

УДК 616.36 – 001 – 092.98

АДРЕНОРЕАКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПОТОМСТВА САМОК КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛКОГОЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ОНТОГЕНЕЗА

Мальгина Т.Д., Брюхин Г.В.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: tatyana-malgina@rambler.ru

Известно, что плазматическая мембрана эритроцитов содержит адренорецепторы. Катехоламины связываются с ними и изменяют агрегационную способность эритроцитов. Существует метод определения адренореактивности эритроцитов (АРЭ), основанный на оценке скорости оседания эритроцитов (СОЭ) в присутствии адреналина. Известно, что по β -адренореактивности мембраны эритроцитов можно судить об общей адренореактивности организма. В настоящем исследовании обсуждаются проблемы, связанные с адренореактивностью эритроцитов в ответ на различные концентрации адреналина у потомства самок крыс с алкогольным поражением печени. В опытной группе крысам моделировали алкогольную интоксикацию, для чего в течение 3-х месяцев поили только 15% спиртом. Затем самок скрещивали с самцами, получали потомство, которое исследовали на 30-е, 45-е, 60-е сутки онтогенеза. Уровень АРЭ определяли в венозной крови животных по изменению СОЭ в присутствии адреналина в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-13} ммоль/л. Рассчитывали среднюю величину отклонений СОЭ от контрольной пробы во всех исследуемых концентрациях адреналина. При понижении СОЭ под воздействием адреналина АРЭ имеет положительный знак – антиагрегационный тип АРЭ, при повышении СОЭ – отрицательный знак, агрегационный тип АРЭ. Внутри каждого типа АРЭ мы выделили 3 степени выраженности АРЭ – слабовыраженную, умеренную и сильную. Результаты исследования демонстрируют отличия агрегатных свойств и адренореактивности эритроцитов потомства опытной и интактной групп животных. На 30-е сутки онтогенеза у опытных крыс наблюдается умеренновыраженная степень агрегационного типа АРЭ. На 45-е и 60-е сутки онтогенеза агрегация имеет слабовыраженную степень. У интактной группы на 30-е и 45-е сутки наблюдается слабовыраженная степень агрегации эритроцитов. На 60-е сутки появляется антиагрегационный тип АРЭ слабовыраженной степени.

Ключевые слова: патология печени, потомство, адренореактивность, агрегация эритроцитов, алкогольное поражение печени

RBC ADRENOREACTIVITY IN PROGENY OF FEMALE RATS WITH EXPERIMENTAL ALCOHOL-INDUCED LIVER INJURY IN DIFFERENT PERIODS OF ONTOGENESIS

Malgina T.D., Bryukhin G.V.

Budget Educational Institution of Higher Professional Education «South Ural State Medicine University», Chelyabinsk, e-mail: tatyana-malgina@rambler.ru

RBC plasma membrane is known to contain adrenoreceptors. Catechol amines bind to them and change RBC aggregation capacity. There is a method of defining RBC adrenoreactivity (RBC-AR) based on evaluation of erythrocyte sedimentation rate (ESR) in the presence of epinephrine. It is known that β -adrenoreactivity of RBC membrane allows of estimating total adrenoreactivity of the body. This research paper discusses problems connected with RBC adrenoreactivity in response to different epinephrine concentrations in progeny of female rats with alcohol-induced liver injury. We modeled alcohol intoxication in rats from experimental group by giving them only 15% alcohol to drink for 3 months. Then we cross-mated females with males and got progeny which was studied on the 30th, 45th and 60th days of ontogenesis. RBC-AR was defined in venous blood by ESR change in the presence of epinephrine in concentrations from 10^{-5} to 10^{-13} $\mu\text{mol/L}$. We calculated standard deviations of ESR from control sample for all studied epinephrine concentrations. At ESR decrease upon epinephrine impact RBC-AR has positive sign – antiaggregant type of RBC-AR, at ESR increase it has negative sign, aggregant type of RBC-AR. Within each type of RBC-AR we distinguished 3 degree of RBC-AR manifestation – mild, moderate and strong. Research results show how RBC aggregative properties and adrenoreactivity in progeny of experimental group differ from those in progeny of intact group. On the 30h day of ontogenesis in experimental rats we observe moderate degree of aggregant type of RBC-AR. On the 45th and 60th days of ontogenesis aggregation has a mild degree of manifestation. Intact group has a mild degree of RBC aggregation on the 30th and 45th days. On the 60 day antiaggregant type of RBC-AR with a mild degree of manifestation appears.

