

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.1

А. И. Володченко, В. И. Циркин, А. А. Костяев

Механизм влияния адреналина на скорость агглютинации эритроцитов человека

В опытах с адреналином, фенилэфрином, гинипралом, ницерголином, йохимбином, обзиданом и атенололом показано, что скорость агглютинации эритроцитов человека возрастает при активации альфа₁-адренорецепторов (АР) и снижается при активации бета₂-АР. Опыты с индометацином, трифлуоперазином и BaCl₂ указывают на то, что активация альфа₁-АР повышает активность фосфолипазы A₂, кальмодулина и вход Ca²⁺.

Ключевые слова: эритроциты, агглютинация, адреналин, адренорецепторы, кальмодулин, фосфолипаза A₂.

A. I. Volodchenko, V. I. Tsirkin, A. A. Kostyaev

The Mechanism of Adrenaline Influence on Speed of Agglutination of the Person's Erythrocytes

In experiments with adrenaline, phenylephrine, ginipral, nicergoline, yohimbine, obzidan, atenolol it is shown that the rate of agglutination of human erythrocytes is increased with alpha₁-adrenergic receptor (AR) activation and reduced activation of beta₂-AR. Experiments with indometacin, trifluoperazine and BaCl₂ indicate that activation of alpha₁-AR increases the activity of phospholipase A₂, calmodulin, and Ca²⁺ entry.

Keywords: erythrocytes, agglutination, adrenaline, an adrenergic receptor, calmodulin, phospholipase A₂.

Агглютинация эритроцитов, как известно [3], представляет собой склеивание антигеннесущих эритроцитов с помощью молекул специфических антител или агглютининов, относящихся к классам IgG и IgM, в присутствии электролитов, которое заканчивается образованием видимых невооруженным глазом хлопьев или осадка (агглютината). Агглютинация протекает в две фазы [4]. В первой, или латентной, фазе происходит специфическое взаимодействие активного центра антител с детерминантами антигенов. Эта стадия не сопровождается видимыми изменениями реагирующей системы и может происходить в отсутствие электролитов. Во второй фазе происходит образование агглютината. Для нее обязательно наличие электролитов, которые снижают электрический заряд комплексов антиген-антитело и ускоряют процесс склеивания эритроцитов.

Было установлено, что адреналин влияет на скорость агглютинации [1, 6, 10]. Исходя из данных о существовании в эритроцитах популяций альфа₁-, альфа₂-, бета₁- и бета₂-адренорецепторов (АР) [11], В. И. Циркин и соавт. [10] высказали

предположение о том, что увеличение скорости агглютинации под влиянием адреналина связано с активацией альфа-АР и, частично, бета₂-АР, а снижение – с активацией бета₁-АР [10]. Однако убедительных доказательств этого предположения до настоящего времени не было.

С учетом всего сказанного целью нашей работы являлось изучение механизма, лежащего в основе способности адреналина изменять скорость агглютинации эритроцитов человека.

Материалы и методы

В исследовании использовали венозную кровь, полученную в объеме 2–4 мл от 80 мужчин-доноров станции Кировского НИИ гематологии и переливания крови в возрасте от 18 до 30 лет, имеющих II, III или IV группу крови. При заборе крови она смешивалась с гепарином (50 Ед/мл) в соотношении 4:1.

Всего проведено 250 опытов, условно разделенных на 15 серий (табл.), в которых оценивалось влияние на агглютинацию адреналина и адреномиметиков (фенилэфрина, гинипрала), адреноблокаторов (ницерголина, йохимбина, обзидана).

на, атенолола), а также блокатора фосфолипазы A_2 индометацина [5], антагониста кальмодулина трифлуоперазина [8] и блокатора Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов $BaCl_2$ [12].

Таблица

Время начала агглютинации эритроцитов у мужчин ($M \pm m$) в изогемагглютинирующей сыворотке $0_{a\beta}$ (I) группы крови в присутствии раствора Кребса (контроль, секунды), адренергических и других веществ (опыт, % от контроля)

