

Дубовая Т. К., Цибулевский А. Ю., Максина А. Г.

ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ИНТАКТНЫХ И ВАГОТОМИРОВАННЫХ КРЫС НА ОСТРУЮ КРОВОПОТЕРЮ

*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (заведующая — проф. В.В. Глинкина)
Российского национального исследовательского медицинского университета
им. Н. И. Пирогова, Москва, e-mail: gusvbr@mail.ru*

Несмотря на многолетнюю историю исследования ответной реакции эритрона на кровопотерю, некоторые ее важные аспекты остаются неясными. В частности, недостаточно изучены изменения морфологии эритроцитов (Эр), рельеф поверхности их плазмалеммы и микровязкости липидного бислоя последней в условиях постваготомического синдрома. Актуальность данного исследования связана, с одной стороны, с тем, что острая массивная кровопотеря является одним из наиболее распространенных патологических состояний [1], с другой — с использованием ваготомии как компонента оперативного вмешательства при хирургическом лечении перфоративных кровоточащих язв двенадцатиперстной кишки [14]. При этом принималась во внимание ведущая роль гипоксии в патогенезе постгеморрагического состояния [11].

Эксперименты проводили на 75 беспородных крысах-самцах массой 200–250 г. Исследовали 4 группы животных: 1 — интактные; 2 — животные через 14 суток после двусторонней поддиафрагмальной стволовой ваготомии (срок, когда морфофункциональные изменения в органах с нарушенной иннервацией выражены в наибольшей степени); 3 и 4 — соответственно интактные и денервированные крысы, перенесшие кровопотерю. Кровопускание производили из яремной вены в размере 35–37 % от общего объема крови. Материал для исследования брали через 0,25; 0,5; 3; 10; 24; 96 и 240 (10 суток) часов после кровопотери.

На неокрашенных мазках крови, фиксированных в парах формальдегида, с помощью компьютерной морфоденситометрии (на установке автоматизированной микроскопии МЕКОС-Ц2) определяли диаметр, площадь, интегральную и удельную оптическую плотность (показатель, косвенно отражающий насыщенность Эр-гемоглобином), поляризацию, фактор формы Эр, значения анизотитоза и анизохромии, процентное содержание эхиноцитов и стоматоцитов.

С помощью метода спинового зонда исследовали микровязкость липидного бислоя и рельеф поверхности эритроцитарной мембраны (через 24 часа после кровопотери). Для этого суспензию Эр инкубировали с одним из трех зондов: спин-мечеными аналогами стеариновой кислоты с нитроксильным фрагментом у пятого (зонд 1) или четырнадцатого (зонд 2) углеродного атома ацильной цепи и спин-меченым бензокарболином (зонд 3).

Существенно, что зонды 1 и 2 встраиваются в липидный бислой таким образом, что карбоксильная группа находится на его поверхности, а жирнокислотная цепь погружена в бислой параллельно ацильным цепям фосфолипидов. При этом радикальные фрагменты зондов располагаются на разной глубине (0,6–0,8 нм

и 2,0–2,2 нм соответственно). Зонд 3 локализуется в области периферических белков плазмалеммы. По кинетике восстановления его сигнала феррицианидом калия судили о рельефе поверхности Эр. Для характеристики поведения спиновых зондов в мембране использовали параметр упорядоченности, рассчитываемый по спектрам электронного магнитного резонанса и свидетельствующий о подвижности ацильных цепей в области локализации нитроксильного фрагмента зонда. При этом параметр S_1 характеризует упорядоченность мембраны на глубине 0,6–0,8 нм от поверхности, параметр S_2 – на глубине 2,0–2,2 нм.

Показано, что массивная кровопотеря у исходно интактных крыс сопровождается достоверным увеличением среднего диаметра (на 4,1 %) и площади (на 8,3 %) Эр, поляризации (на 22,5 %) и фактора формы (на 8,4 %), а также их интегральной (на 18,5 %) и удельной (на 113,3 %) оптической плотности. Также выявлена тенденция к увеличению удельной доли эхиноцитов (10 часов) и стоматоцитов (96 часов). Статистически значимых отклонений показателей анизотропии и анизохромии не обнаружено. При этом наиболее выраженные изменения морфологии Эр отмечаются через 3–10 и 240 часов. Кроме того, выявлены закономерные изменения и физико-химических характеристик Эр (табл. 1). Так, зарегистрировано уменьшение параметра упорядоченности для зондов 1 и 2, что указывает на снижение микровязкости липидной фазы по всему профилю мембраны Эр. Анализ кинетики восстановления сигнала зонда 3 показал, что на фоне кровопотери отмечаются выраженные преобразования рельефа поверхности Эр.

