

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110872>

Морфологические проявления динамики связывания катехоламинов эритроцитами при активации и блокаде адренергических механизмов регуляции

Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев, Д.Л. Тёплый

Астраханский государственный университет имени В.Н. Татищева, Астрахань, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Форменные элементы крови проявляют чувствительность и реактивность к катехоламинам, что определяется присутствием на их мембранах рецепторов к катехоламинам. Этот факт представляет существенный исследовательский интерес, так как при изучении регуляторных механизмов не всегда достаточно знать концентрацию катехоламинов в крови — важно наблюдать их рецепцию эритроцитами.

Цель — с помощью цитологического метода изучить динамику связывания катехоламинов на эритроцитах при моделировании стимуляции и блокады адренергических механизмов регуляции.

Материалы и методы. Определяли число гранул катехоламинов на поверхности эритроцитов с использованием импрегнации азотнокислым серебром в условиях введения блокатора β -адренорецепторов анаприлина (2 мг/кг), острого стресса, активации норадренергической системы (НАС) (мапротилин, 10 мг/кг) и комбинации этих воздействий.

Результаты. Число гранул катехоламинов у интактных животных составляет 145–155 шт. на 40 эритроцитов. Чаще встречаются гранулы средних размеров (0,6–0,9 мкм). После введения блокатора β -адренорецепторов общее число гранул катехоламинов снижается в 2,8 раза за счёт гранул крупных и средних размеров. В условиях острого стресса общее число гранул повышается почти в 2 раза за счёт гранул малых размеров, что может являться признаком сенситизации мембран эритроцитов к катехоламинам. Активация норадренергической системы вызывает снижение числа гранул катехоламинов на 20% из-за уменьшения количества гранул малого и среднего размера. При стрессе на фоне активации норадренергической системы число гранул на эритроцитах снижено, что может быть признаком десенситизации адренорецепторов.

Выводы. Число гранул катехоламинов на эритроцитах снижается после введения блокатора β -адренорецепторов и повышается при остром стрессе. Стимуляция норадренергической системы сопровождается уменьшением связывания катехоламинов, особенно в условиях острого стресса, что свидетельствует о десенситизации адренорецепторов эритроцитов. Цитологический метод достаточно чувствителен для наблюдения рецепции катехоламинов эритроцитами при воздействии на адренергические структуры.

Ключевые слова: гранулы адреналина; эритроциты; адренорецепторы; блокатор β -адренорецепторов; стресс; норадренергическая система.

Как цитировать:

Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Тёплый Д.Л. Морфологические проявления динамики связывания катехоламинов эритроцитами при активации и блокаде адренергических механизмов регуляции // Морфология. 2021. Т. 159, № 4. С. 161–170. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110872>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110872>

Morphological manifestations of the dynamics of catecholamines binding by erythrocytes during activation and blockade of adrenergic regulatory mechanisms

Evgeniya V. Kuryanova, Andrey V. Tryasuchev, David L. Teply

Astrakhan State University named after V.N. Tatishchev, Astrakhan, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Blood cells show sensitivity and reactivity to catecholamines, which is determined by the presence of catecholamine receptors on their membranes. This fact is of significant research interest because in the study of regulatory mechanisms, it is not always sufficient to know the concentration of catecholamines in the blood; thus, it is important to observe their reception by erythrocytes.

AIM: To investigate the dynamics of catecholamine binding on erythrocytes when modeling the stimulation and blockade of adrenergic regulation mechanisms using the cytological method.

MATERIAL AND METHODS: The number of catecholamine granules on erythrocytes was determined using silver nitrate impregnation under conditions of administration of anapriline β -adrenergic receptor blocker (2 mg/kg), acute stress, activation of noradrenergic systems (maprotiline, 10 mg/kg), and their combination.

RESULTS: Intact animals had 145–155 pieces of catecholamine granules per 40 erythrocytes. Medium-sized (0.6–0.9 μm) granules are more common. After the administration of a β -adrenergic receptor blocker, the total number of catecholamine granules decreases 2.8 times because the granules increased in size. Under acute stress, the total number of granules increases almost two times because the granules shrink, which may be a sign of the sensitization of erythrocyte membranes to catecholamines. The stimulation of the noradrenergic system causes a 20% decrease in the number of catecholamine granules due to a decrease in the number of small- and medium-sized granules. Under stress against the background of the activation of the noradrenergic system, the number of granules on erythrocytes is reduced, which may be a sign of adrenergic receptor desensitization.

CONCLUSIONS: The number of catecholamine granules on erythrocytes decreased after the administration of a β -adrenergic receptor blocker and increased during acute stress. The stimulation of the noradrenergic system was accompanied by a decrease in the binding of catecholamines, especially under conditions of acute stress, which indicates the desensitization of erythrocyte adrenergic receptors. Thus, the cytological method is sensitive enough to observe the reception of catecholamines by erythrocytes when exposed to adrenergic structures.

Keywords: adrenaline granules; erythrocytes; adrenergic receptors; β -adrenergic receptor blocker; stress; noradrenergic system.