Keywords: liver pathology, progeny, RBC adrenoreactivity, RBC aggregation, alcohol-induced liver injury

Важное место в нейрогуморальной регуляции витальных функций организма и гомеостатическом равновесии занимает симпатно-адренальная система. Она опосредует свою деятельность через катехоламины, которые оказывают влияние на метаболические, иммунные процессы, работу нервной системы, стресс и адаптационные процессы

[2]. Известно, что плазматическая мембрана эритроцита содержит сложный рецепторный аппарат, важным компонентом которого являются адренорецепторы. Катехоламины и адренергические препараты, связываясь с мембранными рецепторами эритроцитов, изменяют их функциональное состояние, которое можно определить по изменению

агрегационной способности красных клеток [1]. Одним из важных способов косвенного измерения степени агрегации эритроцитов является оценка скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Существует метод определения адренореактивности эритроцитов (АРЭ), основанный на оценке СОЭ в присутствии адреналина, который при контакте с мембранными рецепторами приводит к уменьшению агрегации эритроцитов [9]. Проведены исследования, позволяющие считать β -адренореактивность мембраны эритроцитов системным маркером адренореактивности организма в целом [5]. В литературе описаны различные способы изучения влияния адренергических веществ на мембрану эритроцитов на фоне их блокады β -адренорецепторов по изменению СОЭ у людей с различной патологией. Выявлено, что при активации симпатико-адреналовой системы, сопровождающейся появлением в циркулирующей крови катехоламинов, наблюдается десенситизация мембранных рецепторов эритроцитов, которая сопровождается увеличением их адренореактивности и снижением адренореактивности организма в целом. При снижении в крови медиаторов адренореактивность эритроцитарной мембраны снижается, а адренореактивность организма увеличивается [5].

В связи с вышесказанным целью нашего эксперимента явился анализ адренореактивности эритроцитов у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на белых лабораторных беспородных крысах-самках (60 взрослых половозрелых самок) и их потомстве на 30-е, 45-е и 60-е сутки постнатального развития (всего 60 крыс из 30 помётов). Для достижения поставленной цели в группе исследования моделировалась хроническая алкогольная интоксикация [3]. Предварительно крысы распределялись на предпочитающих этанол и только воду, что позволило использовать их для моделирования алкоголизма [4]. Хроническую алкогольную интоксикацию осуществляли 15% раствором этанола, который был единственным источником жидкости для самок в течение трёх месяцев. По окончании этого срока алкоголизацию прекращали, животных скрещивали с интактными самцами, получали потомство. Контрольная группа крыс в течение 3-х месяцев получала питьевую воду. Все животные содержались в виварии при естественном освещении, с соблюдением стандартов температурного и пищевого режимов, со свободным доступом к стандартному рациону и поилкам. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием лабораторных животных», утверждёнными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77. Исследования проходили с учётом суточных и сезонных колебаний. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Повреждение печени у половозрелых самок крыс

подтверждали на основании характерных морфологических (жировая дистрофия гепатоцитов, расширение синусоидных капилляров, дисконфлексация гепатоцитов, умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы печени), биохимических (увеличение сывороточных трансаминаз, уровней общего и прямого билирубина, гамма-глобулина) и иммунологических изменений (титр противопечёночных антител 1:64 и 1:128) показателей.

