

УДК 612.118.221.2:615.32

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА СКОРОСТЬ АГГЛЮТИНАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННУЮ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ

А.И. Махнёва¹, О.М. Безмельцева¹, Н.А. Мойсеенко¹, В.И. Циркин²,
С.Л. Дмитриева³, В.С. Попова³, Т.В. Черепанова³, С.В. Хлыбова⁴,

¹ФГБОУ ВПО «Вятский государственный гуманитарный университет», г. Киров,

²ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»,

³КОГБУЗ «Кировский областной клинический перинатальный центр»,

⁴ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия»

Махнёва Александра Игоревна – e-mail: aleksandra.mahneva@mail.ru

В опытах с эритроцитами капиллярной и венозной крови мужчин и женщин (небеременных, беременных, рожениц и женщин с угрозой преждевременных родов) оценивали возможность определения их адренореактивности по изменению времени начала агглютинации эритроцитов, вызываемой фитогемагглютинином (ФГА) под влиянием адреналина. ФГА получали путем экстрагирования из семян гороха. Установлено, что этот экстракт способен вызывать агглютинацию эритроцитов независимо от их групповой (по системе АВО) принадлежности. Скорость начала агглютинации эритроцитов в этих условиях изменялась под влиянием адреналина (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} г/мл раствора Кребса), а характер этих изменений был во многом такой же, как при индукции агглютинации эритроцитов с помощью изогемагглютинирующей сыворотки крови человека с I группой крови. Это указывает на перспективность применения ФГА для оценки адренореактивности эритроцитов у человека, независимо от их групповой принадлежности. Получены данные о том, что при беременности доминирует эффективность активации бета₂-адренорецепторов, а при срочных родах – доминирует эффективность активации альфа₁-адренорецепторов. Угроза преждевременных родов характеризуется снижением эффективности активации бета₂-адренорецепторов и повышением эффективности активации альфа₁-адренорецепторов.

Ключевые слова: адреналин, фитогемагглютинин, агглютинация, беременность, роды.

In experiments with capillary and venous blood erythrocytes of men and women (non-pregnant, pregnant women, woman in labor and women with threatened preterm labor) were evaluated to determine their adrenoreactivity opportunity to change the start time of the agglutination of erythrocytes caused by phytohemagglutinin (PHA) under the influence of adrenaline. PHA obtained by extraction from seeds of peas. It has been established that this extract is capable of inducing agglutination of erythrocytes, regardless of their group (for ABO-system) accessory. Speed of onset of agglutination of erythrocytes in these conditions changed under the influence of adrenaline (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} g/ml of Krebs' solution), and the nature of these changes was largely a the same as in the induction of agglutination of erythrocytes using isohemagglutination human serum of I blood group This points to the promising application of PHA to assess adrenoreactivity of human erythrocytes regardless of their group affiliation/ It is evidence that pregnancy in erythrocytes dominates the efficiency of activation of beta₂-adrenoreceptors, and at labor – dominates the efficiency of activation of alpha₁-adrenoreceptors. Threatened premature labor is characterized by a decrease in the efficiency of activation of beta₂-adrenoreceptors and increase the efficiency of activation of alpha₁-adrenergic receptors.

Key words: adrenaline, phytohemagglutinin, agglutination, pregnancy, labor.