To cite this article:

Kuryanova EV, Tryasuchev AV, Teply DL. Morphological manifestations of the dynamics of catecholamines binding by erythrocytes during activation and blockade of adrenergic regulatory mechanisms. *Morphology*. 2021;159(4):161–170. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.110872>

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным литературы, форменные элементы крови проявляют чувствительность и реактивность к катехоламинам, что определяется присутствием на их мембранах рецепторов к катехоламинам [1–8]. Этот факт представляет существенный интерес, так как при изучении регуляторных механизмов не всегда достаточно знать концентрацию катехоламинов в крови — важно наблюдать их рецепцию эритроцитами. Известно, при изменении активности адренергических механизмов регуляции (хронические стрессы, депрессии, физические нагрузки, приём ряда лекарственных препаратов и др.) возможна сенситизация или десенситизация адренорецепторов, локализованных в миокарде, гладких мышцах сосудов и др. [9]. Однако в отношении адренорецепторов эритроцитов такие процессы не вполне очевидны в связи с особенностями строения и функционирования этих высокоспециализированных форменных элементов крови [10], что требует дополнительных исследований в этом направлении.

Существует ряд современных методов исследования поверхности клеток крови [6, 8, 10], радионуклидный и флуоресцентный методы обнаружения лиганд-рецепторных комплексов [7]. Однако, несмотря на быстрое развитие технологий и совершенствование лабораторного оборудования, эти методы остаются дорогостоящими и не всегда доступными для использования. В связи с этим мы, как и другие ученые [12], обратились к цитологическим методам с импрегнацией солями серебра поверхности эритроцитов, на которой выявляются гранулы, по мнению авторов, являющиеся гранулами катехоламинов [1]. В своё время эти методы были разработаны на основе экспериментов, в которых авторы доказали, что число и размеры гранул на эритроцитах изменяются в зависимости от концентрации вводимого адреналина. С учётом вышесказанного представляется важным определить, как изменяется количество связанных катехоламинов на эритроцитах при повышении или снижении активности адренергических механизмов регуляции в целом организме. Одновременно это позволит оценить возможности применения цитологического метода в исследовательской и клинической практике.

Цель — с помощью цитологического метода изучить динамику связывания катехоламинов на эритроцитах при моделировании стимуляции и блокады адренергических механизмов регуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты поставлены на 66 самцах нелинейных крыс 4-месячного возраста с соблюдением «Правил лабораторной практики в Российской Федерации», утверждённых приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и Хельсинкской декларации 1975 г. и её пересмотренным вариантом 2000 г., что подтверждено

этическим комитетом Астраханского государственного университета имени В.Н. Татищева (протокол № 6 от 27.02.2019 г.). Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Все животные были приучены до начала экспериментальных исследований. Эксперименты проведены в осенне-зимний период года.

Определяли число гранул катехоламинов на поверхности эритроцитов цитологическим методом [1]. Суть метода заключается в импрегнации азотнокислым серебром гранул катехоламинов на эритроцитах в мазках крови.

Мазки крови готовили традиционным способом и фиксировали в концентрированных парах формалина в течение 2 мин. Затем выдерживали 40 мин в темноте при комнатной температуре в смеси, состоящей из следующих компонентов (мас. %): формалин — 10, бихромат калия — 3, ацетат натрия — 0,2, 1,5% раствор хлорида натрия — 85,9. Сразу после извлечения из фиксирующей среды мазки промывали дистиллированной водой и импрегнировали в 5% растворе азотнокислого серебра в течение 3 мин. После импрегнации мазки докрашивали 1% раствором эозина в течение 1 мин [1]. Затем мазки крови высушивали при комнатной температуре. Микроскопию проводили в проходящем свете на микроскопе Leica DM750 под масляной иммерсией при увеличении $\times 1000$ с апертурой 1,25. На фоне светло-розовой цитоплазмы эритроцитов наблюдали гранулы тёмно-бурого цвета разного размера — гранулы катехоламинов.

Подсчёт числа гранул катехоламинов производили на фотографиях, сделанных с идентичных участков мазков крови контрольных и опытных животных. Каждый кадр разделяли на 4 равных сектора. В центре каждого сектора находили 10 свободно лежащих эритроцитов и подсчитывали гранулы катехоламинов, чётко видимые на фоне их цитоплазмы. Гранулы и их скопления различных форм, лежащие на границе и вне эритроцитов, не учитывались. Поскольку гранулы имели разные размеры, была принята их градация на 3 класса: мелкие, средние и крупные [1].

В контрольной серии было проведено определение размеров гранул на цифровых изображениях эритроцитов. Для определения размеров гранул использовали программу ImageJ 1.44r [13]. При подсчёте гранулы сразу же разносили по классам с учётом их величины. Всего на каждой мазке крови просматривали 40 эритроцитов. В контрольных и опытных группах на каждое состояние обрабатывали 3 мазка крови, соответственно, просматривали 120 эритроцитов. Рассчитывали среднее количество мелких, средних, крупных гранул и их общее число на 40 эритроцитов в мазках крови ($M \pm m$).

Моделирование состояния, при котором ожидалось снижение связывания эритроцитами, создавали однократным введением блокатора β -адренорецепторов анаприлина в дозе 2 мг/кг массы тела внутривенно. Для повышения активности адренергических механизмов регуляции и концентрации в крови у животных моделировали острый эмоционально-болевым стресс по методике [14].

Крысы подвергались 1-часовой иммобилизации в пенах из плексигласа в сочетании с электрокожным раздражением хвоста по стохастической схеме при значениях переменного тока (4–6 В, 50 Гц) пятикратно с длительностью каждой стимуляции 5 сек.

Общую активацию обмена катехоламинов вызывали стимуляцией норадренергической системы (НАС) с помощью введения мапротилина (10 мг/кг массы тела, Sigma). Мапротилин — селективный ингибитор обратного захвата норадреналина, повышает концентрацию катехоламинов в мозге и плазме крови [15]. Препарат вводили внутривенно четырёхкратно. Контрольные животные получали инъекции физиологического раствора в объёме 0,1 мл на 100 г массы тела. Стимуляцию НАС в соответствующих сериях комбинировали с введением анаприлина и с моделированием острого стресса.