Вещества и их концентрация (г/мл)	n	Контроль	Концентрация вещества, г/мл				
			10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
		c	%	%	%	%	%
Адреналин и адреноблокаторы (серии 1, 2, 3, 4)							
Адреналин	10	16±2	87±4*	80±5*	81±5*	74±6*	80±5*
A+ницерголин, 10^{-6}	10	16±2	104±5 ^A	108±5 ^A	98±5 ^A	107±5 ^A	102±6 ^A
Адреналин	10	11±1	93±2	85±2*	79±2*	76±3*	75±2*
A+йохимбина, 10^{-6}	10	11±1	90±3	84±3*	80±2*	76±2*	76±3*
Адреналин	10	16±2	87±4*	80±5*	81±5*	74±6*	80±5*
A+обзидан, 10^{-6}	10	16±2	71±5*	60±5* ^A	67±4* ^A	56±5* ^A	63±5* ^A
Адреналин	10	15±2	86±4*	72±3*	83±5*	76±6*	77±7*
A+атенолол, 10^{-6}	10	14±2	84±8	79±6*	84±8*	77±8*	81±7*
Адреноблокаторы (серии 5, 6, 7)							
Ницерголин	10	23±4	98±3	97±4	99±3	93±2	97±3
Обзидан	10	22±4	91±3	89±4	94±5	93±2	92±5
Атенолол	10	21±4	99±4	84±4*	94±4	90±5	92±2
Фенилэфрин и адреноблокаторы (серии 8, 9)							
Фенилэфрин	10	11±1	91±2	83±1*	81±2*	75±2*	70±3*
Ф+ницерголин, 10^{-6}	10	11±1	102±1 ^Ф	99±2 ^Ф	101±1 ^Ф	103±1 ^Ф	101±2 ^Ф
Ф+обзидан, 10^{-6}	10	11±1	89±2*	83±2*	83±2*	79±2*	75±2*
Гинипрал и адреноблокаторы (серии 10, 11)							
Гинипрал	10	10±1	105±1	105±2	103±2	96±2	Z
Г+ницерголин, 10^{-6}	10	11±1	99±3	100±2	99±2	96±2	Z
Г+обзидан, 10^{-6}	10	11±1	100±1	100±1	102±1	97±2	Z
Фенилэфрин и индометацин (серия 12)							
Фенилэфрин	10	12±2	89±2*	77±2*	75±2	72±4*	69±4*
Ф+индометацин, 10^{-6}	10	12±2	100±1 ^Ф	102±3 ^Ф	98±3 ^Ф	98±2 ^Ф	99±1 ^Ф
Адреналин и другие вещества (серии 13, 14, 15)							
Адреналин	10	13±1	95±2	91±2*	85±3*	86±3*	82±2*
A+индометацин, 10^{-6}	10	13±2	101±1 ^A	103±3 ^A	99±1 ^A	99±2 ^A	99±2 ^A
Адреналин	10	12±1	94±2	89±2*	86±2*	83±3*	78±3*
A+трифлуоперазин, 10^{-6}	10	12±1	103±2 ^A	103±2 ^A	96±2 ^A	98±2 ^A	101±1 ^A
Адреналин	10	12±2	94±2	85±2*	83±3*	77±1*	74±3*
A+BaCl ₂ , 10^{-6}	10	12±1	102±1 ^A	100±3 ^A	98±2 ^A	98±2 ^A	98±2 ^A

Примечание: *, ^Ф, ^A – различия с контролем (*), группами «Адреналин» (^A) и «Фенилэфрин» (^Ф) статистически значимы ($p < 0,01$) по критерию Манна – Уитни; n – количество наблюдений; Ф – фенилэфрин, Г – гинипрал, А – адреналин; Z – не исследовано.

Оценку влияния веществ на агглютинацию эритроцитов производили по методу В. И. Циркина и соавт. [10]. С этой целью (рис. 1, панель Б) на плоскость наносили каплю гепаринизированной крови (а), каплю раствора Кребса (контроль, б) или каплю адренергического вещества в одной из исследуемых концентраций (опыт, б) и каплю изогемагглютинирующей сы-

воротки $0_{a\beta}$ (I) группы (в). Затем смешивали стеклянной палочкой первую и вторую капли (рис. 1, панель В), а через 10 секунд к ним примешивали каплю сыворотки (в) и с этого момента определяли время начала агглютинации (ВНА) эритроцитов по появлению ее первых визуальных признаков (рис. 1, панель Г).

