

Voloh F. O. Evaluation methods of α and β 2-adrenoreactivity of human erythrocytes to change their osmotic resistance under the effect of adrenaline and adrenoblockers. Journal of Education, Health and Sport. 2017;7(1):684-691. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1463028> <http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/6196>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 27.03.2017. Revised 28.03.2017. Accepted: 27.01.2017.

Evaluation methods of α and β 2-adrenoreactivity of human erythrocytes to change their osmotic resistance under the effect of adrenaline and adrenoblockers

F. O. Voloh

Chuguev Central District Hospital, Kharkov Region, Ukraine;

e-mail: psyhotyp@gmail.com

Abstarct

According to the data of literature the main evaluation methods of α and β 2-adrenoreactivity of human erythrocytes have been described to change their osmotic resistance under the effect of adrenaline and blockers. Nowadays β -blockers are used in many cardiac diseases to prevent sudden cardiac death. They are acute coronary syndromes, chronic coronary heart disease (CHD), arterial hypertension (AH), arrhythmias, congestive heart failure (CHF), hypertrophic cardiomyopathy, mitral valve prolapse. β -blockers are also used in such diseases and syndromes as migraine, glaucoma, thyrotoxicosis. The article presents the results of a study of evaluation methods to identify functional changes, diagnosis and prognosis of chronic cerebral ischemia of hypertensive genesis of different stages. That's why the author applied a complex approach. It based primarily on the fact of inhibition of hemolysis of erythrocytes placed in the hyposmotic medium in the presence of beta-blocker, on visual fixation of the change of erythrocyte aggregation under the effect of adrenaline and other adrenergic agents, and on the registration of changes in osmotic resistance of erythrocytes under the influence of β -adrenoblockers. According to the results the indicators of these methods of evaluation of beta-adrenoreactivity allow to differentiate the stages of the disease at the cellular level quickly and reliably. They depend on the physiological state and

patients' sex. The indicators can also be an objective criterion for assessing the effectiveness of treatment and optimize approaches to prevent progression of cerebral circulation disorders.

Key words: chronic cerebral ischemia of hypertensive genesis, beta-adrenoreactivity, adrenoblocker, beta - adrenoreceptor apparatus.

СПОСОБИ ОЦІНКИ А І В2-АДРЕНОРЕАКТИВНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ЩОДО ЗМІНИ ЇХ ОСМОТИЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ПІД ВПЛИВОМ АДРЕНАЛІНУ І АДРЕНОБЛОКАТОРІВ

Ф. О. Волох

Чугуївська центральна районна лікарня

Вступ. Відомо, що однією з головних причин, що призводять до порушення гемодинаміки головного мозку, є змінення реологічних властивостей крові та ураження ендотелію судин [1], функції яких порушуються задовго до прояву клінічних та морфологічних ознак захворювань [2]. В патогенезі гіпертензивної форми дисциркуляторної енцефалопатії (ГДЕ) визначну роль відіграє артеріальна гіпертензія (АГ), що викликає порушення тонуусу артерій, який супроводжується вазоспазмом, обумовлений як вазопресорними стимулами, так й порушенням реакції рецепторних систем судинної стінки на вазодепресорний вплив. Крім того, у клінічній практиці часто спостерігається як гіпердіагностика, так і недостатня діагностика ДЕ [3]. Для точного діагнозу разом з отриманням анамнестичних даних та ретельним дослідженням необхідно проведення низки параклінічних методів, серед яких провідними є нейровізуалізаційні (КТ, МРТ) та нейропсихологічні, та методи дослідження стану судин [4].

Метою даного дослідження було визначення діагностично-прогностичних критеріїв тяжкості перебігу хронічних церебральних ішемій (ХЦІ) гіпертензивного генезу з використанням біофізичних підходів, що дозволяють оперативно та надійно оцінювати стан симпатoadреналової системи (САС) на клітинному рівні [5] та оцінити ефективність проведеної терапії з урахуванням структурно-функціонального стану бета-адренергічної реактивності (бета-АРМ) хворих на ГДЕ I і II стадії.