Забор крови для приготовления мазков проводился через 30 мин после введения анаприлина, после окончания стрессирования, через 1,5 ч после последнего введения мапротилина.

Полученные данные подвергались проверке на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Значимость различий при экспериментальных воздействиях оценивали с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента в Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и Microsoft Excel 2015 (Microsoft Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно полученным данным (рис. 1), в мазках крови крыс в исходном состоянии эритроциты имели преимущественно округлую форму, иногда с неровными контурами, были окрашены равномерно, но в центральной

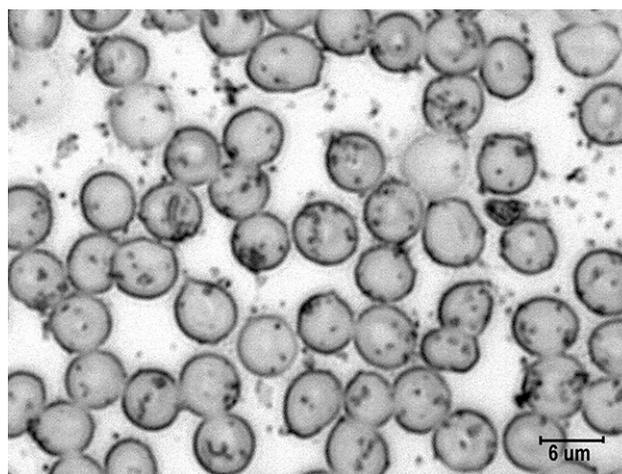


Рис. 1. Гранулы катехоламинов на поверхности эритроцитов в мазках крови контрольных крыс. Импрегнация азотнокислым серебром с докраской эозином. Ув. $\times 4000$.

Fig. 1. Granules of catecholamines on the surface of erythrocytes in the blood smears of control rats. Impregnation with silver nitrate and final staining with eosin. Magnification, $\times 4000$.

зоне часто светлее, что обусловлено формой двояковогнутого диска. На поверхности эритроцитов были заметны тёмные гранулы в виде комочков или точек разных размеров. Это гранулы катехоламинов, выявленные путём импрегнации азотнокислым серебром [1].

Размеры гранул были разными и варьировали в пределах от 0,270 до 2,07 мкм (программа ImageJ 1.44р) [13]. Фактический диаметр малых, средних и крупных гранул приведён в табл. 1.

Как видно на рис. 1 и табл. 2, на эритроцитах чаще встречались средние гранулы и несколько реже — мелкие

Таблица 1. Размеры гранул катехоламинов на эритроцитах в мазках крови контрольных крыс, мкм

Table 1. Sizes of catecholamine granules on erythrocytes in blood smears of control rats, μm

Показатель / Indicator		Малые / Small	Средние / Medium	Крупные / Large
Диапазон изменчивости	Variability range	0,272–0,599	0,600–0,899	0,900–2,000
Средний размер гранул, $M \pm m$	Medium granule size	0,454 \pm 0,0218	0,747 \pm 0,0075	1,183 \pm 0,0301

Таблица 2. Изменение числа гранул катехоламинов на эритроцитах крыс при блокаде β -адренорецепторов и остром стрессе, $M \pm m$

Table 2. Change in the number of catecholamine granules on rat erythrocytes under β -adrenergic blockade and acute stress, $M \pm m$

Группа животных / Group of animals	Общее число гранул, шт. на 40 эритроцитов / Total number of granules, pcs per 40 erythrocytes	Число гранул с учетом размерности / Number of granules, taking into account the dimension		
		Малые / Small	Средние / Medium	Крупные / Large
Контроль ($n=6$) / Control	146 \pm 18,0	40 \pm 7,1	72 \pm 16,1	41 \pm 5,9
Анаприлин ($n=6$) / Anaprilin	67 \pm 8,9**	23 \pm 3,9	26 \pm 4,4*	18 \pm 3,9**
Стресс ($n=6$) / Stress	263 \pm 36,7*	123 \pm 19,5**	92 \pm 11,9	48 \pm 6,4

Примечание. Статистическая значимость различий рассчитана по *t*-критерию Стьюдента. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем. ** $p < 0,01$ в сравнении с контролем.

Note. Significance was calculated using Student's *t*-test. * $p < 0.05$ compared with control. ** $p < 0.01$ compared with control.

и крупные гранулы катехоламинов. Количество мелких гранул составило $40 \pm 7,1$ шт., средних — $72 \pm 16,1$ шт., крупных $41 \pm 5,9$ шт. Общее число гранул катехоламинов на поверхности 40 эритроцитов в контрольной серии равнялось 145–153 шт.

Введение анаприлина сопровождалось снижением числа гранул катехоламинов всех размеров: мелких — в 1,7 раза, средних — в 2,8 раза ($p < 0,05$), крупных — в 2,3 раза ($p < 0,01$). Суммарное число гранул катехоламинов сократилось до $67 \pm 8,9$ шт., или в 2,3 раза ($p < 0,01$) (табл. 2, рис. 2). Столь резкое снижение числа гранул катехоламинов после введения β -адреноблокатора подтвердило, что гранулы на поверхности эритроцитов связаны именно с β -адренорецепторами их мембран. Следует подчеркнуть, что после введения анаприлина число гранул катехоламинов уменьшилось в основном за счёт гранул среднего и крупного размера, число мелких гранул изменилось в меньшей степени.

