

Г. І. Мардар

Депонування катехоламінів і структурні зміни в еритроцитах за умов порушення функції симпатико-адреналової системи

Биохимическим, а также ультра- и цитохимическим методами установлено, что включения катехоламинов в эритроцитах представлены темными глыбками и пузырьками, размеры и количество которых прямо пропорциональны функциональному состоянию симпатико-адреналовой системы, соответственно измельчение или укрупнение включений. В обоих случаях наблюдается нарушение структуры эритроцитов. Цитохимический способ определения катехоламинов в эритроцитах позволяет параллельно определять и морфологическое состояние эритроцитов.

Вступ

Велика ємність еритроцитів (Е) і їх здатність за допомогою адренорецепторів зв'язувати значну кількість катехоламінів (КА) дозволяють заключити, що Е являють собою тимчасове депо КА, котре використовується тими клітинами, які проявляють найбільшу до них спорідненість у даний конкретний момент [4]. Оскільки адреналін утворюється головним чином в надниркових залозах, то Е є суттєвою ланкою гуморального механізму забезпечення адреналіном (А) життєво важливих органів. У зв'язку зі зниженням нервової адренергічної регуляції у віці після 40—50-ти років [7] значення депонування КА еритроцитами з віком збільшується і, напевно, залежить від морфофункціонального стану самих Е.

Мета нашої роботи — вивчення депо КА і структури Е при порушенні функції симпатико-адреналової системи.

Методика

У дослідах використовували кролів, морських свинок, а також щурів лінії Вістар (самці віком від 2 до 3 міс). Недостатність симпатико-адреналової системи викликали у морських свинок і щурів двостороннім хірургічним видаленням надниркових залоз. А спустошення резервів КА в закінченнях симпатичних нервів і в надниркових залозах щурів і кролів добивалися за допомогою 6-добового введення *per os* резерпіну в дозі 0,6 мг/кг [1].

Підвищення активності симпатичної нервової системи викликали моделюванням іммобілізаційного стресу та холодової стимуляції (14 щурів). Відомо, що інсулін вибірково стимулює звільнення накопиченого в секреторних гранулах А, тому 7 щурам вводили інсулін у дозі 2 од/кг [1].

Вміст КА в Е і в плазмі крові досліджували біохімічним методом [3]. Цитохімічне визначення кількості і морфологічних особливостей включень КА в Е та їх структури проводили оригінальним методом [5]. На його основі нами розроблено і використано морфометричний аналіз кількості й

© Г. І. Мардар

якості включень КА на один середній еритроцит (свідoctво про рацпропозицію № 31/89 «Способ определения гормонального инсулин-катехоламинового индекса», видано 01.11.1989 р. Чернівецьким медінститутом).

Вивчення ультраструктури включень КА та Е проводили ультрацитохімічним методом, розробленим на основі цитохімічного методу. Дослідження проводили на мікроскопі ПЕМ- 125 К, використовуючи периферичну кров, котру забирали із хвостової вени.

Морфологію Е залежно від впливу факторів, які викликали підвищення або зниження КА в крові, проводили за допомогою фазово-контрастного електронного мікроскопа РЕМ 202 МВ, використавши модифіковану нами методику [2]. Цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення

Результати біохімічного визначення вмісту А і норадреналіну (НА) в крові і морфометричного визначення КА в одному середньому Е контрольних тварин, тварин, яким вводили резерпін і яким проводили адреналектомію подано в табл. 1. Як видно із таблиці зменшення запасів КА в організмі при адреналектомії, введенні резерпіну супроводжується вірогідним зниженням кількості включень КА в Е.

При обробці мазків крові інтактних щурів цитохімічним способом у 97 % Е виявляються включення КА, котрі мають вигляд дрібних і середніх паличкоподібних брилок і пухирців (рис. 1, а).

Відмічено, що на 4—6-ту добу після адреналектомії зі зниженням вмісту КА в Е відбувається поступове зменшення кількості великих, а потім дрібних пухирців і брилок, котрі стають пилевидними, а потім взагалі зникають. Е при цьому виглядають плоскими і гіпохромними (див. рис. 1, б).

З метою уточнення форми Е проведено дослідження їх структури у щурів після адреналектомії за допомогою растрової електронної мікроскопії. Визначено, що на 4-ту добу після двосторонньої адреналектомії спостерігалися виражені структурні зміни Е. Клітини втрачали свою диско-видну форму, виникали патологічні форми: стомато-, аканто- та сфероцити. Ці зміни свідчать про незворотні структурні і метаболічні порушення в Е. Зокрема сфероцити при подальшому розвитку процесу гемолізуються.