Дослідження функціонального стану бета-адренорецепторного апарату проводили із використанням еритроцитів, вилучених з венозної крові пацієнтів та

стабілізованих антикоагулянтном (гепарин та ЕДТА в залежності від подальшого методу дослідження) [6].

Оцінку бета-АРМ здійснювали з використанням методу зміни осмотичної резистентності мембран еритроцитів при впливі бета-блокаторів (показник бета-АРМ). Даний метод засновано на факті гальмування гемолізу еритроцитів, поміщених в гіпоосмотичне середовище, в присутності бетаблокатора (ББ, пропранолол) [7, 8]. Результатами дослідження є парні вимірювання оптичної щільності (ОЩ) надосадової рідини суспензії еритроцитів на довжині хвилі $\lambda = 540$ нм та порівняння дослідних зразків з контрольними (до яких не додавали ББ) [8]. Знижений ступінь АРМ (> 20 ум. од.) є наслідком зменшення кількості чутливих до блокатора бета-АРц внаслідок їх десенсибілізації, що також є проявом системної адаптації організму до стресу [9].

Відповідно до типу розподілу даних та кількості елементів вибірок здійснювали оцінку статистичної значущості відмінностей вимірюваних величин за допомогою t-тесту (t-критерій Ст'юдента), критерію Фішера і тесту Манн–Уїтні [10]. Для оцінки відмінностей між парними значеннями (ті ж самі пацієнти, досліджувані повторно в динаміці лікування) використано критерій Уїлкоксона для зв'язкових вибірок (Wilcoxon sign-rank test). Для визначення ступеню та спрямованості зв'язків між ознаками застосовували кореляційний аналіз, при цьому статистичним критерієм є коефіцієнт кореляції Пірсона та величини p-value. Важливо відмітити, що в роботі при аналізі даних у всіх випадках заданий рівень значимості $\alpha = 5\%$, при якому всі значення p-value $< 0,05$ є статистично значущими.

Відомо ще кілька способів оцінки адренореактивності еритроцитів, які можна розглядати як аналоги заявленого способу:

1) Спосіб оцінки адренореактивності еритроцитів, заснований на візуальній фіксації зміни агрегації еритроцитів під впливом адреналіну і інших адренергічних засобів [11]. Спосіб заснований на фіксації зміни здатності еритроцитів до агрегації під впливом адреналіну і інших адренергічних засобів. При цьому агрегація еритроцитів оцінюється візуально за допомогою світлової мікроскопії. Вважається, що в основі зростання агрегації еритроцитів під впливом адреналіну і інших агоністів адренорецепторів лежить підвищення концентрації іонів Ca^{2+} в еритроцитах, що індукує Гардош-ефект, тобто витік з еритроцитів іонів K^+ [12].

2) Спосіб визначення гіперадренергічної форми гіпертонічної хвороби [13]. В основі цього методу лежить реєстрація зміни осмотичної резистентності еритроцитів під впливом β -адреноблокатора пропранололу (обзидан). Цей спосіб є модифікацією

методу Ідельсона Л.І., запропонованого в 1974 році. Згідно з цим методом, осмотична резистентність еритроцитів, поміщених на 30 хвилин в гіпотонічну середу (0,40% розчин NaCl), визначається за інтенсивністю гемолізу еритроцитів. Для цього за допомогою фотоелектроколориметра визначають величину екстинкції рідини, в якій знаходилися еритроцити. У способі (для оцінки β -адренореактивності еритроцитів їх експонують в гіпотонічному середовищі спільно з β -адреноблокатором. Ступінь зменшення гемолізу еритроцитів під впливом блокатора говорить про рівень β -адренореактивності - чим більше величина зниження екстинкції рідини, тим вище β -адренореактивність еритроцитів. У нормі, значення цього показника (β -АРМ) становить 2-20% [8]. Більш високі значення вказують на зниження β -адренореактивності еритроцитів. На думку низька β -адренореактивність еритроцитів може бути наслідком десенситизації блокаторів, що виникає при підвищенні інтенсивності адренергічних впливів на органи і тканини, наприклад, при стресі. З цієї причини спосіб рекомендований для визначення у пацієнтів рівня стресу, або для вивчення природи артеріальної гіпертензії [5, 6, 13].