Таблица 1

ПАРАМЕТРЫ УПОРЯДОЧЕННОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ КРОВОПОТЕРИ

| | S_1 | S_2 |
|-------------------|----------------|----------------|
| ИНТ | 0,639 ± 0,09 | 0,516 ± 0,014 |
| ИНТ + кровопотеря | 0,587 ± 0,011* | 0,467 ± 0,006* |
| ВАГ | 0,636 ± 0,013 | 0,519 ± 0,005 |
| ВАГ + кровопотеря | 0,614 ± 0,003* | 0,508 ± 0,008 |

ИНТ – интактные крысы.

ВАГ – ваготомированные крысы.

S_1 и S_2 – параметры упорядоченности мембраны на глубине 0,6–0,8 нм и 2,0–2,2 нм от поверхности соответственно.

* статистически достоверные ($p < 0,05$) различия между значениями параметров до и после кровопускания.

Установлено, что ваготомия сопровождается увеличением среднего диаметра (на 5,0 %), площади (на 10,3 %) и интегральной оптической плотности (на 13,7 %) Эр. При этом существенных изменений микровязкости липидного бислоя и рельефа поверхности эритроцитарной мембраны не выявлено.

Динамика морфологических показателей Эр у денервированных животных в условиях кровопотери характеризуется рядом особенностей по сравнению с таковой у интактных крыс. Так, средний диаметр и площадь Эр через 0,5 часов

достоверно уменьшаются (на 11,1 % и 20,5 % соответственно), в то время как у интактных — увеличиваются. В отличие от интактных крыс кровопотеря у ваготомированных животных не приводит к существенным изменениям показателя поляризации (через 3 и 10 часов) и фактора формы (через 0,5 и 10 часов) Эр, а также их интегральной оптической плотности (во все сроки исследования, за исключением 240 часов). Перестройка качественного состава популяции Эр денервированных крыс при этом также имеет определенные особенности: через 0,5 часов отмечается тенденция к увеличению содержания стоматоцитов, а через 10 часов — эхиноцитов. Наибольшие отклонения морфологии Эр зарегистрированы через 0,5—3 часа и 96 часов. Существенных отличий в изменениях физико-химических характеристик Эр в условиях острой кровопотери у ваготомированных крыс по сравнению с исходно интактными не обнаружено. Можно лишь отметить несколько меньшую степень изменения профиля поверхности плазмалеммы Эр у крыс, подвергнутых ваготомии.

Обобщая и анализируя полученные данные, можно предположить, что увеличение среднего диаметра и площади Эр при кровопотере, по всей вероятности, обусловлено активацией эритропоэза и ускоренным поступлением из красного костного мозга в кровеносное русло ретикулоцитов, отличающихся, как известно, большими размерами по сравнению с нормоцитами [6]. При этом отмечается искажение формы Эр, о чем свидетельствует нарастание значений поляризации и фактора формы. Вероятной причиной изменения геометрических характеристик Эр может быть снижение вязкости липидной фазы их плазмалеммы, на что указывает уменьшение параметра упорядоченности для зондов 1 и 2. В основе данного явления предположительно лежат нарушения химической структуры и физико-химических характеристик эритроцитарной мембраны. Так, известно, что в условиях кровопотери наблюдается активация свободнорадикального окисления липидов мембраны Эр и перестройка липидного состава в сторону увеличения доли кислых фосфолипидов и холестерина [3]. Определенный вклад в изменение липидного профиля мембраны Эр могут также вносить липопротеиды плазмы. Считается, что в результате их взаимодействия с эритроцитарной мембраной меняется содержание холестерина и триацилглицеринов в ее липидной матрице [3]. В качестве наиболее вероятных агентов, приводящих к таким изменениям, можно считать продукты перекисного окисления липидов, биогенные амины и другие физиологически активные вещества, содержание которых в крови существенно повышается при кровопотере.