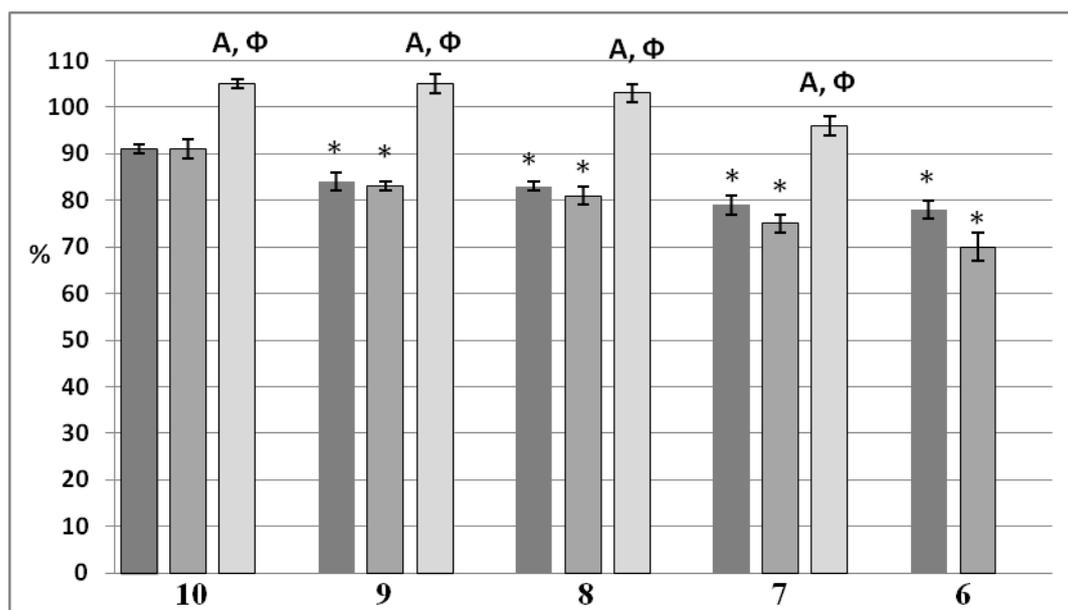


Рис. 1. Время начала агглютинации (% от контроля) эритроцитов у мужчин в изоагглютинирующей сыворотке 0_{аβ} (I) группы крови в присутствии адреналина (10^{-10} - 10^{-6} г/мл, n=60; 1-е столбцы); фенилэфрина (10^{-10} - 10^{-6} г/мл, n=20; 2-е столбцы) и гинипрала (10^{-10} - 10^{-7} г/мл, n=20; 3-и столбцы). Цифры 10, 9, 8, 7, 6 – отрицательный логарифм концентрации веществ (г/мл). *, ^Ф, ^А – различия с контролем (*), группами «Адреналин» (^А) и «Фенилэфрин» (^Ф) статистически значимы (p<0,01) по критерию Манна – Уитни

Для определения влияния на эффект адреналина адrenoблокаторов, индометацина, трифлуоперазина и хлорида бария (все – в концентрации 10^{-6} г/мл), предварительно в течение 5 минут при комнатной температуре гепаринизированную кровь в объеме 0,75 мл инкубировали с 0,25 мл раствора одного из указанных веществ, то есть в соотношении 3:1 (рис. 1, панель А). Затем проводили все указанные выше процедуры с неинкубированной кровью (опыт 1) и с инкубированной кровью (опыт 2). Во всех исследованиях ВНА оценивали в секундах, при этом ВНА опыта выражали в процентах к контролю (раствор Кребса).

В работе использовали адреналина гидрохлорид (Московский эндокринный завод, Россия), альфа₁-адреномиметик фенилэфрин (10^{-10} - 10^{-6} г/мл, «Дальхимфарм», Россия), бета-адреномиметик гинипрал (10^{-10} - 10^{-7} г/мл, «Никомед», Австрия), неселективный блокатор альфа-АР ницерголин (10^{-10} - 10^{-6} г/мл, ФП «Оболenskое», Россия), селективный блокатор альфа₂-АР йохимбина гидрохлорид (10^{-6} г/мл, «Здоровье», Россия), неселективный блокатор бета-АР обзидан (10^{-10} - 10^{-6} г/мл, «Шварц Фарма АГ», Германия) и селективный блокатор бета₁-АР атенолол (10^{-10} - 10^{-6} г/мл, «Канофарма Продакшн», Россия).

Для уточнения вероятных механизмов внутриклеточной передачи использовали блокатор

фосфолипазы А₂ индометацин (10^{-6} г/мл, «Фармахим-Софарма», Болгария), антагонист кальмодулина трифлуоперазин (10^{-6} г/мл, «Здоровье», Украина) и блокатор Гардош-эффекта ВаСl₂ (10^{-6} г/мл, «Синтез», Россия).

