рисунок 9. Электронограмма кровеносного капилляра слизистой оболочки трахеи крыс. Охлаждение организма в течение 28 дней по 3 часа ежедневно. Отмечается усиление активности АЦ на поверхности эндотелия (Э) и эритроцитов (стрелки) в капиллярах слизистой оболочки. Заливка – аралдит, эпон. Окраска – уранил ацетат, цитрат свинца. Реакция на аденилатциклазу по Райку и соавт. Увеличение: 59000.

Выводы

В данном исследовании была проведена гистохимическая реакция на аденилатциклазу на световом и электронно-микроскопическом уровнях, что позволило выявить ее локализацию и оценить активность фермента в слизистой оболочке трахеи в норме и при длительном холодом воздействии на организм. Аденилатциклаза является трансмембранным белком часть полипептидной цепи которого находится на внешней поверхности мембраны и влияет на функцию ресничек цилиарных клеток эпителия [15]. Полученные данные о локализации и активности АЦ по-

зволяют прийти к заключению, что у интактных крыс в слизистой оболочке наибольшая активность аденилатциклазы выявляется на поверхности ресничек и эндотелия кровеносных капилляров слизистой оболочки трахеи.

Что касается активности аденилатциклазы в эксперименте, то при длительном холодом воздействии происходит снижение интенсивности гистохимического проявления ферментативной реакции на АЦ в ресниччатом эпителии. Это приводит к понижению содержания цАМФ, что отражается на состоянии мукоцилиарного транспорта при холодом воздействии. И, напротив, отмечается усиление активности аденилатциклазы на поверхности эндотелия и эритроцитов в капиллярах слизистой оболочки, что, возможно, связано с активацией симпатoadренальной системы при действии холода, выбросом адреналина, который фиксируется на специальных рецепторах, активизирующих аденилатциклазу. Это, в свою очередь, изменяет синтез цАМФ, влияющих на протеинкиназу, катализирующих белок динеин. Оценивая функцию ресниччатого эпителия, особенно в ситуации с холодом воздействием, необходимо уделять внимание концентрации циклических нуклеотидов, которые определяют компенсаторно-приспособительные изменения в мукоцилиарном конвейере.

Литература

1. Довжикова И.В. Гистохимическая характеристика активности НАДФ-диафоразы (маркера NO-синтазы) аденилат- и гуанилатциклаз в плаценте при беременности, осложненной герпетической инфекцией. Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2003. В. 15, С. 14–19.
2. Довжикова И.В., Луценко М.Т. Изменение интенсивности работы вторичных мессенджеров (аденилатциклазы) и процессов гормонообразования в плаценте при беременности, осложненной герпетической инфекцией. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009, №14. С. 74–76.
3. Туракулов Я.Х. Циклические нуклеотиды и регуляция клеточного метаболизма. Туракулов Я.Х., Саатов Т.С., Халиков С.К., Исаев Э.И., Гайнудинов М.Х. Изд-во «Фан». 1983. 240 с.
4. Целуйко С.С., Прокопенко А.В. Системный анализ компенсаторно-приспособительных реакций в легких. Благовещенск. 2001. 35 с.
5. Целуйко С.С. Морфофункциональная характеристика органов дыхания человека в экстремальных экологических условиях северо-востока РСФСР. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Новосибирск, 1991. 25 с.
6. Целуйко С.С., Зиновьев С.В., Горбунов М.М., Решодько Д.П. Растровая электронная микроскопия криогенных объектов легких крыс при холодом воздействии. Амурский медицинский журнал. 2016. №2. С. 47–51.
7. Яковлев А.В. Внутриклеточные пресинаптические механизмы эффектов оксида азота (II) в нервно-мышечном соединении лягушки / А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Нейрохимия. 2005. Т. 22. № 1. С. 81–87.
8. Яковлева О.В., Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф. Аденилатциклазная и гуанилатциклазная системы внутриклеточных вторичных посредников. Уч. пособие. Казань, 2009. 48 с.
9. Tkachuk V.A., Avakian A.E. // Molecular mechanisms of g-proteins

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-enzyme 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