

ИЗМЕНЕНИЕ АДРЕНОРЕАКТИВНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИЛДРОНАТА

И.С. Николаева, Б.И. Медведев, И.Н. Помаскин

Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск

Способность милдроната усиливать действие β 2-адреномиметиков доказана in vitro методом адренозависимой осморезистентности эритроцитов (А-ОРЭ). Угроза преждевременных родов протекает на фоне нормальной β -адренореактивности.

Ключевые слова: угрожающие преждевременные роды, осморезистентность, адренореактивность, адренорецептор, β 2-адреносенсибилизатор.

Установлено, что УПР протекает на фоне нарушения адренергического механизма [2, 3, 5, 7]. С момента открытия эндогенного сенсибилизатора β -адренорецепторов (ЭСБАР) [1, 2, 4–6] выдвигалось предположение о возможности клинического применения его аналогов для лечения состояний, связанных с низкой эффективностью данного механизма. Таким аналогом является блокатор окисления жирных кислот – милдронат, или 3-(2,2,2-триметилгидроэнон) пропионата дигидротат. В экспериментах с гладкомышечными объектами в 2002 г. было показано, что милдронат повышает способность адреналина оказывать релаксирующий эффект, реализуемый за счет активации β 2-АР [6]. Направленность сенсибилизирующего действия подтверждается наличием данного эффекта в случаях с гладкими мышцами тех органов, где представлены β 2-АР (трахея, миоэпителий, коронарные артерии) и отсутствием эффекта – в опытах с миокардом β 1-АР. С учетом данных о наличии в организме человека и животных ЭСБАР прямого действия, наиболее вероятными компонентами которого являются гистидин, триптофан и тирозин, полученные результаты исследования (по аналогии) позволили рассматривать милдронат как экзогенный β -адреносенсибилизатор прямого действия. Основу β -сенсибилизирующего эффекта милдроната, вероятнее всего, составляет его способность повышать эффективность взаимодействия адреналина (и норадrenalина) с β -АР. С учетом современных представлений о физиологии β -АР можно предположить, что эта способность реализуется за счет одного из трех возможных процессов: 1) аллостерического изменения конформационного состояния β -АР, в результате которого возрастает сродство рецептора к агонисту; 2) ингибирования активности ряда ферментов, участвующих в фосфорилировании β -АР (киназы β -АР, протеинкиназы α - и β -аррестина), благодаря которому рецепторы утрачивают сродство к агонисту; 3) за счет повышения активности фосфатазы, участвующей в дефосфорилировании β -АР и тем самым восстанавливающей их сродство к агонисту.

На основании вышеизложенного мы предположили, что использование милдроната (экзогенного β -адреносенсибилизатора) позволит усилить действие β -адреномиметиков и тем самым снизить дозу используемого препарата и в конечном результате уменьшить количество побочных эффектов.

Целью нашей работы явилось изучение β 2-сенсибилизирующего действия милдроната in vitro методом адренозависимой осморезистентности эритроцитов (А-ОРЭ) у небеременных женщин и беременных при физиологически протекающей беременности и при УПР.

Материалы и методы исследования. В данном исследовании использовали венозную кровь 53 небеременных и беременных женщин с физиологическим течением беременности и с признаками УПР.

Первую группу составили образцы крови 13 небеременных женщин репродуктивного возраста (средний возраст – $29,6 \pm 6,3$). Вторую группу составили образцы крови 20 беременных женщин на сроке беременности 24–36 недель без признаков угрозы прерывания. Средний возраст женщин этой группы составил $26,2 \pm 3,5$ года. Комплексные критерии включения женщин во 2-ю группу – отсутствие острых или обострения хронических воспалительных заболеваний генитальной и экстрагенитальной сферы, отсутствие признаков угрозы прерывания беременности (по отсутствию жалоб, по состоянию родовых путей, по данным наружной гистерографии, колостроцитогаммы). В 3-ю группу были включены образцы венозной крови 20 беременных женщин на сроке беременности 24–36 недель с признаками угрозы прерывания беременности. Средний возраст – $25,5 \pm 3,4$ лет. Комплексные критерии включения женщин в эту группу: наличие признаков угрозы прерывания беременности (жалобы, состояния родовых путей, данные наружной гистерографии, колостроцитогаммы), отсутствие острых или обострения хронических воспалительных заболеваний генитальной и экстрагенитальной сферы.