Для определения АРЭ готовили раствор адреналина на физиологическом растворе 0,9% в концентрациях от 10^{-5} до 10^{-13} ммоль/л [10]. Цитратную венозную кровь разливали по 0,5 мл в 6 пробирок. Для проведения адренозависимой СОЭ в 5 пробирок с кровью добавляли по 0,05 мл раствора адреналина соответствующей концентрации (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} , 10^{-13} ммоль/л). Для определения контрольной СОЭ в 1 пробирку добавляли 0,05 мл физиологического раствора. Полученную смесь из каждой пробирки набирали в капилляр Панченкова до отметки «0» в объёме 0,1 мл, ставили капилляры в штатив и определяли результат СОЭ через 1 час. Значения АРЭ рассчитывали по разнице отклонения СОЭ каждой концентрации адреналина от исходного контрольного значения. Итоговый результат АРЭ представляли в виде среднего значения суммы отклонений СОЭ во всех концентрациях адреналина. При снижении в присутствии адреналина показателя СОЭ относительно контрольного значения АРЭ имеет положительный знак – агрегация эритроцитов уменьшается. При повышении экспериментальной СОЭ относительно исходного контрольного уровня – значения АРЭ с отрицательным знаком, т.е. агрегация усиливается [10]. Полученные результаты были обработаны на компьютере с использованием программы Statistica SPSS версия 17.0. Учитывая небольшую выборку животных, достоверность полученных результатов определяли при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Кровь, несмотря на константу своего химического и морфологического состава, является одним из ранних убедительных маркеров происходящих в организме преобразований под действием различных физиологических и патологических процессов. Под воздействием стрессовых факторов наблюдается выработка клетками мозгового слоя надпочечников катехоламинов и их выделение симпатической нервной системой [8]. Эффекты катехоламинов оказывают влияние практически на все функции организма. В первую очередь эритроциты и другие форменные элементы крови соприкасаются с адреналином и норадреналином, которые могут оказывать влияние на эти клетки. В результате при взаимодействии катехоламинов с мембранными рецепторами красных клеток могут изменяться реологические характеристики крови [6]. Адекватным методом оценки реологических свойств крови является изучение адренореактивности эритроцитов.

Согласно данным литературы, адренореактивность мембраны эритроцитов можно считать системным показателем адренореактивности организма [5].

Выделяют 3 типа АРЭ [10], в т.ч. антиагрегационный – когда средние значения отклонений СОЭ от исходного уровня имеют положительный знак, т.е. после внесения адреналина значения СОЭ были ниже контрольного уровня СОЭ; при агрегационном типе средние отклонения СОЭ от исходного уровня имеют отрицательный знак, т.е. после внесения адреналина значения СОЭ были выше контрольного уровня; ареактивный тип – отсутствуют значимые отклоне-

ния СОЭ от контрольного значения СОЭ при добавлении вышеуказанных концентраций адреналина. Оценка функционального состояния эритроцитов проводится по степени выраженности АРЭ с учётом знака: плюс при снижении величины СОЭ, минус – при увеличении СОЭ.

Очевидно, что адреналин может вызывать как снижение, так и рост агрегации эритроцитов, в зависимости от чувствительности их мембранных рецепторов [6]. В ходе исследования нами были выявлены возрастные различия наблюдаемых показателей в исследуемых группах. Полученные результаты отражены в таблице.

Адренореактивность эритроцитов у потомства матерей с экспериментальным хроническим алкогольным поражением печени на разных этапах онтогенеза.

Группа / Показатель	30-й день		45-й день		60-й день	
	Контроль (n = 10)	Опыт (n = 10)	Контроль (n = 10)	Опыт (n = 10)	Контроль (n = 10)	Опыт (n = 10)
АРЭ, балл	2,06 ± 0,35	7,9 ± 0,42*	1,2 ± 0,07	3,1 ± 0,46*	1,75 ± 0,02	2,06 ± 0,06*
Тип АРЭ	Агрегационный	Агрегационный	Агрегационный	Агрегационный	Антиагрегационный	Агрегационный
Степень выраженности АРЭ	-1	-2	-1	-2	+1	-1

Примечание. * – результат статистически достоверен по сравнению с контролем (p < 0,05).

Анализ полученных нами данных показывает, что адреналин на 30-е сутки онтогенеза приводит к росту агрегации эритроцитов у потомства в обеих группах, причем у алкогольной группы агрегация в 3,8 раза выше, чем у контрольной группы. На 45-е сутки жизни крыс наблюдается аналогичная склонность эритроцитов обеих групп к агрегации в присутствии адреналина, причём АРЭ опытной группы в 2,6 раза превосходит АРЭ интактной группы. Яркие достоверные различия наблюдаются у потомства на 60-й день онтогенеза. У крыс контрольной группы в динамике онтогенеза проявляются изменения АРЭ противоположной направленности. Появляется АРЭ антиагрегационного типа, т.е. агрегация эритроцитов в присутствии адреналина на этом сроке снижается, прослеживается позитивная реакция в реологической картине крови по сравнению с 30-ми и 45-ми сутками. Наблюдаемое нами усиление агрегации эритроцитов у потомства в обеих исследуемых группах на 30-е и 45-е сутки можно считать признаком патологического процесса. Вместе с тем существует понятие о компенсаторной гиперагрегации эритроцитов, когда ухудшение некоторых показателей может являться благоприятным признаком

