

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ АДРЕНАЛИНА

Касяник М.Л.<sup>1</sup>, Пахрова О.А.<sup>1</sup>, Демидов В.И.<sup>1</sup>, Иванова А.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, e-mail: kasyanikmaks@mail.ru

Адреналин относится к стресс-реализующим гормонам, его важнейшим эффектом является интенсификация работы органов и систем организма для оптимального ответа на стрессор. Усиление функционирования органов повышает их потребность в кислороде. Цель работы – провести оценку морфологических и функциональных изменений кислородтранспортной системы (сердце, легкие, эритроциты) в динамике гиперкатехоламинемии у крыс. При оценке миокарда обращали внимание на состояние кровообращения, степень альтерации кардиомиоцитов, наличие признаков асептического воспаления. При оценке легочной ткани оценивали просвет и уровень секреции в бронхах, признаки расстройства кровообращения в легких. При исследовании состояния эритроцитарной системы определяли концентрацию эритроцитов, гемоглобина, оценивали поверхностную цитоархитектонику красных клеток крови, определяли агрегационную способность эритроцитов и их деформируемость. В 1-й час эксперимента возникают признаки ишемии в сердце, нарушаются вентиляция и кровообращение в легких, возрастает агрегационная способность эритроцитов. Компенсаторные механизмы в этот период – повышение кислородной емкости крови и увеличение деформируемости эритроцитов. Через 24 часа после введения адреналина прогрессируют патогистологические изменения в легких и сердце, нарушения агрегационной способности эритроцитов при сохранении повышенной деформируемости красных клеток крови. Через 72 часа на фоне сохранения относительно стабильных изменений в сердечной мышце усиливаются нарушения в легких, агрегационная способность эритроцитов возвращается к нормальным значениям, однако поверхностная цитоархитектоника красных клеток крови существенно нарушается при сохранении их повышенной деформируемости.

Ключевые слова: адреналин, эритроциты, миокард, легкие, агрегация эритроцитов.

## DYNAMICS OF CHANGES IN THE OXYGEN TRANSPORT SYSTEM WHITE RATS UNDER THE INFLUENCE OF ADRENALINE

Kasyanik M.L.<sup>1</sup>, Pakhrova O.A.<sup>1</sup>, Demidov V.I.<sup>1</sup>, Ivanova A.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBEI HE «Ivanovo State Medical Academy» Ministry of Health of Russia, Ivanovo, e-mail: kasyanikmaks@mail.ru

Adrenaline refers to stress-implementing hormones, the most important effect of which is the intensification of the work of organs and systems of the body for an optimal response to a stressor. Strengthening the functioning of organs increases their oxygen demand. The aim of the work is to evaluate morphological and functional changes in the oxygen transport system (heart, lungs, erythrocytes) in the dynamics of hypercatecholaminemia in rats. When assessing the myocardium, attention was paid to the state of blood circulation, the degree of cardiomyocyte alteration, the presence of signs of aseptic inflammation. When assessing the lung tissue, the lumen and the level of secretion in the bronchi, signs of circulatory disorders in the lungs were evaluated. When studying the state of the erythrocyte system, the concentration of erythrocytes and hemoglobin was determined, the surface cytoarchitectonics of red blood cells was evaluated, the aggregation ability of erythrocytes and their deformability were determined. In the 1st hour of the experiment, there are signs of ischemia in the heart, ventilation and blood circulation in the lungs are disrupted, the aggregation ability of red blood cells increases. Compensatory mechanisms during this period are an increase in the oxygen capacity of the blood and an increase in the deformability of red blood cells. 24 hours after the introduction of adrenaline, pathohistological changes in the lungs and heart progress, violations of the aggregation ability of red blood cells while maintaining increased deformability of red blood cells. After 72 hours, while maintaining relatively stable changes in the heart muscle, disturbances in the lungs increase, the aggregation ability of red blood cells returns to normal values, however, the surface cytoarchitectonics of red blood cells is significantly impaired while maintaining their increased deformability.

Keywords: adrenaline, erythrocytes, myocardium, lungs, aggregation of erythrocytes.