Введение

Ранее было установлено, что адреналин при определенных концентрациях, судя по времени начала агглютинации (ВНА) эритроцитов II, III или IV групп крови в изогемагглютинирующей сыворотке крови I группы, способен повышать или, наоборот, снижать скорость агглютинации эритроцитов человека [1, 2, 3]. Показано [2], что повышение скорости агглютинации связано с активацией альфа₁-адренорецепторов (АР), а ее снижение обусловлено активацией бета₂-АР, в то время как активация альфа₂-АР и бета₁-АР, скорее всего, не влияет на этот процесс. Также было выявлено [1], что характер изменения скорости агглютинации эритроцитов под влиянием адреналина у женщин зависит от этапов репродуктивного процесса. Это объясняется изменением адренореактивности эритроцитов, отражающих ситуацию, согласно которой при беременности доминирует эффективность активации бета₂-АР, а в родах – альфа₁-АР [1]. Эти данные позволили рекомендовать использовать метод адренозависимой агглютинации эритроцитов в акушерской практике, в том числе для прогнозирования вероятности преждевременных родов [1]. Однако отсутствие возможности применять этот метод у женщин с I группой крови, доля которых, как общеизвестно, составляет почти 50%, заставляет вести поиск универсального фактора, индуцирующего агглютинацию эритроцитов, независимо от группы крови и видовой принадлежности. В этом отношении могут быть перспективны фитогемагглютинины, содержащиеся в горохе, фасоли, томатах [4, 5].

Цель настоящей работы: оценить возможность исследования адренозависимой агглютинации эритроцитов человека, в том числе у женщин на различных этапах репродуктивного процесса, при использовании в качестве индуктора агглютинации солевого экстракта гороха, содержащего, как известно [5], фитогемагглютинин.

Материал и методы

Исследовали капиллярную кровь мужчин (группа 1, n=10) и небеременных женщин с фолликулярной (группа 2, n=10) и лютеиновой (группа 3, n=12) фазами цикла, а также гепаринизированную венозную кровь женщин с неосложненным течением беременности (6–34 недели, группа 4, n=16), с неосложненным течением латентной фазы I периода срочных (38–40 недель) родов (группа 5, n=11) и беременных женщин (24–36 недель) с угрозой преждевременных родов (УПР, группа 6, n=10). Всего исследована кровь 69 человек, при этом с группой I, II, III и IV – соответственно 19, 21, 20, 9 человек, или 28%, 30%, 29% и 13% от всех исследованных.

Приготовление фитогемагглютинина (ФГА) проводили из гороха посевного (*Pisum sativum* L.) по методике Н.А. Мойсеенко, Л.И. Иржак [5]. С этой целью семена гороха посевного, приобретенные в обычной торговой сети (во всех группах, кроме женщин с УПР, использована условно говоря партия № 1, а у женщин с УПР – партия № 2), подвергали размельчению на кофемолке жерновой ручного типа, и навеску в 1 г помещали в 5 мл раствора Кребса на двое суток в бытовом холодильнике при t=4°C. Полученную вытяжку фильтровали через обеззоленный фильтр и использовали для исследования *ex tempore*. Раствор Кребса имел состав (мМ): NaCl – 136; KCl – 4,7;

CaCl₂ – 2,52; MgCl₂ – 1,2; KН₂РO₄ – 0,6; NaHCO₃ – 4,7; глюкоза – 11; pH – 7,4).

Адренореактивность эритроцитов оценивали по методике В.И. Циркина и соавт. [3], детально описанной в работах А.И. Володченко и соавт. [2] по изменению времени начала агглютинации (ВНА) эритроцитов под влиянием адреналина (10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ и 10⁻⁵ г/мл раствора Кребса). При этом агглютинацию эритроцитов в отличие от оригинальной методики индуцировали не изогемагглютинирующей сывороткой крови I группы, а нативным экстрактом гороха (1:5), получение которого описано выше. Для определения ВНА под влиянием экстракта на плоскость глазными стеклянными пипетками наносили две капли: каплю венозной или капиллярной крови и каплю экстракта гороха, затем эти капли смешивали стеклянной палочкой 10 секунд и с этого момента определяли время начала агглютинации эритроцитов в присутствии экстракта гороха, т. е. с момента появления ее первых визуальных признаков – «зернышек» агглютината.