и предшествовать последующему улучшению состояния [7]. В подтверждение наших предположений таковые изменения видны у крысят контрольной группы на 60-е сутки онтогенеза. Можно сделать вывод, что умеренная интенсификация агрегации эритроцитов на ранних сроках у данной группы носила компенсаторный характер. У крысят алкогольной группы на всех сроках наблюдения, в т.ч. на 60-е сутки, продолжает сохраняться АРЭ с агрегационным характером взаимодействия эритроцитов с адреналином. У крысят подопытной группы данная тенденция может свидетельствовать о возможной гемокоагуляции, что не может являться благоприятным признаком и вряд ли носит компенсаторный характер, скорее всего являясь деструктивным процессом [7, 12].

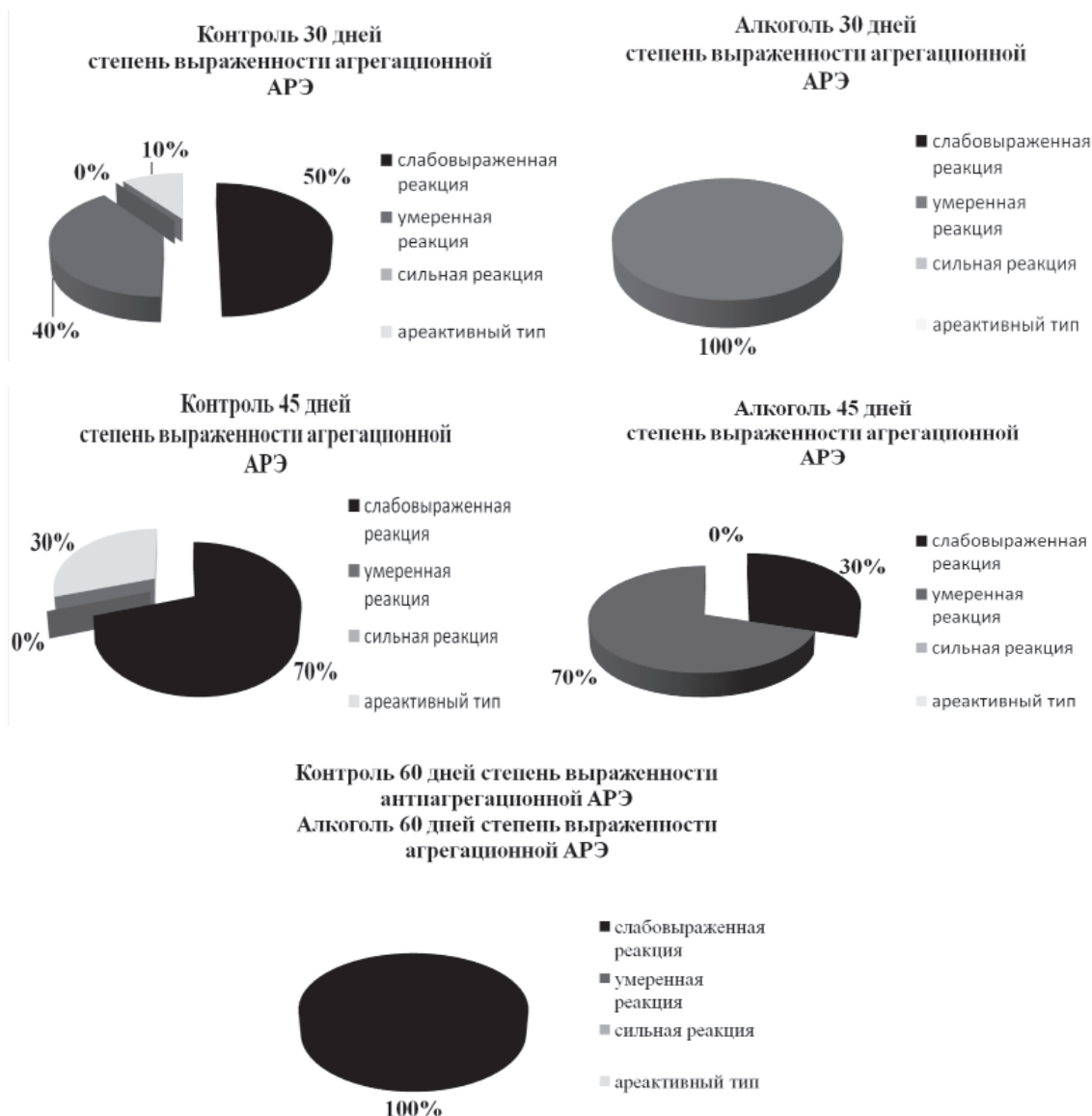
Для оценки степени выраженности АРЭ у потомства самок крыс мы выделили 3 уровня реактивности под влиянием разных концентраций адреналина. Слабовыраженная агрегационная реакция имеет границы увеличения СОЭ от 1,1 до 3 мм/ч, умеренная степень характеризуется повышением СОЭ от 3,1 до 6 мм/ч от контрольного значения, сильная агрегационная реакция – от 6,1 и выше мм/ч. При слабовыраженной антиагрегационной реакции СОЭ