Таблиця 1. Кількість і характер включень катехоламінів в еритроцитах крові за умов зниження їх рівня в організмі

Група тварин	Адреналін, нмоль/л	Норадреналін, нмоль/л	Вміст катехоламінів, ум.од.
Інтактні щури	13,96±1,02	21,97±0,23	1,83±0,02
Щури, яким вводили резерпін	4,31±0,05*	4,50±0,02*	0,37±0,03*
Контрольні кролі	17,21±1,03	14,88±0,14	2,54±0,01
Кролі, яким вводили резерпін	5,97±0,07*	5,22±0,06*	0,84±0,01*
Кролі, яким здійснювали адреналектомію	—	—	0,32±0,01*

Примітка: тут і в табл. 2 * вірогідні значення.

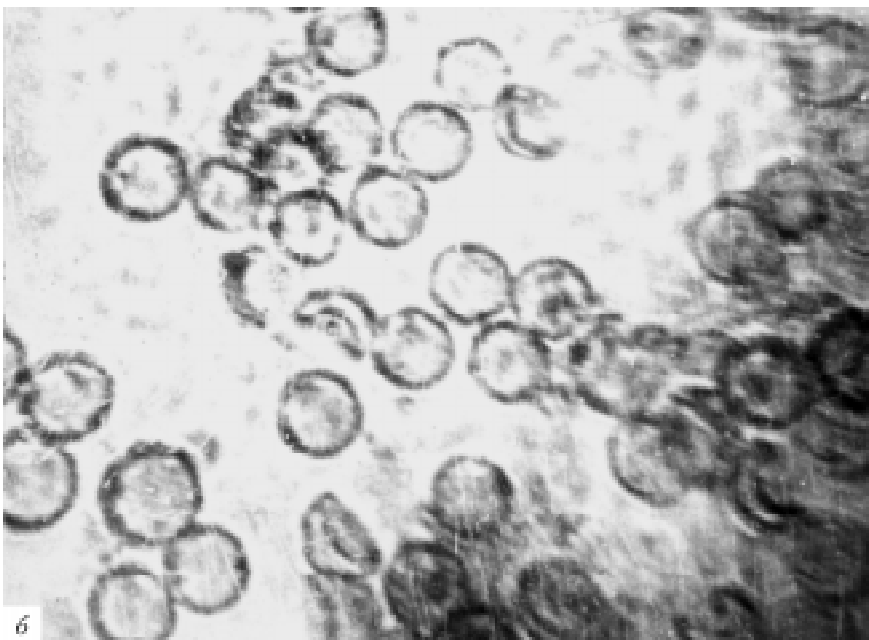
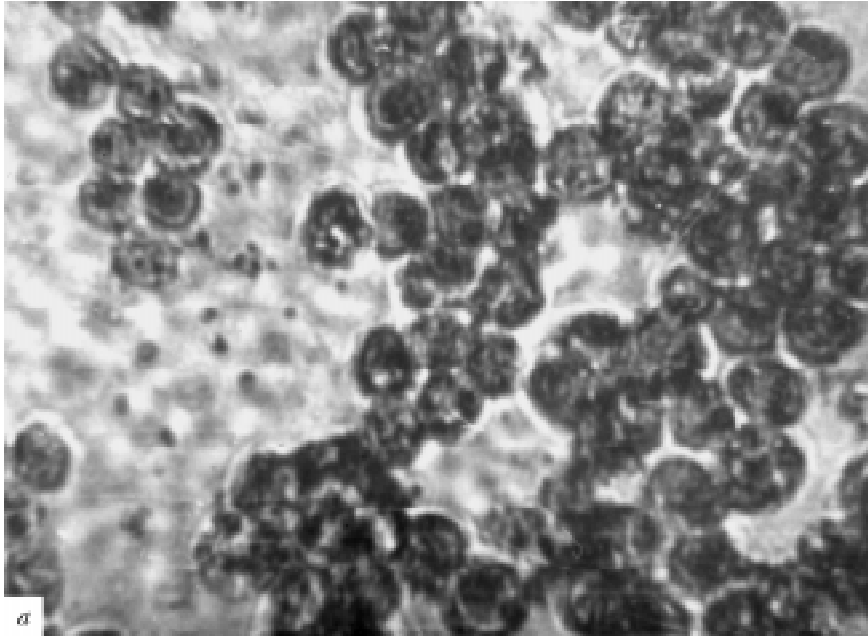


Рис. 1. Включення катехоламінів в еритроцитах інтактних щурів (*a*) (видно брилки та пухирці), щурів після адrenaлектомії (*б*) (зменшення кількості включень, плоскі еритроцити). Забарвлення цитохімічним методом. Збільшення (об.40, ок.15).