Адреналин относится к стресс-реализующим гормонам, его важнейшим эффектом является интенсификация работы органов и систем организма для оптимального ответа на стрессор. Усиление функционирования органов повышает их потребность в кислороде, поэтому задача катехоламинов также заключается в обеспечении этой потребности. Доставка кислорода связана с работой функциональной системы транспорта кислорода. В нее включены сердечно-сосудистая, дыхательная и эритроцитарная системы. В доступных источниках информации имеются сведения о влиянии катехоламинов на каждый компонент данной системы в отдельности. Наше исследование направлено на комплексную оценку кислородтранспортной системы в условиях гиперкатехоламинемии.

Цель работы – провести оценку морфологических и функциональных изменений кислородтранспортной системы в динамике гиперкатехоламинемии у белых крыс.

**Материал и методы исследования.** Исследование проводилось на 32 белых нелинейных крысах-самцах массой 240–280 г в зимнее время. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Все работы с крысами проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и приказом Минздрава РФ, были одобрены локальным Этическим комитетом Академии. Гиперкатехоламинемию воспроизводили путем однократного введения адреналина гидрохлорида (эпинефрина – Московский эндокринный завод, Россия) подкожно в дозе 2 мг/кг массы [1]. Далее через 1 час (8 крыс), 24 часа (8 крыс), 72 часа (8 крыс) проводили оценку морфологических и функциональных изменений кислородтранспортной системы. Также было использовано 8 животных для получения контрольных значений. У крыс под золептиловым наркозом проводился забор крови из левого желудочка в пробирку с цитратом натрия для оценки состояния эритроцитарной системы, затем извлекались сердце и легкие для патоморфологического и патогистологического исследования.

Сердце и легкие извлекались целиком для фиксации в 10%-ном нейтральном формалине. Далее фрагменты тканей обезвоживали с помощью 99%-ного изопропилового спирта и заливали парафином. На санном микротоме «Microtom» (Россия) выполняли срезы толщиной 5–6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. При оценке миокарда обращали внимание на состояние кровообращения, степень альтерации кардиомиоцитов, наличие признаков асептического воспаления. При исследовании легочной ткани оценивали просвет и уровень секреции в бронхах, признаки расстройства кровообращения в легких.

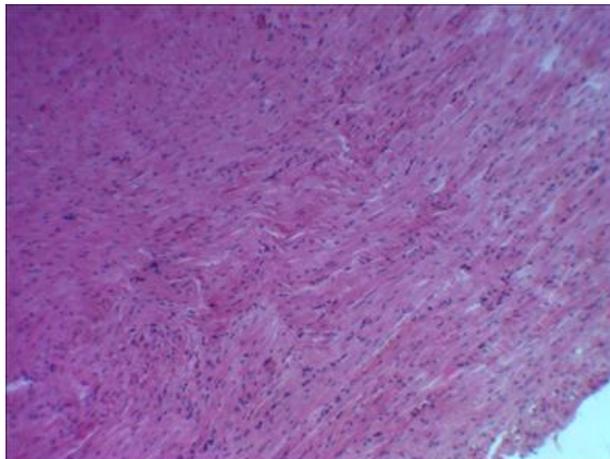
При оценке состояния эритроцитарной системы определяли концентрацию эритроцитов, гемоглобина, поверхностную цитоархитектонику красных клеток крови, агрегационную способность эритроцитов и их деформируемость. Содержание эритроцитов и гемоглобина определяли унифицированными методами. Поверхностную цитоархитектонику оценивали с использованием фазово-контрастного устройства после фиксации эритроцитов