Методика определение А-ОРЭ. Кровь в объеме 8 мл получали из локтевой вены с 8–10 ч утра; к ней добавляли 2 мл антикоагулянта (5 % раствор цитрата натрия). ОРЭ оценивали по методу Идельсона Л.И., используя в качестве гипотонического раствора 0,42 % раствор NaCl. Кровь в объеме 0,1 мл добавляли в 2 пробирки с холостыми пробами (одна с 5 мл дистиллированной водой, вторая – с 5 мл 0,9 % раствором NaCl), а также в контрольную пробирку и 4 ряда опытных пробирок (по 6 в каждую). В пробирки с холостыми пробами и в контрольную пробирку добавляли 0,02 мл 0,9 % раствора NaCl. В 1–4-й ряды опытных пробирок добавляли по 0,02 мл адреналина (1-й и 3-й ряды) и гинипрала (2-й и 4-й ряды) в возрастающей концентрации соответственно 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} , а в 3-й и 4-й ряды добавляли 0,02 милдроната в концентрации 10^{-5} г/мл. Затем все пробирки инкубировали в термостате типа ТС-80М-2 в течение 10 мин при температуре 37 °С, после чего во все пробирки (кроме холостых проб) добавляли по 5 мл 0,40 % раствора NaCl и повторно инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С, подвергая в дальнейшем 5-минутному центрифугированию на центрифуге типа ОПн-8УХЛ4 при 2000 об/мин. Для каждой пробирки измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости (против надосадочной жидкости, содержащейся в холостой пробе с 1 % раствором NaCl) на фотоэлектрориметре типа КФК-2 с зеленым светофильтром при длине волны 540 нм в кювете с толщиной

поглощающего слоя 10 мм. Величина оптической плотности надосадочной жидкости опытной пробы выражали в процентах к оптической плотности надосадочной жидкости пробы с дистиллированной водой.

Результаты исследования Небеременные

В образцах крови небеременных женщин имеются достоверные отличия в абсолютных значениях ОРЭ между различными концентрациями адреналина и гинипрала, причём в среде гинипрала эти значения меньше значений ОРЭ в среде с адреналином различной концентрации. Так, при концентрации адреналина 10^{-5} г/мл ОРЭ составляет $315,4 \pm 33,00$, при концентрации гинипрала 10^{-5} г/мл – $275,5 \pm 35,2$. Достоверные отличия во всех концентрациях. Дозозависимости нет в обоих случаях (табл. 1).

Милдронат в концентрации 10^{-5} г/мл, добавленный к среде адреналина разной концентрации, практически никак не влияет на значения ОРЭ. Достоверные отличия только в среде адреналина 10^{-7} г/мл: так при концентрации адреналина 10^{-5} г/мл ОРЭ составила $315,4 \pm 33,00$, при добавлении в эту среду милдроната 10^{-5} г/мл абсолютное значение ОРЭ составило $318,1 \pm 25,5$. В % от Е0 в этой же концентрации адреномиметика значение ОРЭ составило $32,43 \pm 2,3$, при добавлении в эту среду милдроната в концентрации 10^{-5} г/мл значение в % от Е0 составило $32,70 \pm 2,5$. Отличия недостоверны во всех концентрациях адреномиметика, кроме 10^{-7} г/мл.

Таблица 1

Осморезистентность эритроцитов (абсолютные значения и в % от Е0) (М ± m)

Концентрация, г/мл	Е0	Ек	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Адреналин	972,6 ± 35,3	323,5 ± 33,6	315,4* ± 33,0	323,2* ± 30,6	310,3* ¹ ± 33,42	313,5* ± 34,32	314,6* ± 31,9	302,1* ± 33,13
В % к Е0			32,43** ± 2,3	33,23** ± 2,82	31,9** ² ± 2,6	32,23** ± 3,0	32,35** ± 2,93	31,06** ± 2,5
Адреналин + милдронат 10^{-5} г/мл			318,1 ± 25,5	350,3 ± 24,2	348,12 ± 26,5	315,3 ± 25,2	319,4 ± 23,5	310,5 ± 22,1
В % к Е0			32,70 ± 2,5	35,6 ± 2,2	35,8 ± 2,1	32,4 ± 2,5	32,8 ± 1,8	31,57 ± 2,1
Гинипрал			275,5 ³ ± 35,2	268,2 ³ ± 32,3	270,3 ³ ± 32,5	280,22 ³ ± 33,6	277,6 ³ ± 34,3	276,4 ± 31,2
В % к Е0			28,33 ± 2,2	27,6 ± 3,1	27,8 ± 3,2	28,8 ± 3,8	28,54 ± 2,8	28,4 ± 2,85
Гинипрал + милдронат 10^{-5} г/мл			356,2 ± 35,2	322,3 ± 35,8	379,4 ± 33,3	367,3 ± 34,2	389,6 ± 35,1	355,12 ± 35,8
В % к Е0			36,60 ± 3,2	33,11 ± 3,1	38,97 ± 2,7	37,73 ± 3,5	40,00 ± 2,8	36,50 ± 3,6