снижается относительно исходного уровня от 1,1 до 3 мм/ч, при умеренной степени СОЭ распределяется в диапазоне от 3,1 до 6 мм/ч, при сильной АРЭ СОЭ характеризуется снижением от 6,1 и выше мм/ч.

Анализируя данные таблицы, можно сделать вывод, что на 30-е и 45-е сутки постнатального развития у крысят обеих групп наблюдается агрегационный тип АРЭ, однако у опытной группы степень выраженности АРЭ умеренная (-2), тогда как в контроль-

ной группе АРЭ слабовыраженной степени (-1). На 60-е сутки онтогенеза у опытной группы сохраняется слабовыраженная степень АРЭ (-1), у крысят интактной группы наблюдается антиагрегационная реакция СОЭ слабовыраженной реактивности (+1).

Также в нашем исследовании у потомства крыс мы распределили степени реактивности у каждой исследуемой группы внутри полученных у них типов АРЭ на различных сроках (рисунок).



Структура АРЭ по степени выраженности у потомства самок крыс алкогольной и контрольной групп на 30-е, 45-е и 60-е сутки онтогенеза

Если рассмотреть возрастную динамику агрегационного типа АРЭ у опытной группы, то можно проследить значимое убывание величины умеренновыраженной

реакции с 30-го по 60-й день онтогенеза с абсолютным преобладанием на 60-й день слабовыраженной АРЭ с агрегационным эффектом. Следовательно, у потомства

алкоголизированных крыс с возрастом не только увеличиваются агрегационные свойства эритроцитов по сравнению с контрольной группой, но и ослабевает степень реагирования адренорецепторов на адреналин. Встречаемость слабого уровня реагирования эритроцитов на адреналин в контрольной группе достоверно увеличивается с возрастом к 45-м суткам, по сравнению с 30-ми сутками онтогенеза.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что у потомства крыс с алкогольным поражением печени на 30-е, 45-е, 60-е сутки постнатального развития наблюдается разный тип реагирования СОЭ в присутствии адреналина в экспериментальных группах. АРЭ является объективным показателем оценки реологических свойств крови при происходящих в организме адаптационных и патологических процессах. Реологические характеристики крови имеют важное значение для формирования вязкости цельной крови и обеспечения эффективного тканевого газообмена. Важно отметить, что гемореологические изменения могут появиться как при патологических процессах, так и при действии внешних факторов, компенсаторно-приспособительных механизмов, адаптационных сдвигов, сопровождающихся активацией гемодинамики и системы красной крови [11]. Таким образом, по результатам исследования можно сделать вывод, что адренорецепция клеточных мембран эритроцитов выявляет ранние стадии патологических изменений в организме.