Согласно данным табл. 2 и рис. 3, у крыс, перенёсших острый стресс, число гранул малых размеров увеличилось в 3 раза ($p < 0,01$), средних — в 1,3 раза по сравнению с контролем, но число гранул крупных размеров почти не изменилось. Общее число гранул катехоламинов в условиях стресса достигло $263 \pm 36,7$ шт., что было почти вдвое больше, чем при спокойном бодрствовании ($p < 0,05$). Ориентируясь на эти значения, можно предполагать почти двукратный прирост концентрации катехоламинов в крови при стрессе. Резкое повышение количества мелких гранул катехоламинов, вероятно, свидетельствовало об увеличении числа мест их связывания на мембране эритроцитов.

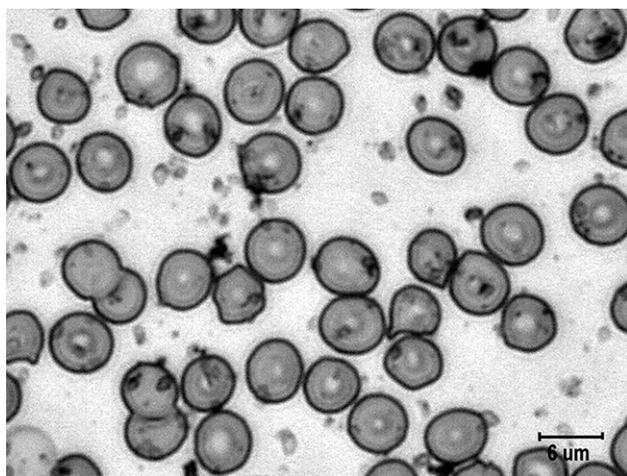


Рис. 2. Гранулы катехоламинов на поверхности эритроцитов в мазках крови крыс после введения блокатора β -адренорецепторов. Импрегнация азотнокислым серебром с докраской эозином. Ув. $\times 4000$.

Fig. 2. Granules of catecholamines on the surface of erythrocytes in the blood smears of rats after the administration of a β -adrenergic receptor blocker. Impregnation with silver nitrate and final staining with eosin. Magnification, $\times 4000$.

Рост числа гранул катехоламинов на эритроцитах в условиях острого стресса также говорит в пользу адренергической природы гранул и согласуется с представлениями о повышении уровня катехоламинов в крови при стрессе и ростом частоты сердечных сокращений (ЧСС) в условиях той же модели стресса [14].

Введение препарата, стимулирующего НАС и обмен катехоламинов, отразилось на их связывании эритроцитами. Согласно рис. 4 и табл. 3, общее число гранул

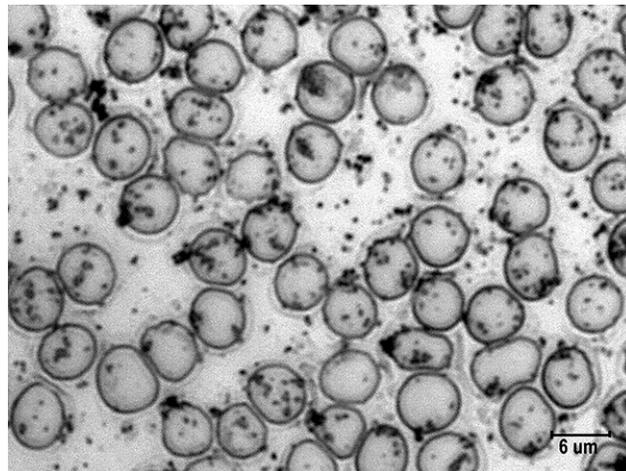


Рис. 3. Гранулы катехоламинов на поверхности эритроцитов в мазках крови крыс в условии острого стресса. Импрегнация азотнокислым серебром с докраской эозином. Ув. $\times 4000$.

Fig. 3. Granules of catecholamines on the surface of erythrocytes in the blood smears of rats under acute stress. Impregnation with silver nitrate and final staining with eosin. Magnification, $\times 4000$.

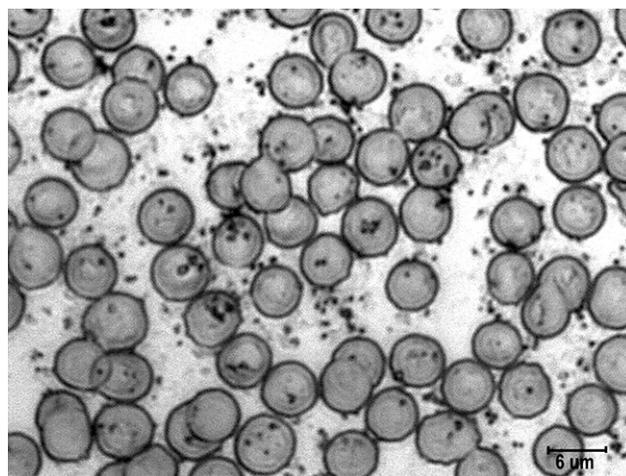


Рис. 4. Гранулы катехоламинов на поверхности эритроцитов в мазках крови крыс на фоне стимуляции норадренергической системы. Импрегнация азотнокислым серебром с докраской эозином. Ув. $\times 4000$.

Fig. 4. Granules of catecholamines on the surface of erythrocytes in the blood smears of rats during the stimulation of the noradrenergic system. Impregnation with silver nitrate and final staining with eosin. Magnification, $\times 4000$.