Примечание. * – достоверные отличия показателей абсолютных показателей ОРЭ в среде адреналина и гинипрала ($p < 0,05$); ** – достоверные отличия показателей ОРЭ в % к Е0 в среде адреналина и гинипрала ($p < 0,05$); ¹ – достоверные отличия показателей абсолютных показателей ОРЭ в среде адреналина и адреналин + милдронат 10^{-5} г/мл ($p < 0,05$); ² – достоверные отличия показателей ОРЭ в % к Е0 в среде адреналина и адреналин + милдронат 10^{-5} г/мл ($p < 0,05$); ³ – достоверные отличия показателей абсолютных показателей ОРЭ в среде гинипрала и гинипрал + милдронат 10^{-5} г/мл ($p < 0,05$); ° – достоверные отличия показателей ОРЭ в % к Е0 в среде гинипрала и гинипрал + милдронат 10^{-5} г/мл ($p < 0,05$). То же в табл. 2, 3.

Напротив, в среде гинипрала милдронат в концентрации 10^{-5} г/мл повышает как абсолютные значения ОРЭ, так и в % от Е0. Так при концентрации гинипрала 10^{-5} г/мл ОРЭ составила $275,5 \pm 35,2$, при добавлении в эту среду милдроната 10^{-5} г/мл абсолютное значение ОРЭ составило $356,2 \pm 35,2$, в % от Е0 без милдроната значение составило $28,33 \pm 2,2$, а при добавлении милдроната 10^{-5} г/мл – $36,6 \pm 3,2$.

Таким образом, милдронат у небеременных усиливает действие гинипрала – селективного β_2 -адреномиметика, а на действие адреналина влияния не оказывает.

Беременные

с физиологическим течением

Милдронат 10^{-5} г/мл как в среде с адреналином, так и в среде с гинипралом достоверно уси-

ливал их действие. В среде с адреналином 10^{-6} г/мл (без милдроната) % к Е0 составил $68,5 \pm 3,6$, при добавлении милдроната 10^{-5} г/мл % к Е0 составил $80,86 \pm 3,2$. Милдронат сильнее усиливает действие гинипрала. Так в среде с гинипралом 10^{-6} г/мл (без милдроната) % к Е0 составил $63,2 \pm 3,2$, при добавлении милдроната 10^{-5} г/мл % к Е0 составил $94,2 \pm 3,28$ (табл. 2).

Беременные с УПР

В группе с УПР абсолютные значения в среде адреналина и гинипрала достоверно отличимы при всех концентрациях адреномиметиков, кроме крайних – 10^{-5} и 10^{-10} г/мл (табл. 3).

В % к Е0 в среде адреналина и гинипрала достоверные отличия показателей ОРЭ только в концентрации 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} г/мл. Милдронат усиливает действие и адреналина и гинипрала – отличия

Таблица 2

Осмореизентность эритроцитов (абсолютные значения и в % от Е0) ($M \pm m$)

Концентрация, г/мл	Е0	Ек	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Адреналин	920,3 $\pm 22,2$	489,5 $\pm 24,22$	633,5* ¹ $\pm 23,3$	630,5* ¹ $\pm 25,3$	638,2* ¹ $\pm 24,3$	640,00* ¹ $\pm 24,4$	623,3* ¹ $\pm 24,3$	625,4* ¹ $\pm 24,8$
В % к Е0			68,8** ² $\pm 3,3$	68,5** ² $\pm 3,6$	69,3** ² $\pm 3,08$	69,54** ² $\pm 3,7$	67,73** ² $\pm 3,0$	68,0** ² $\pm 3,2$
Адреналин + милдронат 10^{-5} г/мл			734,32 $\pm 25,5$	740,2 $\pm 25,3$	722,3 $\pm 23,3$	712,5 $\pm 26,4$	689,4 $\pm 22,2$	700,2 $\pm 22,3$
В % к Е0			79,7 $\pm 3,2$	80,86 $\pm 3,2$	78,37 $\pm 3,08$	77,37 $\pm 3,8$	74,8 $\pm 3,2$	76,3 $\pm 3,5$
Гинипрал			592,2 ³ $\pm 22,2$	586,3 ³ $\pm 22,9$	575,2 ³ $\pm 24,2$	598,20 ³ $\pm 23,2$	569,2 ³ $\pm 23,2$	567,00 ³ $\pm 24,2$
В% к Е0			64,35 ° $\pm 3,2$	63,2 ° $\pm 3,2$	62,6 ° $\pm 3,6$	65,00 ° $\pm 3,27$	60,85 ° $\pm 3,56$	61,60 ° $\pm 3,7$
Гинипрал + милдронат 10^{-5} г/мл			844,3 $\pm 24,1$	867,3 $\pm 24,3$	880,1 $\pm 22,7$	845,3 $\pm 25,3$	850,5 $\pm 22,5$	860,0 $\pm 26,2$
В % к Е0			91,74 $\pm 3,2$	94,2 $\pm 3,28$	95,63 $\pm 3,2$	91,85 $\pm 3,2$	92,42 $\pm 3,2$	93,45 $\pm 3,2$