Спосіб оцінки α - і β 2-адренореактивності еритроцитів, що пропонується, апробований при дослідженні крові 10 молодих чоловіків та 13 жінок. Реалізація запропонованого способу полягає в тому, що у досліджуваних загальноприйнятим способом проводиться забір 0,02 мл капілярної крові. Цей обсяг крові додається в пробірку, що містить 0,2 мл 0,9% розчину NaCl, гепарин (1 МО/мл) і CaCl₂ (2,5 мМ). Потім до 0,02 мл цієї розведеної в 10 разів крові додається в пробірку, що містить 0,4 мл 3% розчину NaCl, що дає кінцеве розведення крові в 200 разів і дозволяє, використовуючи класичний метод мікроскопічного підрахунку еритроцитів в лічильній камері Алфьорова-Бюржера з сіткою Горяєва, оцінити вихідне число еритроцитів в 1 л крові (абсолютний контроль). Після цього готується ряд з 11 пробірок. Перша пробірка містить 0,2 мл дистильованої води (ДВ), в якій концентрація CaCl₂ становить 2,5 мМ. Ця пробірка служить контролем, що дозволяє оцінити стійкість еритроцитів до 45-секундної експозиції в гіпотонічному середовищі при відсутності в ній адренергічних засобів (K45). Наступні п'ять пробірок містять по 0,2 мл ДВ, в якій крім CaCl₂ (2,5 мМ) міститься адреналін у відповідній концентрації (10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ г / мл). Ці пробірки служать для оцінки впливу зазначених концентрацій адреналіну на стійкість еритроцитів до 45-секундної експозиції в гіпотонічному середовищі при адренорецепторах. Решта п'ять пробірок також містять по 0,2 мл ДВ, в якій крім CaCl₂ (2,5 мМ) є адреноблокатори (10⁻⁶ г/мл), в тому числі атенолол (селективний блокатор

β_1 -АР) і ніцерголін (неселективний блокатор α -АР), і адреналін у відповідній (10-10, 10-9, 10-8, 10⁻⁷, 10⁻⁶ г / мл) концентрації. Ці пробірки служать для оцінки впливу зазначених концентрацій адреналіну на стійкість еритроцитів до 45-секундної експозиції в гіпотонічному середовищі в умовах одночасної блокади α -АР і β_1 -АР, тобто при наявності інтактних β_2 -АР (Оадр + бл). Після підготовки пробірок до дослідження в кожному з них додається по 0,02 мл 10-кратного розведення крові, а рівно через 45 с (від моменту додавання цієї порції крові) в кожному пробірці для зупинки гемолізу додається по 0,2 мл 6% розчину NaCl. Це призводить до кінцевого розведення крові в кожній пробірці в 200 разів і до створення середовища, що містить 3% розчин NaCl. Далі проводиться підрахунок числа негемолізованих еритроцитів в кожній пробірці (в розрахунку на 1 л крові або на 80 малих квадратів сітки Горяєва). Число негемолізованих еритроцитів в кожній з десяти пробірок можна виразити в процентах до ЧНЕ, що збереглися при 45-секундної експозиції крові в ДВ без адренергічних засобів, тобто в 1-й пробірці (К45).

Замість капілярної крові можна використовувати венозну кров [6, 13, 15]. Для цього 1,0 мл венозної крові вносять в пробірку, що містить 0,1 мл розчину гепарину в концентрації 1 МО/мл. Для подальшого дослідження ОРЕ і адренореактивності використовують 0,02 мл гепаринизованої венозної крові, тобто проводять з нею ті ж самі дії, що описані вище відносно 0,02 мл капілярної крові.

Спосіб може бути використаний для оцінки адренореактивності еритроцитів інших фракцій еритроцитів, тобто Ф30, Ф60, Ф90 та ф120. З цією метою для всіх 11 пробірок замість 45-секундної експозиції в ДВ застосовують відповідно 30-, 60-, 90- або 120-секундну експозицію [14].