Таблица 3. Изменения числа гранул катехоламинов на эритроцитах крыс в условиях стимуляции норадренергической системы, $M \pm m$
Table 3. Changes in the number of catecholamine granules on rat erythrocytes under the stimulation of the noradrenergic system, $M \pm m$

Группа животных / Group of animals	Число гранул, шт. на 40 эритроцитов / Number of granules, pcs. per 40 erythrocytes	В покое / At rest	После введения β -адреноблокатора / After administration of a β -adrenergic blocker	Острый стресс / Acute stress
Контроль ($n=6$) / Control	Общее количество / Total number	146 \pm 18,0	67 \pm 8,9**	263 \pm 36,7*
	Малые / Small	40 \pm 7,1	23 \pm 3,9	123 \pm 19,5**
	Средние / Medium	72 \pm 16,1	26 \pm 4,4*	92 \pm 11,9
	Крупные / Large	41 \pm 5,9	18 \pm 3,9**	48 \pm 6,4
Стимуляция НАС ($n=6$) / NAS stimulation	Общее количество / Total number	117 \pm 8,4	54 \pm 16,1**	137 \pm 6,6##
	Малые / Small	26 \pm 2,3	25 \pm 8,4	70 \pm 6,4***. ##
	Средние / Medium	51 \pm 4,9	24 \pm 6,7**	43 \pm 4,6##
	Крупные / Large	40 \pm 5,9	5 \pm 1,6***. ##	24 \pm 3,6*. ##

Примечание. Статистическая значимость различий рассчитана по t-критерию Стьюдента.

* $p < 0,05$ по сравнению с состоянием покоя. ** $p < 0,01$ по сравнению с состоянием покоя. *** $p < 0,001$ по сравнению с состоянием покоя. # $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем. ## $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим контролем. ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующим контролем.

Note. Significance was calculated using Student's t-test.

* $p < 0,05$ compared with rest. ** $p < 0,01$ compared with rest. *** $p < 0,001$ compared with rest. # $p < 0,05$ compared with corresponding control. ## $p < 0,01$ compared with corresponding control. ### $p < 0,001$ compared with corresponding control.

катехоламинов оказалось равным 117 \pm 8,4 шт., что ниже контрольного на 20% ($p < 0,1$). Такое сокращение общего числа гранул определялось уменьшением количества малых гранул на 35% и средних на 29,2%, число крупных гранул не изменилось.

Введение блокатора β -адренорецепторов крысам со стимуляцией НАС привело к снижению числа гранул катехоламинов на эритроцитах в 2,1 раза, или до 54 \pm 16,1 ($p < 0,01$). Особенно резко сократилось число крупных гранул (в 8 раз, $p < 0,001$), число гранул средних размеров снизилось в 2 раза ($p < 0,01$), и только количество мелких гранул почти не изменилось. Поэтому в мазках преобладали гранулы малых и средних размеров (табл. 3, рис. 5).

После перенесённого стресса число гранул катехоламинов на эритроцитах у крыс со стимуляцией НАС выросло всего на 20 шт., или на 17%. Прирост определялся увеличением количества малых гранул на 170% ($p < 0,05$). Число гранул средних и крупных размеров, напротив, сократилось по сравнению с состоянием покоя на 15 и 40% соответственно. Именно из-за разнонаправленного изменения числа гранул разных размеров стресс-индуцированный прирост их общего количества на фоне активации НАС оказался небольшим, а фактическая величина на 48% ниже ($p < 0,01$), чем в соответствующей контрольной серии. Количество гранул каждого размерного ряда у животных с активацией НАС было меньше контрольного: малых на 43% ($p < 0,05$), средних на 53% и крупных на 50% ($p < 0,01$, рис. 6).

Очевидно, в условиях острого стресса различия между серией со стимуляцией НАС и контролем стали существеннее как по степени прироста, так по абсолютным величинам числа гранул катехоламинов на эритроцитах. Снижение связывания катехоламинов на эритроцитах

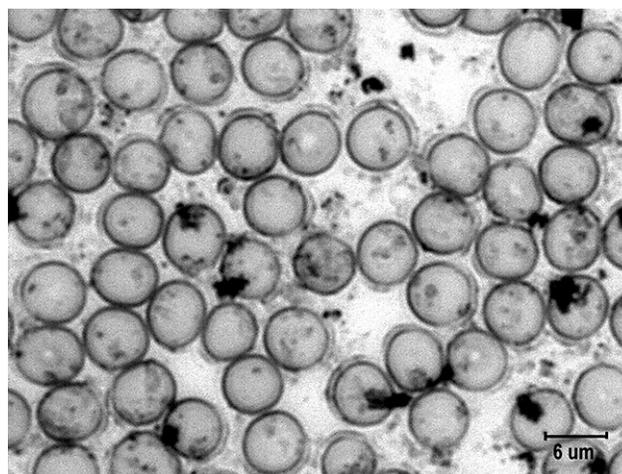


Рис. 5. Гранулы катехоламинов на поверхности эритроцитов в мазках крови крыс при блокаде β -адренорецепторов на фоне стимуляции норадренергической системы. Импрегнация азотно-кислым серебром с докраской эозином. Ув. $\times 4000$.

Fig. 5. Granules of catecholamines on the surface of erythrocytes in the blood smears of rats with blockade of β -adrenergic receptors during the stimulation of the noradrenergic system. Impregnation with silver nitrate and final staining with eosin. Magnification, $\times 4000$.