В опытах использовали изоагглютинирующую сыворотку группы 0_{аβ}(I), а также, для определения группы крови, сыворотки группы А_β (II) и группы В_α (III), произведенные на Кировской областной станции переливания крови (титр 1:32).

Во всех сериях эксперимента использовался раствор Кребса (pH=7,4), содержащий (мМ): NaCl – 136; KCl – 4,7; CaCl₂ – 2,52; MgCl₂ – 1,2; KH₂PO₄ – 0,6; NaHCO₃ – 4,7; C₆H₁₂O₆ – 11.

Результаты исследования подвергнуты статистическому анализу с использованием программы BioStat2009 Professional. 5.8.4. (M±m). Различия оценивали по критерию Манна – Уитни, считая их статистически значимыми при p<0,01 [2].

Результаты исследования

Установлено, что в присутствии раствора Кребса время начала агглютинации (ВНА) в различных сериях варьировалось от 10 до 23 с (табл.), а в среднем оно составило 14±1 с.

Показано, что адреналин в концентрациях 10^{-10} - 10^{-6} г/мл, как правило, дозозависимо снижает ВНА (табл., серии 1-4, 13-15). Это отражает и рис. 2, на

котором представлены результаты всех 60 опытов с адреналином, который снижал ВНА соответственно до 91 %, 84 %*, 83 %*, 79 %* и 78 %* от

контроля (* – различие с контролем статистически значимо, $p < 0,01$ по критерию Манна – Уитни).

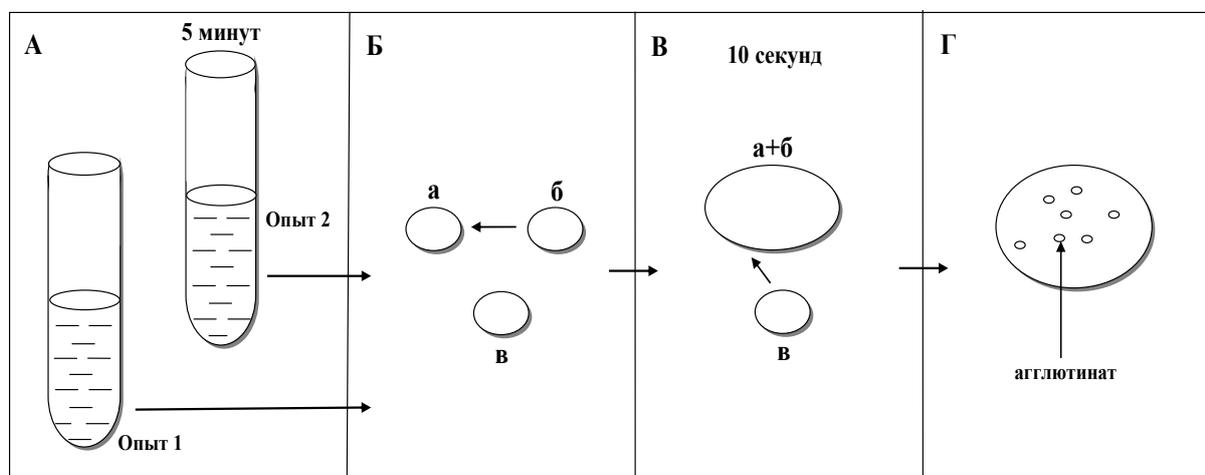


Рис. 2. Схема эксперимента. Объяснения в тексте

Примечание: а – кровь, б – вещество в исследуемой концентрации, в – изоагглютинирующая сыворотка группы $O_{ab}(I)$; панели А, Б, В, Г – последовательность этапов эксперимента

Неселективный блокатор альфа-АР ницерголин, неселективный блокатор бета-АР обзидан и селективный блокатор бета₁-АР атенолол (все 10^{-10} – 10^{-6} г/мл, серии 5, 6 и 7), а также селективный блокатор альфа₂-АР йохимбин в концентрации 10^{-6} г/мл (серия 2) сами по себе не влияли на ВНА, что позволяло использовать их в концентрации 10^{-6} г/мл при анализе механизма действия адреномиметиков.

Показано, что ницерголин (10^{-6} г/мл) полностью блокировал способность адреналина снижать ВНА (табл., серия 1), йохимбин (10^{-6} г/мл, серия 2) и атенолол (10^{-6} г/мл, серия 4) не влияли, а обзидан (10^{-6} г/мл, серия 3) усиливал ее.