У всіх випадках зростання ОРЕ відбувається при активації α -АР і, в меншій мірі, β_1 -АР, а зниження ОРЕ виникає при активації β_2 -АР. Тому підвищення ОРЕ під впливом адреналіну (при відсутності в середовищі адреноблокаторів) розцінюється як домінування ефективності активації α -АР, а зниження ОРЕ - як домінування ефективності активації β_2 -АР. Зміна ОРЕ при блокаді α -АР і β_1 -АР ніцерголін і атенололом дозволяє оцінити внесок всіх популяцій АР, в тому числі α -АР, β_1 -АР і β_2 -АР у відповідь еритроцита на вплив адреналіну [14, 16]. Зокрема, посилення здатності адреналіну зниження ОРЕ вказує на вираженість ефекту активації β_2 -АР, а відсутність подібного явища говорить про нульовий ефект активації цих рецепторів [17]. Нами встановлено, що самі по собі адреноблокатори ніцерголін і атенолол в концентраціях

10-6 г / мл і окремо і при спільному впливі не впливають на ОРЕ при 45-секундній експозиції в ДВ.

У всіх випадках при оцінці адренореактивності або інших видів реактивності еритроцитів для підрахунку числа еритроцитів можна використовувати класичний візуальний метод з використанням камери Алфьорова-Бюргера з сіткою Горяєва (в наших дослідженнях був використаний мікроскоп типу Биолам ЛОМО ІМ 13 при 80 і 400-кратних збільшеннях), або цитофотометричні методики, що використовуються в сучасній клінічній практиці Beta-ARM AGAT [8].

Переваги методу (відмінні риси):

1. Дозволяє оцінити адренореактивність будь-яких фракцій еритроцитів, що відрізняються між собою за тривалістю збереження своєї структури при експозиції в дистильованій воді, а, отже, і за тривалістю життя.

2. Різні способи методу дозволяють оцінювати диференційовано α - і β -адренореактивність еритроцитів. При наявності селективних агоністів і адреноблокаторів, способи дають можливість оцінити α_1 -, α_2 -, β_1 , β_2 - і β_3 -адренореактивність, тобто ефективність активації всіх видів адренорецепторів еритроцитів.

3. Метод – легкий для виконання в будь-якій клінічній лабораторії, оснащеної світловим мікроскопом і камерами для підрахунку еритроцитів. Для підвищення продуктивності праці клінічних лаборантів і наукових працівників можна застосовувати сучасні цитофотометричні способи.

4. Не вимагає великого обсягу крові – досить 0,04 мл капілярної крові або 0,4 мл венозної крові.

Висновки

Запропонований метод є універсальним, що не має статевих обмежень; може бути використаний для оцінки адренореактивності жінок, які перебувають на будь-якій стадії репродуктивного процесу, а також у пацієнтів з різними патологіями, але перш за все - кардіocereбральними. Інформативність методу потенційно цікава іта має велике значення для діагностики та прогнозу перебігу захворювань в процесі реабілітації хворих, у багатьох областях медицини від кардіології та неврології до фізіотерапії та медичної реабілітації.

Аналіз отриманих показників у різних групах показав чітку різницю між станом бета-адренореактивності, яка залежить від статі та тяжкості захворювання. При цьому кількісну оцінку стану бета-адренорецепторної активності еритроцитів від 26 у. о. до 45

у. о. і вище слід вважати ознакою гіперадренергічних станів в результаті прогресування патології.

Виявлені ефекти на основі комплексного вивчення характеру змін бета-адренорецепції в ході лікування різними методами показав, що даний підхід може бути використаний в якості вивчення структурно-функціонального стану бета-адренорецепторної системи та є доцільним для оцінки ефективності терапії.