1%-ным раствором глутарового альдегида (Sigma) на среде 199. Подсчитывали относительное количество измененных эритроцитов по классификации Г.И. Козинца (1984). Выделяли дискоциты – эритроциты правильной формы (1-й класс), эритроциты с 1 выростом (2-й класс), «гребнем» (3-й класс), клетки с множественными выростами (4-й класс), в форме тутовой ягоды (5-й класс), стоматоциты (6-й класс), сфероциты (7-й класс), сфероэхиноциты (8-й класс), эритроциты в форме спущенного мяча (9-й класс) и дегенеративно измененные формы (10-й класс). Красные клетки крови 2–5-го класса относили к обратимо измененным, остальные классы – к необратимо измененным. Подсчет осуществлялся в препарате «раздавленная капля» на 200 эритроцитов под увеличением  $\times 900$ . Микрореологический показатель – агрегацию эритроцитов, который характеризует движение крови в микрососудах, – оценивали автоматическим агрегометром эритроцитов МА1 («Myrenne», Германия). При этом агрегационная способность красных клеток крови определялась через 5 и 10 секунд после остановки (M(5) и M(10)) и на низкой скорости сдвига  $3 \text{ с}^{-1}$  (M1(5) и M1(10)). Для оценки деформируемости эритроцитов – также важного микрореологического показателя – использовали автоматический прибор ИДА-4 и поликарбонатные трековые мембраны Nemafil («Whatman», Германия) с диаметром пор 3 мкм. Определяли начальную скорость свободного протекания эритроцитарной суспензии под действием силы 60 мм водного столба. По этой методике показателем деформируемости красных клеток крови является индекс ригидности, который рассчитывали по следующей формуле:  $IP = (ts - tb) \times (100) / (tb \times \Gamma_t)$ , где  $tb$  – время, за которое 250 мкл ресуспендирующего раствора проходит через фильтр;  $ts$  – время, за которое проходит 250 мкл суспензии эритроцитов через этот же фильтр;  $\Gamma_t$  – показатель гематокрита.

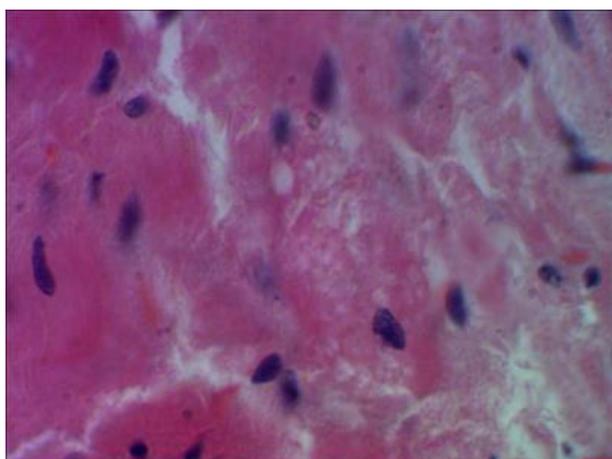
Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы STATISTIKA-6,0 (StatSoft, Inc.). Так как полученные результаты не подчинялись нормальному распределению, их сравнение осуществляли с помощью критериев Манна–Уитни и Колмогорова–Смирнова. Достоверными считали отличия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Через 1 час после введения адреналина в сердце патогистологически можно увидеть признаки спазма интрамуральных артерий, в капиллярах – усиленную агрегацию эритроцитов, а также явление краевого стояния лейкоцитов и лейкодиapedез. При этом в зоне межжелудочковой перегородки и в субэндокардиальных отделах отмечаются волнообразная деформация, очаги фрагментации кардиомиоцитов, а при большом увеличении – вакуольная дистрофия сократительных волокон (рис. 1, 2). В легочной ткани – признаки венозной гиперемии, бронхи спазмированы, секреция слизи в них повышена.

Со стороны эритроцитарной системы отмечается повышение кислородной емкости крови: возрастает концентрация эритроцитов на 34% и гемоглобина на 22% (таблица).



*Рис. 1. Волнообразная деформация кардиомиоцитов. Ув. x120*



*Рис. 2. Вакуолизация цитоплазмы кардиомиоцита. Ув. x1200*

Одновременно меняется поверхностная цитоархитектоника: статистически значимо снижается процент клеток с множественными выростами – на 60%. При оценке агрегации эритроцитов в этот период эксперимента наблюдается увеличение показателей М(5), М(10), М1(10) на 78%, 105% и 45% соответственно, то есть данный процесс интенсифицируется. Однако деформируемость эритроцитов меняется в положительную сторону – она возрастает, ригидность мембран снижается на 35% (таблица).