Высказывается мнение, что сдвиги в химическом составе липидной матрицы плазмалеммы Эр и связанные с ними изменения вязкоэластических свойств этих форменных элементов можно рассматривать как неспецифическую приспособительную реакцию организма к гипоксии различной этиологии. Дело в том, что увеличение содержания кислых фосфолипидов в мембране улучшает ее проницаемость для респираторных газов, а нарастание концентрации холестерина ведет к увеличению суммарной площади поверхности, что в итоге повышает эффективность газотранспортной функции Эр [4]. Также важным элементом ответной реакции системы крови на кровопотерю является увеличение содержания гемоглобина в Эр. В нашем исследовании на это косвенно указывает повышение удельной оптической плотности Эр. Следует иметь в виду, что развитие и исход

данного патологического состояния существенно зависит от скорости элиминации «старых» и «неполноценных» Эр. Действительно, в нашей работе и в исследованиях других авторов [5] продемонстрировано увеличение доли стареющих форм (эхиноцитов, стоматоцитов и др.) при кровопотере.

Оценивая с биологических позиций выявленные дезадаптационные процессы в системе крови в условиях кровопотери, в первую очередь необходимо указать на особую роль гипоксии органов ЦНС и обусловленные ею расстройства интегративной деятельности головного мозга, а также нарушения связей между нервной, эндокринной и иммунной системами.

Изученная нами специфика ответной реакции эритрона на кровопотерю в условиях ваготомии предположительно может быть обусловлена несколькими причинными факторами. В частности, патологическая импульсация с центральных концов перерезанных блуждающих нервов, вызывая раздражение соответствующих ядер гипоталамуса, может нарушать функционирование находящихся поблизости нервных центров, регулирующих гемопоэз. Правомочность данного предположения косвенно подтверждается результатами исследований, в которых производилось локальное раздражение различных ядерных структур гипоталамуса, что вызывало закономерные перестройки состояния красной крови [2]. Кроме того, следует учитывать, что, по нашим данным, в очаге денервации существенно увеличивается количество лаброцитов [9]. Последние, как известно, наряду с другими клетками активно продуцируют цитокины, часть из которых (интерлейкин-1, гамма-интерферон, фактор некроза опухолей) принимает непосредственное участие в регуляции эритропоэза [13].

Определенный вклад в специфику развития исследуемого состояния может вносить «желудочный» фактор. Показано, что ваготомия сопровождается существенными изменениями состояния париетальных клеток желудочных желез [12], которые продуцируют компоненты соляной кислоты и вырабатывают внутренний фактор Касла (соляная кислота необходима для эффективного усвоения железа, фактор Касла — витамина B_{12}). В связи с этим можно предположить, что в условиях нарушения парасимпатической иннервации желудка развивается относительный дефицит железа и цианкобаламина — важных участников эритропоэза. К этому следует добавить выявленные при ваготомии расстройства обмена меди [8], также играющей определенную роль в процессе созревания Эр [15]. Кроме того, ваготомия, как правило, сопровождается развитием гастростаза [7], в том числе и у крыс. Вместе с тем установлено, что раздражение механорецепторов желудка приводит к существенным количественным и качественным изменениям показателей красной крови [10]. Это обстоятельство позволяет предположить, что накопление и длительный застой плотных пищевых масс в желудке ваготомированных крыс может оказать влияние на процесс эритропоэза по вышеуказанному механизму. Наряду с «желудочным» фактором в определение специфики ответа системы крови на кровопотерю в условиях ваготомии может вносить и «почечный» фактор, поскольку почки являются главным источником эритропоэтинов, а блуждающий нерв принимает участие в их иннервации.

На основании полученных результатов можно прийти к следующему заключению. Ваготомия сопровождается увеличением среднего диаметра, площади и ин-