Таблица 3

Осмореизентность эритроцитов (абсолютные значения и в % от Е0) ($M \pm m$)

Концентрация, г/мл	Е0	Ек	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Адреналин	900,6 $\pm 35,01$	548,2 $\pm 34,2$	510,5 ¹ $\pm 33,5$	498,8* ¹ $\pm 33,6$	478,4* ¹ $\pm 33,6$	482,4* ¹ $\pm 32,3$	493,4* ¹ $\pm 33,5$	472,3 ¹ $\pm 32,2$
В % к Е0			56,68 ² $\pm 3,6$	55,34** ² $\pm 3,3$	53,1** ² $\pm 3,10$	53,56** ² $\pm 3,41$	54,8 ² $\pm 3,26$	52,45 ² $\pm 3,4$
Адреналин + милдронат 10^{-5} г/мл			708 $\pm 25,3$	757 $\pm 25,2$	760 $\pm 23,3$	735 $\pm 28,2$	700 $\pm 26,32$	700 $\pm 27,2$
В % к Е0			78,61 $\pm 3,12$	84,06 $\pm 3,4$	84,39 $\pm 3,3$	81,61 $\pm 3,8$	77,73 $\pm 3,7$	77,73 $\pm 3,1$
Гинипрал			515,00 ³ $\pm 34,3$	534,4 ³ $\pm 34,3$	534,5 ³ $\pm 31,2$	522,7 ³ $\pm 33,4$	505,9 ³ $\pm 31,2$	499,5 ³ $\pm 32,8$
В % к Е0			57,18 ° $\pm 2,9$	59,34 ° $\pm 2,4$	59,35 ° $\pm 2,3$	58,04 ° $\pm 2,4$	56,18 ° $\pm 3,6$	55,46 ° $\pm 2,7$
Гинипрал + милдронат 10^{-5} г/мл			818 $\pm 36,3$	825 $\pm 35,3$	823 $\pm 36,1$	840 $\pm 32,3$	722 $\pm 38,5$	730 $\pm 31,5$
В% к Е0			90,83 $\pm 4,9$	91,61 $\pm 3,93$	91,38 $\pm 4,3$	93,27 $\pm 4,6$	80,17 $\pm 3,92$	81,06 $\pm 4,32$

статистически достоверны во всех концентрациях. Но так же как и в группе беременных с физиологическим течением беременности, милдронат достоверно сильнее усиливает действие гинипрала.

Полученные данные доказывают свойство милдроната усиливать действие β -адреномиметиков, в частности реализуемых за счет активации β_2 -АР. Так как действие милдроната в группах беременных с физиологическим течением и с признаками УПР – однонаправленное (усиливает действие как адреналина, так и гинипрала, причём второго значительно), всё вышеизложенное подтверждает гипотезу о том, что УПР протекает на фоне нормальной β -адренореактивности.

Литература

1. Абрамченко, В.В. Пролонгирование эффекта β -адреномиметиков (гинипрала) в сочетании с комплексом унитиол-аскорбиновая кислота / В.В. Абрамченко, Е.В. Костюшов, Н.Р. Данилова // Проблемы репродукции. – 2001. – Т. 7, № 4. – С. 51–52.
2. Гусева, Е.В. β -адренореактивность эритроцитов женщин при нормальных и осложненных родах / Е.В. Гусева, С.А. Дворянский, В.И. Циркин // Акушерство и гинекология. – 1998. – № 4. – С. 17–22.
3. Калвиныш, И.Я. Милдронат и механизмы оптимизации клеточного производства энергии в условиях кислородного голодания / И.Я. Калвиныш // Материалы III Междунар. симпозиума «Цереброкардиальная патология – новое в диагностике и лечении». – Судак, Украина, 2001. – С. 3–17.
4. Метод оценки адренореактивности организма (β -арм) у беременных для прогнозирования течения родов / Л.В. Адамян, Т.Ю. Смольнова, И.Г. Длусская и др. // Проблемы репродукции. – 2006. – № 1. – С. 91–98.
5. Осокина, А.А. Клинико-лабораторная характеристика β -адренергического механизма при угрозе преждевременных родов: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.А. Осокина. – Киров, 1998. – 22 с.
6. Подтетнев, А.Д. Прогнозирование, профилактика и лечение слабости и дискоординации родовой деятельности: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А.Д. Подтетнев. – СПб., 2003. – 32 с.
7. Horga, J.F. A beta-2-adrenergic receptor activates adenylate-cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentration / J.F. Horga, J. Gisbert, De J.C. Agustin et al. // Blood Cell Mol Dis. – 2000. – V. 3. – P. 223–228.

Поступила в редакцию 17 июня 2011 г.