За допомогою ультрацитохімічного методу визначено, що КА в Е розташовані в підмембранному шарі і мають вигляд чорних гранул при збільшенні мікроскопа в 15 000 (рис. 2, *a*). Ці гранули визначаються також у плазмі крові та в лейкоцитах. При збільшенні мікроскопа в 54 000 вони мають вигляд скупчень мілких пухирців (див. рис. 2, *b*). Після введення резерпіну включення КА в Е зникали і спостерігався значний гемоліз Е.

Підвищення рівня еритроцитарного депо КА супроводжується активізацією енергетичного обміну саме в клітинах [1]. А зниження рівня еритроцитарного депо КА, можливо викликає, навпаки, різке падіння енергетичного обміну в цих клітинах, що в свою чергу призводить до одночасного порушення їх форми та структури.

Результати біохімічного і цитохімічного вивчення вмісту КА в Е щурів за умов підвищення активності симпатико-адреналової системи представлено в табл. 2. Під впливом іммобілізації протягом 4 год відбуваються динамічні зміни КА в Е: підвищення через 1 год і зниження через 3–4 год. Біохімічне дослідження свідчить, що в плазмі і особливо в Е знижується вміст адреналіну. А концентрація НА, навпаки, підвищується.

За допомогою електронної цитохімії встановлено, що під впливом інсуліну, через 15–45 хв після його введення, значно збільшується кількість продукту реакції на КА в Е. При збільшенні мікроскопа в 20 000 включення КА в Е мали вигляд скупчень темних брилок у цитоплазмі клітин і в плазмі, зв'язаних з білками плазми крові (рис. 3, *a*). А при збільшенні в 60 000 ці брилки виглядають великими та темними пухирцями і створюють темний відтінок цитоплазми клітин. В Е визначаються при цьому деструктивні зміни: надриви плазмолемі клітин та сітковидні просвітлення цитоплазми.

В Е крові, одержаних через 2 год від початку іммобілізації щурів, також збільшилася кількість продукту цитохімічної реакції, котрий утворював скупчення під мембраною. У клітинах при цьому з'являлися деструктивні зміни.

Таблиця 2. Вплив іммобілізаційного стресу на вміст катехоламінів в еритроцитах крові щурів ($M \pm m$)

Показник	Контроль	Стрес
Вихідний вміст катехоламінів у еритроцитах, ум. од	1,80±0,1	1,85±0,2
Вміст катехоламінів після іммобілізації через		
1 год	1,74±0,4	2,18±0,21
3 год	2,19±0,4	1,34±0,1*
4 год	2,06±0,2	0,92±0,2*
Вміст у плазмі, нмоль/л		
адреналіну	19,35±2,2	7,29±0,9*
норадреналіну	15,51±1,9	13,77±1,0
Вміст у еритроцитах, нмоль/л		
адреналіну	10,11±1,2	2,99±0,2*
норадреналіну	9,05±0,7	14,14±0,5*