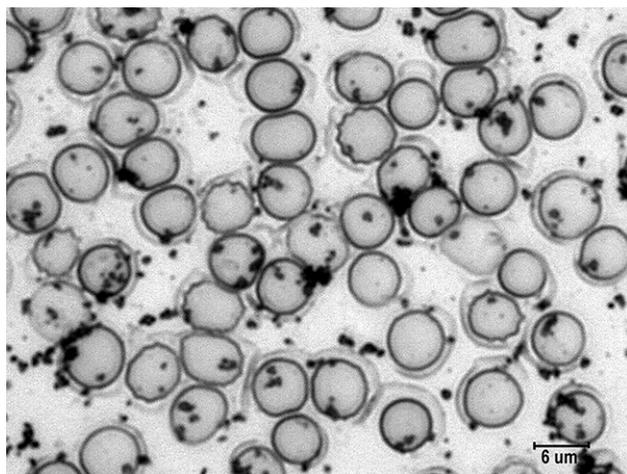


Рис. 6. Гранулы катехоламинов на поверхности эритроцитов в мазках крови крыс при остром стрессе на фоне стимуляции норадренергической системы. Импрегнация азотнокислым серебром с докраской эозином. Ув. $\times 4000$.

Fig. 6. Granules of catecholamines on the surface of erythrocytes in the blood smears of rats under acute stress during the stimulation of the noradrenergic system. Impregnation with silver nitrate and final staining with eosin. Magnification, $\times 4000$.

может свидетельствовать о перестройке их рецепции в результате стимуляции НАС.

Необходимо отметить, что в ходе исследований, наряду с определением числа гранул катехоламинов на эритроцитах, у животных с активацией и блокадой адренергических механизмов регистрировали ЧСС. Анализ выявил чёткую корреляцию между числом гранул и ЧСС в условиях экспериментальных воздействий: $r=0,41$, $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Переходя к обсуждению полученных данных, необходимо ещё раз отметить, что возможность связывания катехоламинов эритроцитами показана рядом авторов, которые с помощью различных методов доказали наличие адренорецепторов на мембране эритроцитов и обнаружили изменение свойств эритроцитов под влиянием катехоламинов [1, 3–8, 12, 14].

Авторы метода, использованного нами в работе [1], доказали увеличение количества гранул на эритроцитах после введения в организм адреналина в различных дозах. В этой, а также других работах [12] показано разнообразие гранул катехоламинов по размерам, а фактические величины гранул достигают 2 мкм, что согласуется с нашими данными. По нашим собственным наблюдениям у крыс в состоянии спокойного бодрствования количество гранул катехоламинов на эритроцитах невелико и достигает примерно 150 шт. на 40 эритроцитов. В большинстве своём это гранулы средних размеров, гранулы малых и крупных размеров обнаруживаются почти вдвое реже.

После введения β -адреноблокатора число гранул ожидаемо снизилось более чем в два раза, особенно сократилось число гранул среднего и крупного пула. Это подтверждает связь гранул на эритроцитах с β -адренорецепторами их мембран и свидетельствует об адренергической природе гранул. Очевидно, что рецепторные молекулы, вступив во взаимодействие с анаприлином, оказались неспособными связывать естественные лиганды катехоламины, что привело к быстрому снижению числа гранул на эритроцитах.

В свою очередь, при стрессе число гранул катехоламинов на эритроцитах выросло почти в два раза, что также свидетельствует в пользу адренергической природы гранул. Важно отметить, что этот рост происходил за счёт резкого увеличения количества мелких гранул, в то время как число средних и крупных гранул изменилось мало. С учётом данных [1, 12] полагаем, что прирост числа мелких гранул при стрессе может являться признаком сенситизации мембран эритроцитов (а также клеток других тканей) к катехоламинам. Возможный механизм сенситизации в этом случае — встраивание в мембраны рецепторных молекул, которые могут находиться в плазме крови в свободной форме [2], не исключены и другие механизмы.

Важно отметить, что:

- 1) самым мобильным является пул мелких гранул катехоламинов, численность которых изменяется при блокаде β -адренорецепторов и особенно при остром стрессе;
- 2) пулы крупных и средних гранул при воздействии на адренергические механизмы относительно стабильны, в большей степени число крупных гранул изменяется при блокаде β -адренорецепторов, чем в условиях острого стресса.

С учётом выявленных закономерностей и данных литературы [1] можно предположить, что мелкие гранулы и изменение их количества отражает специфическое связывание катехоламинов на эритроцитах с последующим проведением адренергических сигналов к белкам цитоскелета, прочность связей между которыми очень важна для функционирования эритроцитов [6, 10]. Крупные гранулы скорее всего являются результатом неспецифического связывания катехоламинов для осуществления их транспорта [10].

Стимуляция НАС способна вызвать повышение обмена катехоламинов в организме [9, 15] с возможным изменением их рецепции клетками. Несмотря на то что подобные перестройки в организме — тонкий и сложный процесс, посредством применения цитологического метода обнаружено небольшое (порядка 20%) снижение числа гранул на эритроцитах в результате стимуляции НАС. Это снижение произошло за счёт уменьшения количества гранул малого и среднего размера. Считаем, что с помощью цитологического метода удалось выявить изменения в связывании катехоламинов эритроцитами, обусловленные развитием десенситизации адренорецепторов в ответ

на повышение концентрации катехоламинов в крови при стимуляции НАС. Непосредственный механизм десенситизации адренорецепторов может реализовываться за счёт интернализации молекулы вглубь мембраны или под неё [9], либо «сбрасывания» рецепторных молекул, которые могут находиться в плазме крови в свободной форме и затем встраиваться в мембраны других клеток [2]. Факт изменения рецепции катехоламинов эритроцитами в серии со стимуляцией НАС подтверждается тем, что, наряду со снижением числа гранул, у этих животных происходит повышение адренореактивности эритроцитов [14].