Список литературы

1. Авакян А.Э., Ткачук В.А. Структурная и функциональная организация систем передачи сигнала через рецепторы, сопряженные с G-белками // Российский физиологический журнал. – 2003. – Т. 89, № 2. – С. 219–239.
2. Андреев С.В., Кобкова И.Д. Роль катехоламинов в здоровом и больном организме. – М.: Медицина, 1970. – 296 с.
3. Буров И.В. Изменение гонадотропной функции гипофиза крыс при развитии экспериментального алкоголизма // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1986. – № 6. – С. 675–676.
4. Кампов-Полевой А.Б. Фармакология экспериментального алкоголизма // Сб. трудов НИИ Фармакологии АМН СССР. – М.: 1982. – С. 130–136.
5. Малкова М.И., Булашова О.В., Хазова Е.В. Определение адренореактивности организма по адренорецепции клеточной мембраны при сердечно-сосудистой патологии // Практическая медицина. – 2013. – № 3 (71). – С. 20–23.
6. Муравьев А.В., Муравьев А.А. Вне- и внутриклеточные механизмы изменения агрегации эритроцитов // Физиология человека. – 2005. – Т. 31, № 4. – С. 108–112.
7. Соколова И.А. Агрегация эритроцитов: некоторые вопросы и гипотезы // Росс. журнал биомеханики. – 2011. – Т. 15, № 1 (51). – С. 7–22.

8. Тихомирова И.А., Муравьев А.В., Гусева Е.П. Адренореактивность организма и агрегатные свойства эритроцитов в норме и при патологии // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 63–68.
9. Циркин В.И., Дворянский С.А., Джергения С.Л. β-Адреномиметический эффект сыворотки крови человека и животных // Физиология человека. – 1997. – Т. 23, № 3. – С. 88–97.
10. Шамратова В.Г., Хазипова И.Р., Багаутдинова Р.Ш. Способ оценки адренореактивности эритроцитов // Патент России № 2471189. 27.12.2012. Бюлл. № 36.
11. Шамратова В.Г., Хазипова И.Р. Взаимосвязи адренореактивности эритроцитов с некоторыми макро- и микро-реологическими параметрами крови у здоровых людей // Вестник Башкирского университета. – 2011. – Т. 16, № 4. – С. 1219–1222.
12. Schmid-Schonbein H. Pathological red cell aggregation (clump aggregation). Molecular and electrochemical factors // Bibliotheca Anatomica. – 1977. – № 16. – P. 484–489.

References

1. Avakyan A.E., Tkachuk V.A. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal – Russian Physiological Journal*, 2003, vol. 89, no. 2, pp. 219–239.
2. Andreyev S.V., Kobkova I.D. *Rol' katekholaminov v zdorovom i bol'nom organizme* [The role of catechol amines in healthy and diseased organism]. Moscow, Medicine, 1970. 296 p.
3. Burov I.V. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1986, no. 6, pp. 675–676.
4. Kampov-Polevoy A.B. *Farmakologiya eksperimental'nogo alkogolizma* [Experimental Pharmacology alcoholism]. Moscow, 1982. pp. 130–136.
5. Malkova M.I., Bulashova O.V., Khazova Ye.V. *Prakticheskaya meditsina – The Journal of Practical Medicine*, 2013, no. 3 (71), pp. 20–23.
6. Muravyev A.V., Muravyev A.A. *Fiziologiya cheloveka – Human Physiology*, 2005, vol. 31, no. 4, pp. 108–112.
7. Sokolova I.A. *Rossiyskiy zhurnal biomekhaniki – Russian Journal of Biomechanics*, 2011, vol. 15, no. 1 (51), pp. 7–22.
8. Tikhomirova I.A., Muravyev A.V., Guseva Ye.P. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya*, 2006, vol. 5, no. 2, pp. 63–68.
9. Tsirkin V.I., Dvoryayanskiy S.A., Dzhergeniya S.L. *Fiziologiya cheloveka – Human Physiology*, 1997, vol. 23, no. 3, pp. 88–97.
10. Shamratova V.G., Khazipova I.R. *Vestnik Bashkirskogo universiteta – Bashkir University Bulletin*, 2011, vol. 16, no. 4, pp. 1219–1222.
11. Shamratova V.G., Khazipova I.R., Bagautdinova R.S.H. *Sposob otsenki adrenoreaktivnosti eritrotsitov*. Patent Rossii no. 2471189. 27.12.2012., Byul. no. 36.
12. Schmid-Schonbein H. *Bibliotheca Anatomica*, 1977, no. 16, pp. 484–489.

Рецензенты:

Кривохижина Л.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Челябинск;

Сашенков С.Л., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 24.11.2014.