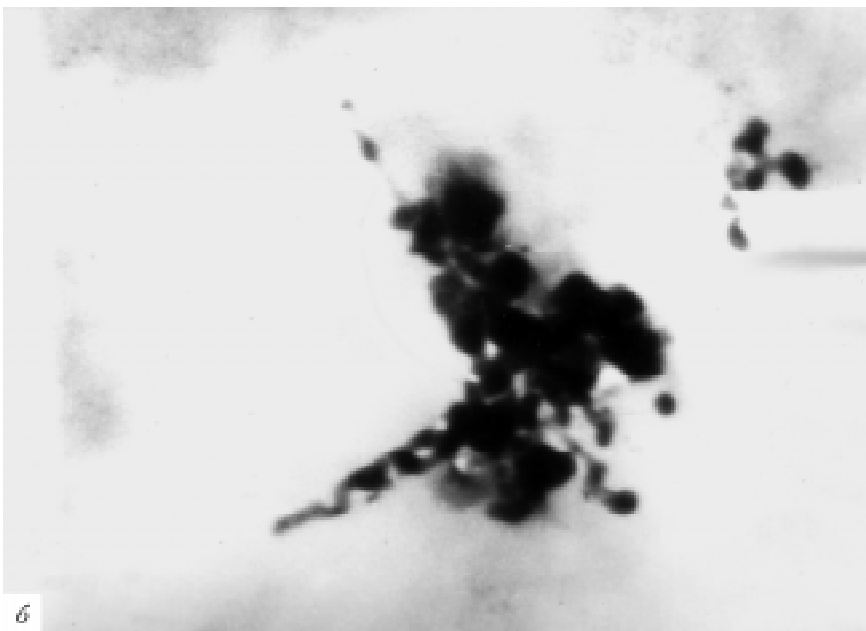
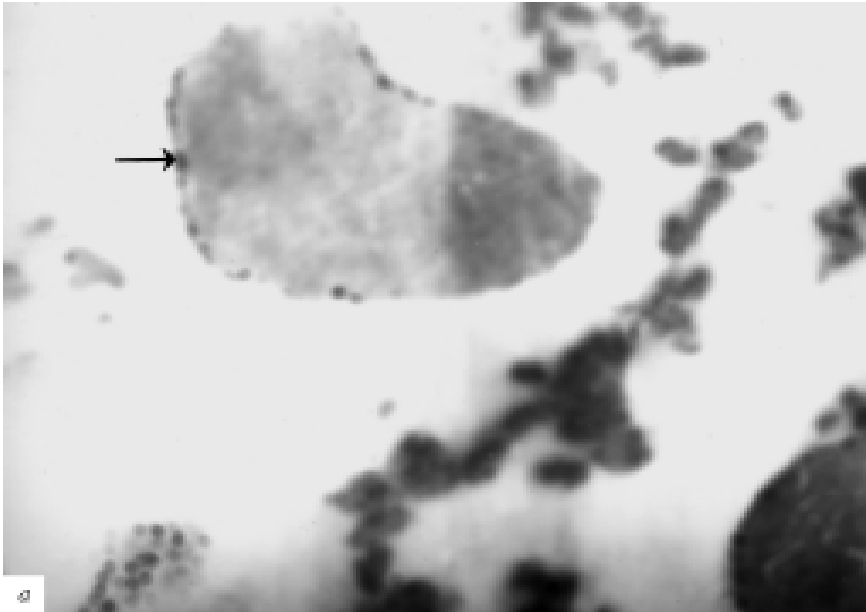


Рис. 2. Електронограми. Ультрацитохімічне визначення катехоламінів в еритроцитах інтактного щура: *а* – при збільшенні мікроскопа в 15 000 видно гранули в підмембранному шарі клітин (показано стрілкою); *б* – при збільшенні 54 000 видно скупчення мікропухирців.