Эксперименты с введением β -адреноблокатора показали, что на фоне активации НАС число гранул катехоламинов на эритроцитах достигает ещё меньших значений, чем в контрольной серии за счёт сокращения числа крупных гранул. Пул малых гранул не изменяется, возможно, это отражает некую стабилизацию специфического связывания катехоламинов, минимально необходимого для нормального функционирования эритроцитов.

В условиях острого стресса у крыс со стимуляцией НАС общее число гранул катехоламинов увеличилось незначительно, что подтверждает предположение о десенситизации мембран эритроцитов к катехоламинам. Тем не менее число мелких гранул, пусть и в меньшей мере, но увеличилось, следовательно, способность связывать катехоламины в ситуации стрессогенного нарастания их концентрации сохранилась, предположительно, за счёт мобильного пула адренорецепторов [2]. Причины снижения количества крупных и средних гранул на эритроцитах в этой серии требуют дополнительного изучения. Но в целом уменьшение числа гранул на эритроцитах при хронической стимуляции НАС свидетельствует о развитии десенситизации адренорецепторов, т.е. демонстрирует возможность достаточно быстрой перестройки рецепторного аппарата эритроцитов в ответ на изменения активности адренергического канала регуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Число гранул катехоламинов на эритроцитах интактных животных в среднем составляет 145–155 шт. на 40 эритроцитов, при этом чаще встречаются гранулы средних размеров (0,6–0,9 мкм), малые (0,3–0,6 мкм) и крупные (0,9–2 мкм) обнаруживаются реже. В результате введения блокатора β -адренорецепторов число гранул катехоламинов на эритроцитах снижается более чем в 2 раза, а при моделировании острого стресса повышается почти вдвое. Блокада β -адренорецепторов в большей степени снижает число крупных и средних гранул,

а в условиях острого стресса значительно повышается количество мелких гранул, что может отражать специфичность связывания катехоламинов на эритроцитах. Активация НАС потенцирует небольшое (до 20%) снижение числа гранул катехоламинов преимущественно малых размеров, на эритроцитах, что может рассматриваться как признак развития десенситизации адренорецепторов. В свою очередь, меньшая степень сдвигов и низкое количество гранул при блокаде β -адренорецепторов и остром стрессе подтверждают факт развития десенситизации мембран эритроцитов к катехоламинам на фоне стимуляции НАС. Характер и направленность изменений числа гранул катехоламинов, согласующиеся с представлениями об эффектах активации и блокады адренергических структур, подтверждают, что цитологический метод с импрегнацией достаточно чувствителен и позволяет проследить динамику связывания катехоламинов эритроцитами при различных состояниях организма и его регуляторного аппарата.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFO

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: концепция и дизайн исследования — Е.В. Курьянова; сбор и обработка материала — А.В. Трясучев; статистическая обработка данных — Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев; анализ и интерпретация данных — Е.В. Курьянова, Д.Л. Тёпый; написание текста — Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Author contribution. All authors confirm the compliance of their authorship, according to international ICMJE criteria (all authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published). The concept and design of the study — E.V. Kuryanova; collection and processing of material — A.V. Tryasuchev; statistical data processing — E.V. Kuryanova, A.V. Tryasuchev; data analysis and interpretation — E.V. Kuryanova, D.L. Teply; writing the text — E.V. Kuryanova, A.V. Tryasuchev.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент СССР на изобретение № 1730555/ 03.07.1989. Бюл. №16. Астафьева О.Г., Вилкова Е.Е. Способ цитологического определения катехоламинов в эритроцитах. Режим доступа: https://yandex.ru/patents/doc/SU1730555A1_19920430. Дата обращения: 21.09.2022.
2. Дворянский С.А., Циркин В.И. Развитие представлений об эндогенных модуляторах β -адрено- и М-холинореактивности // Вятский медицинский вестник. 2003. № 4. С. 23–27.
3. Манухин Б.Н., Смурова Е.А., Нестерова Л.А. Закономерности связывания 3H-пропранолола β -адренорецепторами эритроцитов крыс // Доклады Академии Наук. 1993. Т. 332, № 3. С. 388–390.
4. Adderley S.P., Sridharan M., Bowles E.A., et al. Protein kinases A and C regulate receptor-mediated increases in cAMP in rabbit erythrocytes // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010. Vol. 298, N 2. P. H587–593. doi: 10.1152/ajpheart.00975.2009
5. Hines P.C., Zen Q., Burney S.N., et al. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion // *Blood*. 2003. Vol. 101, N 8. P. 3281–3287. doi: 10.1182/blood-2001-12-0289
6. Skorkina M.Yu. Physiological features of blood's system of frogs *Rana Ridibunda Pall.* In: Lambert H. (editor). *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Ecological Implications*. New York: Nova, 2014. P. 137–178.
7. Peng W., Ding F., Peng Y.K., Xie Y. Biological effects of α -adrenergic phentolamine on erythrocyte hemeprotein: Molecular insights from biorecognition behavior, protein dynamics and flexibility // *J Photochem Photobiol B*. 2017. Vol. 171. P. 75–84. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.035
8. Zambrano P., Suwalsky M., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K. α 1-and β -adrenergic antagonist labetalol induces morphological changes in human erythrocytes // *Biochem Biophys Res Commun*. 2018. Vol. 503, N 1. P. 209–214. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.004
9. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. *Basic and Clinical Pharmacology*. McGraw-Hill Companies, 2012. 1245 p.
10. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г. Структурно-функциональная характеристика мембран эритроцита и ее изменение при патологиях разного генеза // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 3. С. 334–354.
11. Yeow N., Tabor R.F., Garnier G. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology // *Adv Colloid Interface Sci*. 2017. Vol. 249. P. 149–162. doi: 10.1016/j.cis.2017.05.011
12. Зиновьев С.В., Целуйко С.С. Цитохимическая характеристика эритроцитов при экспериментальном антиортоstaticком вывешивании крыс // Амурский медицинский журнал. 2017. № 2 (18). С. 54–57. doi: 10.22448/AMJ.2017.2.54-57
13. Girish V., Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ // *Indian J Cancer*. 2004. Vol. 41, N 1. P. 47.
14. Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Тёплый Д.Л. Особенности стресс-индуцированных изменений сердечного ритма, адренореактивности эритроцитов и свободнорадикальных процессов в крови на фоне стимуляции центральных нейромедиаторных систем // Сибирский научный медицинский журнал. 2017. Т. 37, № 1. С. 11–20.
15. Spasojević N., Gavrilović L., Dronjak S. Different behavioral effects of maprotiline and fluxilan in rats // *Arch Biol Sci*. 2008. Vol. 60, N 1. P. 33–39. doi: 10.2298/ABS0801033S