Изменения в сердечной мышце в этот период наблюдения можно объяснить чрезмерной интенсификацией силы и частоты сокращений, преимущественно за счет частоты. При этом укорачиваются диастола и время питания сердца, следовательно, возникает некоронарогенная ишемия миокарда. Спазм сосудов может быть связан как с избыточным накоплением свободнорадикальных продуктов, так и с возникновением эндотелиальной

дисфункции в условиях избытка катехоламинов [2, 3]. Нарушения в легких могут быть, с одной стороны, результатом острой левожелудочковой сердечной недостаточности, с другой – последствием развития респираторного дистресс-синдрома на фоне эндотоксемии [4]. Повышение агрегации эритроцитов может быть связано с активацией  $\alpha$ -адренорецепторов красных клеток крови [5]. При этом меняются эффективный отрицательный заряд их мембран, предотвращающий избыточную агрегацию, а также работа натрий-калиевой АТФ-азы, что дополнительно усиливает межклеточное взаимодействие. Наши результаты совпадают с данными об инкубации эритроцитов с адреналином *in vitro*. Повышение деформируемости может быть связано с активацией  $\beta$ -адренорецепторов эритроцитарных мембран, которые повышают ее текучесть через стимуляцию аденилатциклазы. Развитие эритроцитоза носит рефлекторный характер и связано с выходом крови из депо, так же как и уменьшение обратимо деформированных эритроцитов. При этом механическое воздействие сердечно-сосудистой системы на них было минимальным.

#### Изменения эритроцитарной системы крыс при гиперкатехоламинемии (Ме (Q1;Q3))

Показатели	Контроль	1 час	24 часа	72 часа
Концентрация эритроцитов, Т/л	5,45 (5,10; 5,81)	6,75* (6,46; 7,45)	5,89# (5,61; 6,35)	5,58 (5,06; 6,39)
Концентрация гемоглобина, Т/л	114,0 (104,5; 120,3)	128,0* (113,5; 149,8)	115,0# (109,8; 119,0)	110,0 (106,8; 113,5)
Содержание дискоцитов, %	76,5 (70,0; 85,5)	85,0 (78,0; 93,0)	59,5# (57,8; 80,8)	46,0* (34,3; 62,8)
Обратимо деформированные эритроциты, %	19,0 (12,8; 27,3)	12,0 (6,75; 28,5)	37,0 (13,8; 39,5)	49,0* (36,3; 59,0)
Необратимо деформированные эритроцитов, %	2,50 (1,75; 3,25)	1,00 (1,00; 2,50)	2,50 (1,00; 3,75)	6,50*# (5,50; 7,25)
M(5), усл. ед.	1,17 (0,50; 2,20)	2,33* (1,80; 3,83)	3,68*# (3,32; 4,56)	1,97# (0,50; 2,00)
M(10), усл. ед.	4,25 (0,50; 5,60)	7,13* (4,53; 11,2)	12,4*# (6,80; 15,9)	4,87# (0,50; 6,07)
M1(5), усл. ед.	3,70 (2,83; 6,23)	6,83 (6,33; 7,50)	8,57* (6,76; 9,37)	5,40# (4,93; 5,87)

M1(10), усл. ед.	7,94 (5,30; 17,3)	17,7* (13,9; 18,8)	21,2* (14,3; 24,7)	13,3# (12,9; 15,0)
Индекс ригидности, усл. ед.	68,3 (58,4; 75,2)	37,3* (31,4; 53,3)	39,9* (36,4; 58,8)	47,7 (43,8; 48,0)

Примечание: \* – достоверные отличия от исходных значений, # – достоверные отличия от предыдущего срока наблюдения ( $p < 0,05$ ).

Через 24 часа после введения адреналина выявляются участки фокального некроза кардиомиоцитов с появлением в этой зоне лейкоцитарной инфильтрации. В микрососудах наблюдаются признаки гемостаза и венозной гиперемии. В ткани легких выявлено острое полнокровие на фоне интерстициального отека (рис. 3).

Со стороны эритроцитарной системы также отмечаются существенные изменения. Концентрация эритроцитов и гемоглобина статистически значимо снижается относительно предыдущего срока наблюдения, возвращаясь к значениям контроля. Со стороны поверхностной цитоархитектоники возникают изменения в содержании дискоцитов по сравнению с 1-м часом эксперимента: их процент снижается почти на треть (таблица). Агрегация эритроцитов еще больше усиливается. Относительно контроля показатель M(5) возрастает на 196%, относительно 1-го часа – на 66%, M(10) – на 253% и 73% соответственно, M1(5) статистически значимо повышается только по сравнению с контрольными значениями на 73%, M1(10) также выше контроля на 89%. Деформируемость красных клеток крови сохраняется повышенной относительно контрольных значений (таблица).