тегральной оптической плотности Эр. Выраженных изменений формы и рельефа поверхности Эр, а также микровязкости липидной фазы их плазмалеммы при этом не наблюдается. Острая массивная кровопотеря приводит к существенным изменениям морфологических и физико-химических характеристик Эр как у исходно интактных, так и у ваготомированных крыс. Вместе с тем динамика ответной реакции эритрона в данных группах животных заметно различается. Одной из главных причин выявленных морфофункциональных изменений Эр у интактных и денервированных животных на фоне кровопотери является гипоксия и ее последствия. В то же время ответная реакция ваготомированных крыс на кровопотерю имеет свои особенности. Последние могут быть связаны с тем, что перерезка блуждающих нервов приводит к нарушению взаимодействия интегрирующих систем организма (нервной, эндокринной и иммунной), а также с нарушением состояния конкретных органов, вовлеченных в область денервации (желудок, почки и др.) и, как следствие, нарушением гомеостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Елисеева И. И., Васильева Э. К., Клунт М. А. и др.* Демография и статистика населения. М.: Финансы и статистика, 2006.
2. *Канн Е. Л.* Исследования структурно-функциональной организации процессов управления адаптивным поведением эритроцитарной части системы крови // Проблемы интерорецепции, регуляции физиологических функций и поведения. Л.: Наука, 1976. С.71–91.
3. *Ксейко Д. А., Генинг Т. П.* Процессы перекисного окисления липидов и защитная роль антиоксидантной системы в печени и эритроцитах в условиях острой кровопотери // *Фундаментальные исследования.* 2012. № 9. Ч. 2. С. 304–307.
4. *Марьинских В. В.* Исследование вязкоэластических свойств мембран эритроцитов беспородных белых крыс с различным уровнем двигательной активности в ответ на стрессы различной этиологии и оценка деформируемости эритроцитов людей с гипертонией. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. Тюмень, 2007.
5. *Мяжкова Е. А.* Повреждение клеток крови при травме и кровопотере. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. М., 2014.
6. *Гематология. Национальное руководство / Под ред. О. А. Рукавицына.* М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017.
7. *Халмуратова Р. А., Сотиволдиев М. М., Арутюнова М. В.* Нейрогуморальная регуляция желудочной секреции при постваготомическом синдроме // *Хирургия.* 1994. № 6. С. 28–30.
8. *Цибулевский А. Ю.* К вопросу о роли вегетативной нервной системы в регуляции минерального обмена // *Изв. АН СССР.* 1981. № 4. С. 518–525.
9. *Цибулевский А. Ю.* Закономерности нейродистрофического процесса в тонкой кишке при ваготомии. Автореферат дис. ... докт. мед. наук. М., 1999.
10. *Черниговский В. Н., Шехтер С. Ю., Ярошевский А. Я.* Регуляция эритропоэза. Л.: Наука, 1967.

11. Ярочкин В. С., Панов В. П., Максимов П. И. Острая кровопотеря. М.: Медицина, 2004.
12. Banić M., Malfertheiner P., Babić Z. Historical impact to drive research in peptic ulcer disease // Dig. Dis. 2011. Vol. 29(5). P. 444–453.
13. Oburoglu L., Romano M., Taylor N., Kinet S. Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation // Curr. Opin. Hematol. 2016. Vol. 23(3). P. 198–205.
14. Palmer K. Acute upper gastrointestinal haemorrhage // Br. Med. Bull. 2007. Vol. 83. P. 307–324.
15. Ruiz L., Jensen E., Bustos R. Adaptive responses of mitochondria to mild copper deprivation involve changes in morphology, OXPHOS remodeling and bioenergetics // J. Cell Physiol. 2014. Vol. 229(5). P. 607–619.

Ерофеева Л. М.

ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ТИМУСА КРЫС ПРИ АДАПТАЦИИ К ГИПЕРГРАВИТАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

*Центральная патологоанатомическая лаборатория
(заведующий — чл.-корр. РАН, проф. Л.В. Кактурский)*

*Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва,
e-mail: gystology@mail.ru*

Перспектива длительных межпланетных космических экспедиций делает актуальной проблему повышения устойчивости организма космонавтов к длительному воздействию факторов космического полета. Наиболее перспективным считается воздействие искусственной силы тяжести малой величины [4]. Показана возможность формирования в организме животных адапционной памяти на гравитационный стимул [1, 5]. Адаптация органов иммунной системы к гипергравитационному воздействию до настоящего времени не изучалась.

Цель работы: исследование морфофункционального состояния тимуса при длительном воздействии гипергравитации силой 2G и возможности усиления адапционного потенциала органа посредством повторного воздействия этого фактора.

Материал и методы. Экспериментальная часть работы была выполнена на базе ГНЦ РФ «Институт медико-биологических проблем» РАН. Гистологически и морфометрическими методами исследовали структуру и клеточный состав тимуса крыс-самцов Вистар массой 197±2 г после воздействия гипергравитации в однократном и повторном режимах (по 10 особей в группе). Гипергравитацию моделировали путем непрерывного вращения животных в периферических клетках центрифуги ЦФКБ-365 с радиусом 1,41 м. Скорость вращения центрифуги — 33,3 об./мин., величина перегрузки — 2g. Вращение животных 1-й группы осуществляли однократно в течение 5 суток, 2-й группы — двукратно, 19 и 5 суток с интервалом в 30 суток между вращениями. Контролем служили интактные животные (10 особей). Программа исследований одобрена Комиссией по биоме-