Все это означает, что активация альфа₁-АР повышает скорость агглютинации, а активация бета₂-АР снижает ее; активация альфа₂-АР и бета₁-АР, скорее всего, не имеет отношения к изменению скорости агглютинации под влиянием адреналина.

Установлено, что агонист альфа₁-АР фенилэфрин в концентрациях 10^{-10} – 10^{-6} г/мл во всех сериях (табл., серии 8, 9 и 12) дозозависимо снижает ВНА ($p < 0,01$). Судя по суммарным результатам, рассчитанным для 20 опытов с фенилэфрином (рис. 2), ВНА уменьшалась соответственно до 90 %, 80 %*, 78 %*, 73 %* и 69 %* от контроля. Этот эффект фенилэфрина статистически значимо не отличался от эффекта адреналина. Показано, что ницерголин (10^{-6} г/мл, серия 8) полностью снимал способность фенилэфрина уменьшать ВНА ($p < 0,01$), а обзидан (10^{-6} г/мл, серия 9) не влиял на нее.

В целом результаты опытов с фенилэфрином подтверждают наш вывод о том, что активация альфа₁-АР ускоряет агглютинацию.

При действии бета₂-адреномиметика гинипрала (10^{-10} – 10^{-7} г/мл, серии 10 и 11) ВНА составило соответственно 105 %, 105 %, 103 % и 96 % от контроля, то есть ожидаемого увеличения ВНА не наблюдалось (табл. и рис. 2). Оно не проявилось и при действии ницерголина (10^{-6} г/мл, серия 10), то есть при блокаде альфа-АР. Обзидан (10^{-6} г/мл, серия 11) не изменял эффект гинипрала.

Таким образом, в этих опытах нам не удалось убедительно показать, что активация бета₂-АР снижает скорость агглютинации.

Показано (табл.), что ингибитор фосфолипазы A_2 индометацин (10^{-6} г/мл, серия 13), антагонист кальмодулина трифлуоперазин (10^{-6} г/мл, серия 14) и блокатор Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов хлорид бария (10^{-6} г/мл, серия 15) полностью блокируют способность адреналина снижать ВНА ($p < 0,01$). Аналогичные данные получены при исследовании влияния индометацина (10^{-6} г/мл, серия 12) на эффект фенилэфрина.

Все это означает, что для того, чтобы адреналин, взаимодействуя с альфа₁-АР, повысил скорость агглютинации эритроцитов, должны активироваться фосфолипаза A_2 и кальмодулин и повыситься проницаемость мембраны для Ca^{2+} .

Обсуждение

На основании результатов наших исследований можно утверждать, что способность адрена-

лина повышать скорость агглютинации эритроцитов в условиях *in vitro* обусловлена активацией альфа₁-АР, и этому в определенной степени препятствует активация бета₂-АР. Наиболее вероятно, что при активации альфа₁-АР в эритроцитах происходят 4 основных процесса, связанные с активацией 4 белков (фосфолипазы С, кальмодулина, протеинкиназы С и фосфолипазы А₂):

1) Активация фосфолипазы С. Приводит к образованию диацилглицерола и инозитолтрифосфата (ИФ₃), под влиянием которого открываются ИФ₃-зависимые Са²⁺-каналы, что повышает вход Са²⁺ в эритроцит и компенсаторно увеличивает выход К⁺ через Са²⁺-зависимые калиевые каналы (Гардош-эффект). Это снижает число отрицательных зарядов на поверхности эритроцитов (дзета-потенциал), что способствует их сближению и тем самым ускоряет процесс агглютинации.

2) Активация кальмодулина за счет увеличения концентрации Са²⁺ в эритроците. Комплекс «Са²⁺-кальмодулин» активирует Са²⁺-кальмодулин-зависимую протеинкиназу. Она расщепляет белки цитоскелета и тем самым уменьшает площадь белково-липидных контактов. Это, помимо увеличения микровязкости липидного слоя эритроцитарной мембраны, снижает отрицательный заряд мембраны, что способствует сближению эритроцитов и повышению скорости агглютинации.

3) Активация протеинкиназы С под влиянием образовавшегося ранее диацилглицерола и повышенного содержания Са²⁺ в эритроците. Приводит к тем же последствиям, что и активация Са²⁺-кальмодулин-зависимой протеинкиназы.