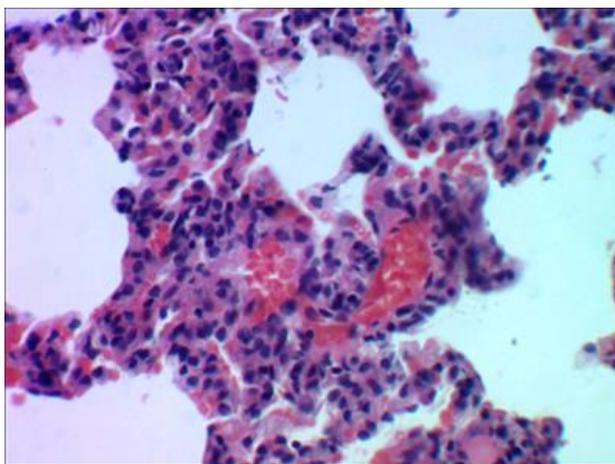
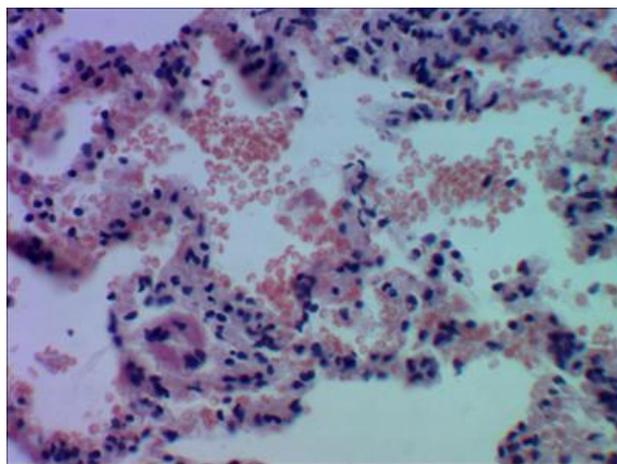


Рис. 3. Полнокровие, отек межальвеолярных перегородок. Ув. x480



*Рис. 4. Диapedез эритроцитов в просветы альвеол. Ув. x480*

Полученные результаты показывают сохранение нарушений кислородтранспортной системы через 24 часа после введения адреналина. Отмечаются патоморфологические изменения как в сердечной ткани, так и в легочной. В литературе описывается обратимость катехоламиновых инфарктов, но в нашем эксперименте изменения миокарда носят хоть и мелкоочаговый, но необратимый характер. Это отрицательным образом сказывается на кровообращении легких, вызывая в них венозную застой. Одновременно возникающая эндотоксемия приводит к усиленному пропотеванию жидкости из сосудов в интерстиций, формируя признаки интерстициального отека легких. Нормализация количественных показателей эритроцитарной системы происходит как в результате возвращения красных клеток крови в депо, так и усиления элиминации поврежденных клеток. Изменение агрегационных свойств эритроцитов можно объяснить сохраняющейся активацией  $\alpha$ -адренорецепторов эритроцитов, вероятно, за счет увеличения образования эндогенных катехоламинов. Увеличение деформируемости отражает влияние катехоламинов на  $\beta$ -адренорецепторы. Изменение citoархитектоники может быть связано с интенсификацией движения крови и более активным повреждением мембран эритроцитов, а также изменением водно-электролитного баланса в условиях действия стресс-реализующих гормонов.

Через 72 часа патогистологическое исследование сердца выявляет сохраняющийся отек стромы. В зонах, где возник фокальный некроз кардиомиоцитов, отмечаются явления плазморексиса и кариолизиса на фоне отчетливых признаков воспалительно-клеточной реакции. В неповрежденных участках желудочков сердца кардиомиоциты сохраняют поперечную исчерченность с местами волнистой деформации. В ткани легких сохраняются признаки венозного застоя, повышенной проницаемости сосудов с пропотеванием жидкой части крови и форменных элементов в просвет альвеол (рис. 4).