Для оценки адренозависимой агглютинации на плоскость глазными стеклянными пипетками также наносили две капли: каплю венозной или капиллярной крови и каплю экстракта гороха, а также добавляли еще третью каплю – либо каплю раствора Кребса (контроль), либо каплю адреналина в одной из исследуемых концентраций (опыт). Затем стеклянной палочкой смешивала 1-ю (кровь) и 3-ю (раствор Кребса или раствор адреналина) капли, а через 10 секунд к ним примешивали 2-ю каплю, т. е. экстракта гороха, и с этого момента определяли время начала агглютинации эритроцитов. Во всех случаях ВНА оценивали в абсолютных (с) и в относительных, т. е. в процентах к ВНА в присутствии экстракта (для контроля) или в присутствии раствора Кребса (для опыта). Результаты исследования, в том числе их различия, оценивали методами непараметрической статистики [6], используя для зависимых выборок метод Вилкоксона (^B), а для независимых – метод Манна-Уитни (^{M-Y}), считая различия статистически значимыми (*) при p<0,05. В тексте и таблице результаты представлены в виде медианы Ю, а в таблице – в виде 25 и 75 центилей.

Результаты и их обсуждение

Установлено (таблица), что во всех случаях и независимо от группы крови под влиянием нативного экстракта происходила агглютинация эритроцитов. Это означало, что экстракт содержит ФГА, эффективность которого оказалась достаточной для индукции агглютинации, в том числе у людей с I группой крови. Показано, что ВНА в группах 1, 2, 3, 4 и 5, т. е. где использовался экстракт из партии № 1, составило соответственно 55,5 с, 56,5 с, 58,0 с, 50,0 с и 27,0 с (p_{5-1,2,3,4} < 0,05^{M-Y}). Это означает, что скорость ФГА-индуцированной агглютинации у рожениц статистически значимо выше, чем у мужчин, беременных и небеременных женщин. У женщин с УПР этот показатель составил 26,0 с (p_{6-1,2,3,4} < 0,05^{M-Y}). Однако говорить о скорости агглютинации эритроцитов при УПР нет пока оснований, так как в этих опытах экстракт готовился на семенах из партии № 2. Из этих наблюдений следует, что в подобных опытах необходимо использовать выпускаемые промышленностью химически очищенные препараты ФГА.

Контрольные опыты показали, что добавление к двум каплям (1 – капля крови, 2 – капля экстракта) 3-й капли, т. е. капли раствора Кребса, приводит к увеличению ВНА в 1-, 2-, 3-, 4-, 5- и 6-й группах соответственно до 129,0%*^B, 132,0%, 104,0%, 137,5%*^B, 208,0%*^B и 212,0%*^B ($p_{5,6-1,2,3,4} < 0,05^{M-Y}$). Эти данные указывают на то, что разведение ФГА снижает скорость агглютинации эритроцитов, что особенно характерно для эритроцитов рожениц и, вероятно, женщин с УПР. Следовательно, скорость агглютинации зависит от концентрации ФГА в среде. Это говорит о том, что мы имеем дело с БАВ, эффект которых напрямую зависит от их концентрации. Опыты с адреналином (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} г/мл) показали, что у мужчин все изменения ВНА, равные соответственно 101,5%, 93,5%, 104,0%, 105,0%, 97,0% и 92,0% от контроля, были статистически незначимы ($p > 0,05$). Вместе с тем, по данным А.И. Володченко и соавт. [2], адреналин, особенно в высоких концентрациях, снижает ВНА эритроцитов мужчин, т. е. повышает скорость агглютинации эритроцитов, и это объясняется доминированием альфа1-АР. У женщин в фолликулярную фазу цикла ВНА на фоне адреналина, согласно нашим данным, составило соответственно 111,0%*^Y, 120,0%*^Y, 116,0%, 110,0%, 111,0% и 122,0%*^Y, т. е. адреналин в концентрациях 10^{-10} , 10^{-9} и 10^{-5} г/мл значимо повы-