REFERENCES

1. Patent SU №1730555/ 03.07.1989. Byul. №34. Astafieva OG, Vilkova EE. Sposob tsitologicheskogo opredeleniya katekholaminov v eritrotsitakh. Available from: https://yandex.ru/patents/doc/SU1730555A1_19920430 (In Russ).
2. Dvoryanskiy SA, Tsirkin VI. The development of ideas about endogenous modulators of β -adrenoi M-cholinergic reactivity. *Vyatka Medical Bulletin*. 2003;(4):23–27. (In Russ).
3. Manukhin BN, Smurova EA, Nesterova LA. Patterns of 3H-propranolol binding by rat erythrocyte β -adrenergic receptors. *Reports of the Academy of Sciences*. 1993;332(3):388–390. (In Russ).
4. Adderley SP, Sridharan M, Bowles EA, et al. Protein kinases A and C regulate receptor-mediated increases in cAMP in rabbit erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(2):H587–593. doi: 10.1152/ajpheart.00975.2009
5. Hines PC, Zen Q, Burney SN, et al. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood*. 2003;101(8):3281–3287. doi: 10.1182/blood-2001-12-0289
6. Skorkina MYu. Physiological features of blood's system of frogs *Rana Ridibunda Pall.* In: Lambert H. (editor). *Frogs: Genetic Diversity, Neural Development and Ecological Implications*. New York: Nova; 2014. P:137–178.
7. Peng W, Ding F, Peng YK, Xie Y. Biological effects of α -adrenergic phentolamine on erythrocyte hemeprotein: Molecular insights from biorecognition behavior, protein dynamics and flexibility. *J Photochem Photobiol B*. 2017;171:75–84. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.035
8. Zambrano P, Suwalsky M, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. α 1-and β -adrenergic antagonist labetalol induces morphological changes in human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(1):209–214. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.004
9. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic and Clinical Pharmacology*. McGraw-Hill Companies; 2012. 1245 p.
10. Borovskaya MK, Kuznetsova EE, Gorohova VG. Structural and functional characteristics of erythrocyte membranes and its change in pathologies of different genesis. *Bulletin of VSNC SO RAMN*. 2010;(3):334–354. (In Russ).
11. Yeow N, Tabor RF, Garnier G. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017;249:149–162. doi: 10.1016/j.cis.2017.05.011
12. Zinoviev SV, Tseluiko SS. Cytochemical characteristics of red blood cells in experimental anti-orthostatic rats. *Amur Medical Journal*. 2017;(2):54–57. (In Russ). doi: 10.22448/AMJ.2017.2.54-57
13. Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*. 2004;41(1):47.
14. Kuryanova EV, Tryasuchev AV, Stupin VO, Teply DL. Features of stress-induced changes in heart rhythm, red blood cell adrenoreactivity and free radical processes in the blood during stimulation of central neurotransmitter systems. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2017;37(1):11–20. (In Russ).
15. Spasojević N, Gavrilović L., Dronjak S. Different behavioral effects of maprotiline and fluxilan in rats. *Arch Biol Sci*. 2008;60(1):33–39. doi: 10.2298/ABS0801033S

ОБ АВТОРАХ

* **Курьянова Евгения Владимировна**, д.б.н., профессор;
адрес: 414056, Россия, г. Астрахань, ул. Татищева, д. 20а;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9388-5618>;
elibrary SPIN: 2782-7749; e-mail: fyzevk@rambler.ru

Трясучев Андрей Валерьевич, к.б.н., доцент;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2850-0950>;
elibrary SPIN: 1545-2475; e-mail: tryandval@mail.ru

Тёплый Давид Львович, д.б.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5764-6940>;
elibrary SPIN: 4875-6106; e-mail: fyzevk@rambler.ru

AUTHOR INFO

* **Evgeniya V. Kuryanova**, Dr. Sci. (Biol.), Professor;
address: 20a, Tatishchev St., Astrakhan, 414056, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9388-5618>;
elibrary SPIN: 2782-7749; e-mail: fyzevk@rambler.ru

Andrey V. Tryasuchev, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2850-0950>;
elibrary SPIN: 1545-2475; e-mail: tryandval@mail.ru

David L. Teply, Dr. Sci. (Biol.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5764-6940>;
elibrary SPIN: 4875-6106; e-mail: fyzevk@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author