References:

1. Voloshin P.V. Endothelial dysfunction with cerebrovascular pathology / Voloshin P.V., Malakhov VA, Zavgorodnya AN - Kharkiv .: Tarbut Laam, 2007. - 136 p.
2. Malakhov VA Initial stages of chronic cerebral ischemia. Kh.: Shust, 2006. 125-126.
3. Zozulya I.S. Basic principles of diagnostics, diagnosis, treatment and prevention of cerebral stroke / I.S. Zozulya, Yu.I. Golovchenko, AI Zozulya, O.P. Onoprienko, AO Volosovets // Ukrainian Medical Journal. - 2015. - No. 5. - P. 34-38. - Access mode: http://nbuv.gov.ua/UJRN/UMCh_2015_5_13.
4. Tkachenko O. V. Ischemic stroke: prognostic aspects of clinical, laboratory and neurotrophic characteristics / O. V. Tkachenko, I.O. Tsoha. - Donetsk: Publisher Zaslavsky O.Yu. - 2012. - 112 p.
5. R. I. Stryuk, I.G. Dlusskaya Adrenoreactivity and cardiovascular system. - M. Medicine, 2003.- 160 p.
6. Patent of Ukraine №108233 on utility model "Method of diagnosis of chronic and acute disorders at the cellular level", Arkhipova KA, Malakhov VA, Krasov P.S., Lichko V.C. / Posted 04/01/2016, Published Jul 11, 2016, Bul. No. 13
7. Adamyan L.V., Smolnikova T.Yu., Dlusskaya I.G., Stryuk R.I., Lyashko E.S., Beilin A.L., Mishin SV, Gerasimov A.N., Braginskaya S. .G. Method of assessing the adrenoreactivity of the organism (β -ARM) in pregnant women to predict the course of labor // Problems of reproduction. - 2006, №1. - P.91-97.
8. Beta-ARM AGAT. – РЕЖИМ доступу: <http://www.agat.ru/documents/instructions/4994/>.
9. Arkhipova K.A., Krasov P.S., Fisun A.I., Nosatov A.V., Lychko V.S., Malakhov V.O. Microwave Dielectrometry as a Tool for the Characterization of Blood Cell Membrane Activity for In Vitro Diagnostics. International Journal of Microwave and Wireless Technologies. 2017;9(8):1569–1574.

10. Lang, T.A. How to describe the statistics in medicine: Per. from English / T.A. Lang, M. Sesik - M.: 2010. - 486 p.

11. Erythrocyte adrenoreactivity assessment, based on the ability to increase the red blood cell agglutination rate // V.I. Tsirkin, M.A. Gromova, D.A. Kolchin // Fundamental research. - 2008. - №7. - p. 59 - 60.

12. Babin A.P., Troshkina N.A., Tsirkin V.I., Dvoryansky S.A., Guseva E.V. Evaluation of α - and β -adrenoreactivity of human erythrocytes by changing their osmotic resistance under the influence of adrenergic agents // Arterial hypertension. - 2006 - T.12. Appendix C.7-8.

13. Dlusskaya I.G., Stryuk R.I. The method of determining the hyperadrenergic form of hypertensive disease. The patent of the Russian Federation №2026552. BI, 1995, №1.

14. Beleva S.V., Vershinina E.Yu., Korchemkina E.V., Sukhova A.Yu., Tsirkin V.I., Prokazova N.V., Kostyaev A.A. The effect of adrenaline and lysophosphatidylcholine (LPC) on the osmotic resistance of erythrocytes (WEM) // Advances in modern natural science. - 2006. - №8. - C.69-70.

15. Muravev A.V. Methods for studying the erythrocyte deformability in experiment and clinic // A.V. Ants, I.A. Tikhomirova, A.A.Muraviev // Clinical laboratory diagnostics: scientific-practical. journals - 2010. - №1. - pp. 28 - 32.

16. Sominsky V.N., Okun K.V. Increased osmotic resistance of red blood cells under the influence of propranolol. // Laboratory work. - 1981. - №9. - P.525-527.

17. Chekman I.S., Budarin L.I., Nurschuenko N.E. et al. Interaction of β -adrenergic agents with myocardial plasma membranes // Bul. An expert. biology and medicine. - 1985. - T 85, No. 8. - S. - P.208-210.