шает ВНА, что говорит о снижении скорости агглютинации (в результате доминирования эффективности активации бета₂-АР). В то же время, по данным А.И. Володченко и соавт. [1] адреналин, наоборот, у этих женщин уменьшает ВНА, т. е. повышает скорость агглютинации. У женщин в лютеиновую фазу цикла, по нашим данным, ВНА на фоне адреналина составило соответственно 93,5%, 119,0%, 125,0%, 131,0%*^B, 113,0% и 111,0%, т. е. адреналин в концентрации 10^{-7} г/мл статистически значимо повышает ВНА, что говорит о снижении скорости агглютинации (в результате доминирования эффективности активации бета₂-АР). Это частично согласуется с данным А.И. Володченко и соавт. [1], согласно которым, адреналин у женщин с лютеиновой фазой цикла повышает ВНА, т. е. снижает скорость агглютинации (в результате доминирования эффективности активации бета₂-АР). У беременных женщин, по нашим данным, ВНА на фоне адреналина составило соответственно 103,5%, 109,5%, 105,0%, 103,0%, 95,5% и 100,0%. Это означает, что адреналин ни в одной из концентраций не влияет на ВНА, т. е. на скорость агглютинации. Это частично согласуется с данными [1], согласно которым адреналин у женщин в I триместре не влияет на ВНА, а у женщин во II и III триместрах – повышает ВНА, т. е. снижает скорость агглютинации, что объясняется доминированием эффек-

ТАБЛИЦА.

Время начала агглютинации эритроцитов мужчин, небеременных женщин с фолликулярной и лютеиновой фазами цикла, беременных женщин, рожениц и женщин с угрозой преждевременных родов в нативном экстракте гороха и в присутствии адреналина в концентрации 10^{-10} – 10^{-5} МЕ/мл

		Мужчины	Небеременные с фолликулярной фазой цикла	Небеременные с лютеиновой фазой цикла	Беременные женщины	Женщины во время первых срочных родов	Женщины с угрозой преждевременных родов
Число наблюдений		10	11	12	16	11	10
Экстракт	с	55,5 (50,0; 67,0)	56,5 (52,0; 63,0)	58 (47,0; 73,0)	50 (39,0; 68,0)	27,0 ^{1,2,3,4} (25,0; 31,5)	26,0 ^{2,3,4} (23,5; 33,0)
	% к экстракту	129,0* (121,5; 154,0)	132 (107,0; 212,0)	104 (96,0; 147,0)	137,5* (115,0; 184,0)	208,0* ^{1,2,3,4} (160,5; 334,25)	212,0* ^{1,2,3,4} (188,0; 273,5)
A10	с	57,5 (49,0; 87,5)	79 (64,5; 113,5)	54,0 ² (46,0; 68,0)	69,5 ³ (56,0; 110,0)	73,0 ³ (66,5; 91,25)	56,5 ² (53,0; 76,0)
	% к РК	101,5 (77,0; 124,5)	111,0* (102,75; 153,5)	93,5 (85,0; 124,0)	103,5 (98,0; 132,0)	141 (105,25; 170,75)	101,5 (84,5; 129)
A9	с	58 (51,5; 88,0)	80,5 (60,0; 122,0)	56 (53,0; 84,0)	71,5 (57,0; 97,0)	67 (57,0; 79,25)	59,0 ² (47,0; 73,0)
	% к РК	93,5 (76,5; 124,5)	120,0* (117,5; 135,75)	119 (98,0; 138,0)	109,5 (86,0; 141,0)	125 (98,25; 137,75)	95,5 ² (80,5; 113,0)
A8	с	73 (61,5; 86,5)	73 (55,5; 119,5)	61 (57,0; 109,0)	67,5 (52,0; 96,0)	53 (48,0; 80,5)	61 (56,5; 70,0)
	% к РК	104 (90,0; 141,5)	116 (107,0; 133,25)	125 (103,0; 156,0)	105 (87,0; 125,0)	84 (81,75; 163,25)	96,5 (86,0; 130,5)
A7	с	70 (53,0; 108,5)	72,5 (68,5; 112,5)	71 (58,0; 119,0)	69,5 (56,0; 112,0)	54,0 ² (30,75; 75,5)	53,5 ² (48,5; 76,0)
	% к РК	105 (77,0; 154,0)	110 (87,25; 151,5)	131,0* (93,0; 166,0)	103 (95,0; 127,0)	82 (58,25; 142,0)	93,5 (81,5; 120,5)
A6	с	66,5 (42,0; 85,5)	79 (67,5; 89,5)	62 (50,0; 123,0)	60,5 (56,0; 86,0)	55,0 ² (48,25; 61,0)	60,5 ² (57,5; 68,5)
	% к РК	97 (58,5; 143,0)	111 (89,5; 123,25)	113 (85,0; 171,0)	95,5 (90,0; 137,0)	92 (67,0; 112,5)	101 (90,5; 115,0)
A5	с	56,5 (51,0; 100,5)	76,5 (61,5; 109,5)	63,5 (56,0; 87,0)	70 (55,0; 107,0)	69 (66,0; 75,25)	62 (56,0; 75,0)
	% к РК	92 (75,5; 127,5)	122,0* (105,5; 148,0)	111 (98,0; 151,0)	100 (95,0; 129,0)	106 (94,75; 149,75)	105,5 (98,5; 119,5)