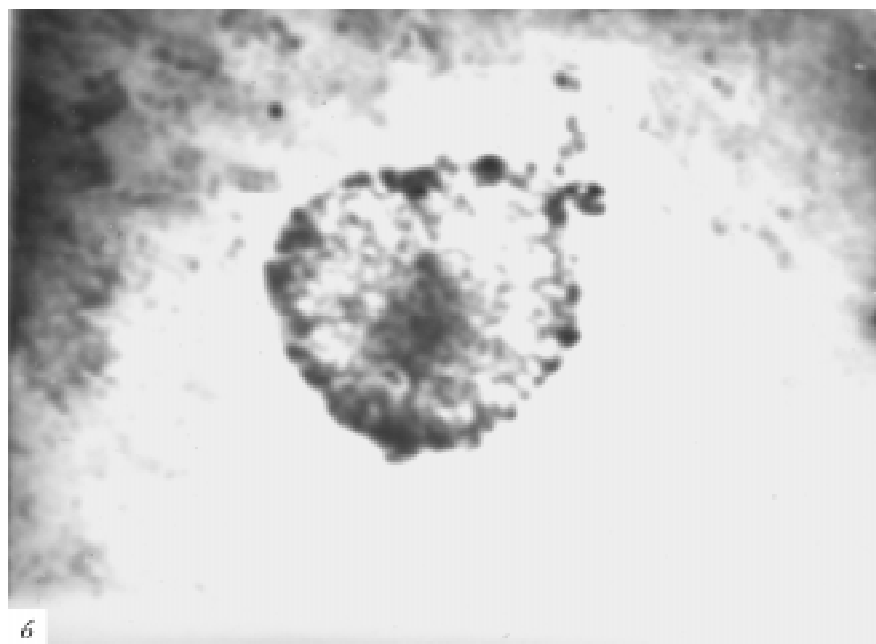
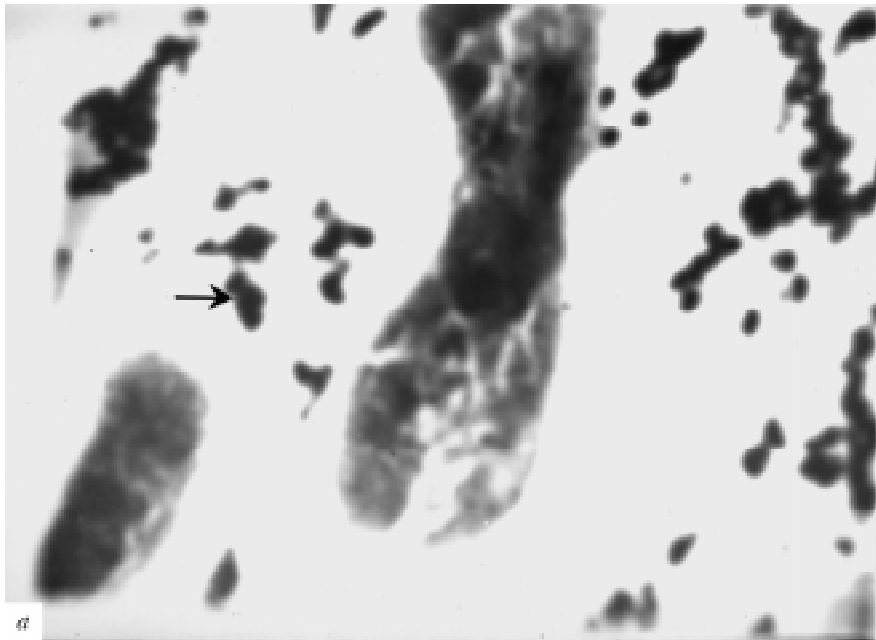


Рис. 3. Еритроцити щура після введення інсуліну (а). Збільшення кількості включень катехоламінів (показано стрілкою) і поява деструктивних змін у клітинах. Еритроцити щура після чотиригодинної іммобілізації (б). Збільшення включень КА в підмембранному шарі (1), утворення мікросфероцита (2), початок внутрішньоклітинного гемолізу (3). Ультратрихімічний метод. Електронограма. Збільшення 15 000.

Через 4 год від початку іммобілізації Е набували неправильної форми, утворювали відростки та цитоплазматичні місточки між собою, від них відгалужувалися маленькі ділянки — мікросфероцити, в котрих визначалися включення КА (див. рис. 3, б). Підмембранний шар цитоплазми ставав більш електроннощільним. У деяких Е в центрі утворювалися великі скупчення мікровезикул. Під впливом 4-годинної іммобілізації в Е включення КА розміщувалися ближче до поверхні клітин, котрі змінювали свою форму. Частина клітин розпадалася на мікросфероцити, які мали значну кількість включень КА. У деяких місцях зрізу спостерігали скупчення мікросфероцитів, що утворювали сітковидні та стрічковидні структури.

В Е включення КА мають чітку гранулярну форму, але при збільшенні мікроскопу в 60 000 — 100 000 видно, що в Е є і гранули, і електроннощільні пухирці. Можна вважати, що вони подібні до тих, котрі спостерігаються в термінальних аксонах нейронів [1] (дрібні гранулярні і великі пухирці).

Наші результати збігаються з даними електронно-мікроскопічного дослідження будови А- і НА-утримуючих секреторних гранул у клітинах мозкової речовини надниркових залоз бика, одержаних методом заморожування — сколювання [8]. При цьому в середині секреторних гранул удається виявити електроннопрозорі пухирці (Вз). При звичайній фіксації альдегідами і OsO_4 ці Вз не визначаються, оскільки як фіксуючі речовини, напевно, викликають їх злиття. При виділенні гранул 85 % їх містили Вз, тоді як у зразках із цільних клітин Вз знайдені в 60 % гранул. У середині однієї гранули нараховується 1—5 Вз. Форма Вз часто сферична, але може бути витягнутою і трубчатою. Вони повністю відокремлені і не з'єднуються з мембранами.