4) Активация фосфолипазы А₂ за счет увеличения концентрации Са²⁺ в эритроците. Приводит к разрушению фосфолипидов мембраны эритроцитов, в результате чего они утрачивают связь с белками цитоскелета, что увеличивает микровязкость мембраны, снижает ее отрицательный заряд, тем самым способствует сближе-

нию эритроцитов и повышению скорости агглютинации.

Выявленная нами способность адреналина повышать скорость агглютинации может быть использована для оценки адренореактивности эритроцитов. Как известно [1, 7, 9, 10,], сегодня считается, что эритроциты являются индикаторами, или маркерами, адренореактивности внутренних органов. Поэтому в настоящее время идет активный поиск способов оценки адренореактивности эритроцитов.

Выводы:

1. Адреналин снижает ВНА эритроцитов человека (то есть повышает скорость агглютинации). Этот эффект блокируется ницерголином, индометацином, трифлуоперазином и хлоридом бария, усиливается обзиданом и не изменяется под действием йохимбина и атенолола.

2. Гинипрал не изменяет скорость агглютинации эритроцитов, в то время как фенилэфрин, подобно адреналину, повышает ее. Эффект фенилэфрина блокируется ницерголином и индометацином, но не изменяется при воздействии обзиданом.

3. Результаты исследования позволяют заключить, что скорость агглютинации эритроцитов возрастает при активации альфа₁-АР и снижается при активации бета₂-АР. Активация альфа₂- и бета₁-АР не влияет на скорость агглютинации.

4. Повышение скорости агглютинации эритроцитов, вызванное активацией альфа₁-АР, объясняется снижением числа отрицательных зарядов на поверхности эритроцитов, вызванным выходом К⁺ через Са²⁺-зависимые К⁺-каналы (за счет активации фосфолипазы С), и изменениями структуры мембраны (в результате активации фосфолипазы А₂, кальмодулина, Са²⁺-кальмодулин-зависимой протеинкиназы и протеинкиназы С).

Библиографический список

1. Володченко, А. И. Адренореактивность эритроцитов женщин на различных этапах репродуктивного процесса, определяемая по адренозависимой агглютинации [Текст] / А. И. Володченко, Е. А. Колокольцева, В. И. Циркин, А. А. Костяев // Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология (от ангиогенеза до центрального кровообращения) : Материалы международной научной конференции. – Ярославль : изд-во ЯГПУ им. К. Д. Ушинского. – С. 6–7.

2. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.

3. Жибурт, Е. Б. Трансфузиология [Текст] : учеб-

ник / Е. Б. Жибурт. – СПб. : Питер, 2002. – 736 с.

4. Коротяев, А. И., Бабич, С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология [Текст] : учебник / А. И. Коротяев, С. А. Бабич. – СПб. : «Специальная Литература», 1998. – 592 с.

5. Крутецкая, З. И. Механизмы внутриклеточной сигнализации [Текст] / З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова. – СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2003. – 208 с.

6. Мищенко, Н. В. Особенности агглютинации эритроцитов в зависимости от места проживания доноров / Н. В. Мищенко, С. Н. Родыгина, Е. Н. Сизова,

О. В. Тулякова // Вестник Новосибирского государственного университета. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 142–146.

7. Стаселович, Л. Ю. Роль некоторых иммунологических и гуморальных факторов в прогнозировании перенасивания беременности [Текст] / Л. Ю. Стаселович, В. В. Лазуренко, О. В. Мерцалова // Международный медицинский журнал. – 2008. – № 2. – С. 65–69.

8. Сторожок, С. А. Зависимость стабильности деформабельности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета [Текст] / С. А. Сторожок, А. Г. Санников, А. В. Белкин. – Тюмень : «Изд-во ТюмГУ», 1997. – Т. 3. – С. 140

9. Стрюк, Р. И. Адренореактивность и сердечно-сосудистая система [Текст] / Р. И. Стрюк, И. Г. Длуская. – М. : Медицина, 2003. – 160 с.

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

11. Horga J. A beta-2-adrenergic receptor activates adenylate cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentrations / J. Horga, J. Gisbert, J. De Agustin, M. Hernandez, P. Zapater // Blood Cells Mol Dis. – 2000. – Vol. 26, № 3. – P. 223–228.

12. Kaestner L. Ion channels in the human red blood cell membrane: Their further investigation and physiological relevance / L. Kaestner, I. Bernhardt // Bioelectrochemistry. – 2002. – 55 – P. 71–74.