тивности активации бета₂-АР. У рожениц, согласно нашим данным, ВНА на фоне адреналина составило соответственно 141,0%, 125,0%, 84,0%, 82,0%, 92,0% и 106,0%, но при этом все эти изменения были статистически незначимы. Однако прослеживается тенденция, согласно которой адреналин в концентрациях 10⁻⁸, 10⁻⁷ и 10⁻⁶ г/мл снижает ВНА, т. е. повышает скорость агглютинации, что говорит о доминировании эффективности активации альфа₁-АР. Это частично согласуется с данными А.И. Володченко и соавт. [1], согласно которым адреналин у рожавших женщин статистически значимо снижает ВНА, т. е. повышает скорость агглютинации, и это объясняется доминированием эффективности активации альфа₁-АР. У женщин с УПР, согласно нашим данным, ВНА на фоне адреналина составило соответственно 101,5%; 95,5%*^в, 96,5%, 93,5%, 101,0% и 105,5%, т. е. адреналин в концентрации 10⁻⁹ г/мл статистически значимо снижает ВНА, а в концентрациях 10⁻⁸ и 10⁻⁷ – проявляет подобную тенденцию. Все это говорит о том, что по аденореактивности эритроциты женщин с УПР отличаются от эритроцитов женщин с неосложненным течением беременности. Эти отличия указывают на снижение при УПР эффективности активации бета₂-АР, которое характерно и для рожениц. Не исключено, что эти изменения обусловлены снижением эффективности активации ядерных прогестероновых рецепторов типа PR-B, т. е. снижением способности прогестерона индуцировать экспрессию генов бета₂-АР в миоцитах матки и блокировать экспрессию ядерных рецепторов эстрогенов типа ER альфа.

Таким образом, использование модифицированного нами метода оценки аденозависимой агглютинации эритроцитов, в котором процесс агглютинации индуцируется фитогемагглютинином гороха, указывает на правомочность и целесообразность такой модификации, так как позволяет применять этот метод у всех людей, независимо от группы их крови (по системе АВО), и дает возможность использовать его для прогнозирования преждевременных родов. Очевидно, что следующим этапом, предшествующим внедрению этого метода в клиническую практику, является поиск наиболее оптимальных (по всем показателям, в том числе и по финансовым затратам) очищенных и стандартизованных препаратов ФГА, пригодных для индукции агглютинации эритроцитов и ее модуляции под влиянием различных БАВ, рецепторы которых содержатся в эритроцитах человека и животных.