Подібні Вз спостерігають в епінефроцитах при обробці матеріалу використаною нами методикою [6].

Проведені дослідження свідчать, що гіперкатехоламінемії дійсно викликають підвищення депо КА в Е і впливають на їх структуру. Таким чином, при гіпокатехоламінемії виникає зниження рівня депо КА в Е периферичної крові, а при гіперкатехоламінемії, навпаки, — підвищення вмісту КА в Е. Як зменшення, так і збільшення концентрації КА в Е в свою чергу призводить до порушення форми, утворення мікросфероцитів, деструкції Е.

Оскільки гіпо- і гіперкатехоламінемії та порушення структури Е — явища, які зустрічаються часто, особливо при судинній патології, то визначення вмісту КА в Е і їх структури є дуже важливим для корекції лікування і недопущення різних ускладнень перебігу захворювань. Але складність і недосконалість відомих методів дослідження не дозволяють широкого аналізу цих явищ. Цитохімічний спосіб визначення КА в Е дозволяє оцінювати не тільки вміст КА, а й морфологічний стан Е і може використовуватися в клінічній практиці.

Висновки

1. Зниження функціональної активності симпатико-адrenalової системи, викликане адреналектомією або резерпінізацією тварин, супроводжується зменшенням депо катехоламінів в еритроцитах при їх біохімічному і цитохімічному визначенні.

2. Підвищення функціональної активності симпатико-адреналової системи при введенні інсуліну або при іммобілізації щурів викликає підвищення депо катехоламінів в еритроцитах.

3. Порушення депо катехоламінів в еритроцитах, як за типом збільшення, так і за типом зменшення, призводить до зміни структури еритроцитів.

A. I. Mardar

CATECHOLAMINE DEPOT AND STRUCTURAL ERYTHROCYTES TRANSFORMATIONS UNDER THE CONDITIONS OF SYMPATHETIC ADRENALINE SYSTEM FUNCTIONAL DISORDERS

By means of ultra and cytochemical study the catecholamine inserts in erythrocytes look like dark lumps and beads the size and quantity of which being directly proportional to the sympathetic adrenaline system functional state. Under the conditions of catecholamine shortage the inserts reducing to fragments occurs and under catecholamine growth the increase in inserts size takes place. In both cases the erythrocyte structure disorder has been observed. Cytochemical method of catecholamine detection in erythrocytes also allows simultaneously to determine the erythrocyte morphological state.

Sumi State University Ministry of Education of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Комиссаров И.В.* Лекарственная регуляция адренергических процессов. — К.: Здоров'я, 1976. — 111 с.
2. *Крымский Л.Д., Нестайло Г.Б., Рыбалов А.Г.* Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. — М.: Медицина, 1976. — 236 с.
3. *Матлина Э.Ш., Меньшиков В.В.* Клиническая биохимия катехоламинов. — М., 1967. — 304 с.
4. *Мардарь А.И.* Участие эритроцитов в депонировании и транспорте катехоламинов. — В кн.: X Всесоюзный съезд АГЭ (17-19.1X. 1986 г., Винница). — Полтава, 1986. — С. 230.
5. *Мардарь А.И., Кладуенко Д.П.* Цитохимический способ выявления катехоламинов в эритроцитах // Лаб. дело. — 1986. — №10. — С. 386-388.
6. *Мардарь А.И.* Ультрацитохімічний спосіб визначення катехоламінів (КА) в крові. — В кн.: Матеріали I Ітогової науково-практичної конференції, посвященої актуальним вопросам теоретичної і практичної медицини (20–21 апреля 1995 г.) — Сумы: Сум. ун-т, 1995. — С.1.
7. *Швалев В.Н.* Адренергическая регуляция и некоторые проблемы сердечно-сосудистой патологии // Кардиология. — 1988. № 8. — С. 5-9.
8. *Ornberg R.L., Duond L.T., Pollard H.B.* Intragranular vesicles :new organelles in the secretory granules of adrenal chromaffin cells // Cell and Tissue Res. — 1986. — **245**. — № 3. — P. 547-553.

*Сум. ун-т
М-ва освіти України*

*Матеріал надійшов
до редакції 15.06.97*