Со стороны эритроцитарной системы количественные изменения отсутствуют: содержание красных клеток крови и гемоглобина не меняется. Однако поверхностная цитоархитектоника еще сильнее нарушается: возрастает процент клеток 10-го класса на 222% и соответственно необратимо деформированных эритроцитов в 2 раза по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. По сравнению с контролем снижено число дискоцитов на 37%, увеличено количество обратимо деформированных эритроцитов на 123% и необратимо деформированных на 129% (таблица). Показатели агрегации красных клеток крови снижаются относительно предыдущего срока наблюдения: M(5) на 65%, M(10) на 62%, M1(5) на 31%, M1(10) на 32% и не отличаются от контрольных значений (таблица).

По результатам патогистологического исследования локальные изменения в сердце в этот период наблюдения сохраняются, что, вероятно, сказывается на сократительной функции левого желудочка. В легких на фоне продолжительного венозного застоя возникает асептическое воспаление, нарастает эндотоксемия, которая приводит к пропотеванию жидкости уже в полость альвеол и формированию альвеолярного отека легких. Изменения поверхностной цитоархитектоники можно объяснить активным механическим воздействием на эритроциты в начале эксперимента, нарушения их мембран сохраняются и прогрессируют. Нормализация агрегационной способности эритроцитов в этот период наблюдения связана со снижением активности стресс-реализующих механизмов и, следовательно, активации адренорецепторов эритроцитов. Однако деформируемость их мембран остается выше значений контроля, что может быть отражением цитопротекторного влияния стресс-лимитирующей системы. Также, по данным нашего предыдущего исследования, в этот период повышается концентрация оксида азота в крови, который положительно влияет на микрореологические показатели [1, 6].

Таким образом, гиперкатехоламинемия отрицательно влияет на функционирование всех компонентов кислородтранспортной системы. В 1-й час эксперимента возникают признаки ишемии в сердце, нарушаются вентиляция и кровообращение в легких, возрастает агрегационная способность эритроцитов. Компенсаторные механизмы в этот период – развитие эритроцитоза и деформируемости эритроцитов. Через 24 часа после введения адреналина прогрессируют нарушения в легких и сердце, а также агрегационной способности эритроцитов при сохранении повышенной деформируемости красных клеток крови. Через 72 часа в легких усиливаются нарушения, агрегационная способность эритроцитов возвращается к норме, однако их поверхностная цитоархитектоника существенно нарушается при сохранении повышенной деформируемости.

## Список литературы

1. Ivanova A.S., Sitnikova O.G., Popova I.G., Nazarov S.B. Concentrations of Gaseous Transmitters during Catecholamine Damage to the Myocardium in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018. vol. 165. no. 6. P. 725–727. DOI: 10.1007/s10517-018-4251-2.
2. Хидирова Л.Д. Изменение баланса между активностью перекисного окисления липидов, антиоксидантной защитой и содержанием железа у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2010. Т. 6. № 2. С. 216–219. DOI: 10.20996/1819-6446-2010-6-2-216-219.
3. Ostrowski S.R., Henriksen H.H., Stensballe J., Gybel-Brask M., Cardenas J.C., Baer L.A., Cotton B.A., Holcomb J.B., Wade C.E., Johansson P.I. Sympathoadrenal activation and endotheliopathy are drivers of hypocoagulability and hyperfibrinolysis in trauma: A prospective observational study of 404 severely injured patients. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2017. vol. 82. no. 2. P. 293–301. DOI: 10.1097/TA.0000000000001304.
4. Макиев Г.Г., Гурина А.Е., Габолаева Н.А., Соколовский Н.В. Морфометрические показатели легких при введении мексидола крысам с экспериментальным острым респираторным дистресс-синдромом // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2020. № 2 (54). С. 120–126. DOI: 10.21685/2072-3032-2020-2-12.
5. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Ахапкина А.А., Булаева С.В., Михайлов П.В., Муравьев А.А. Микромеханические ответы эритроцитов человека на стимулирование мембранных рецепторов, ионных каналов и ферментов // *Российский журнал биомеханики*. 2016. № 1 (20). С. 28–36.
6. Муравьев А.В., Булаева С.В., Замышляев А.В., Петроченко А.С. Анализ механизмов изменения микрореологии клеток крови при действии газотрансмиттеров в норме и диабете второго типа // *Смоленский медицинский альманах*. 2018. № 4. С. 218–220.