Выводы

1. Фитогемагглютинин, содержащийся в экстракте гороха, способен вызывать агглютинацию эритроцитов капиллярной и венозной крови человека независимо от группы крови (в том числе по системе АВО).

2. Разведение экстракта раствором Кребса снижает способность ФГА индуцировать агглютинацию эритроцитов

3. Агглютинация эритроцитов, индуцированная фитогемагглютинином, содержащемся в экстракте гороха, способна выявить влияние адреналина на процесс агглютинации и тем самым, подобно оригинальному методу, основанному на использовании изогемагглютинирующей сыворотки крови человека I группы, позволяет оценивать аденореактивность эритроцитов человека, при этом снимаемая характерные для оригинального метода ограничения по группам крови.

4. Судя по аденозависимой ФГА-индуцированной агглютинации эритроцитов, при беременности доминирует эффективность активации бета₂-аденорецепторов, а при срочных родах доминирует эффективность активации альфа₁-аденорецепторов.

5. Угроза преждевременных родов характеризуется снижением эффективности активации бета₂-аденорецепторов и повышением эффективности активации альфа₁-аденорецепторов.



ЛИТЕРАТУРА

1. Володченко А.И., Циркин В.И., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л. Изменение скорости аденозависимой агглютинации эритроцитов у женщин на различных этапах репродуктивного процесса // Российский вестник акушера-гинеколога. - 2013. Т. 13, № 6. – С. 10-15.

Volodchenko, A.I., Tsirkin, V.I., Hlybova, S.V., Dmitrieva, S.L. Izmenenie skorosti adnozavisimoy agglyutinatsii eritrotsitov u zhenschin na razlichnykh etapah reproduktivnogo protsessa // Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa.- 2013. T. 13, № 6. – S. 10-15.

2. Володченко А.И., Циркин В.И., Костяев А.А. Механизм изменения скорости агглютинации эритроцитов человека под влиянием адреналина // Физиология человека. 2014.-Т.40, № 2.- С. 67-74

Volodchenko A.I., Tsirkin V.I., Kostyaev A.A. Mekhanizm izmeneniya skorosti agglyutinatsii eritrotsitov cheloveka pod vliyaniem adrenalina // Fiziologiya cheloveka. 2014.-T.40, № 2.- S. 67-74.

3. Циркин В.И., Громова М.А., Колчина Д.А., Михайлова В.И., Плясунова Я.К. Оценка аденореактивности эритроцитов, основанная на способности адреналина повышать скорость агглютинации эритроцитов // Фундаментальные исследования. – 2008. – №7. – С.59-60.

Tsirkin V.I., Gromova M.A., Kolchina D.A., Mihaylova V.I., Plyasunova Ya.K. Otsenka adnoreaktivnosti eritrotsitov, osnovannaya na sposobnosti adrenalina povyishat skorost agglyutinatsii eritrotsitov // Fundamentalnyie issledovaniya. – 2008. – №7. – S.59-60

4. Луцки М.Д. Лектины, их получение и применение в исследовании гликопротеинов клеточных мембран // Автореф. дис...д.б.н.- Киев, 1989. – 42с.

Lutsik, M.D. Lektiny, ih poluchenie i primeneniye v issledovanii glikoproteinov kletochnyih membran // Avtoref. dis....d.b.n.- Kiev, 1989. – 42s.

5. Мойсеенко Н.А., Иржак Л.И. Агглютинация эритроцитов кролика при напряженном эритропоезе // Журнал общей биологии. – 1972. –Т. 33, №6. – С. 779-786.

Moysenko, N.A., Irzhak, L.I. Agglyutinatsiya eritrotsitov krolika pri napryazhennom eritropoeze // Zhurnal obschey biologii. – 1972. –T. 33, №6. – S. 779-786.

6. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. – М., Практика, 1999. – 459 с.

Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Per. s angl. — M., Praktika, 1999. — 459 s.