

Министерство науки и высшего образования России
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сыктывкарский государственный университет имени Питирима Сорокина»
Институт естественных наук
Кафедра биологии

Допустить к защите
Зав. кафедрой биологии
д.б.н., профессор Загирова С.В.

«__» _____ 20__ г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ДЕЙСТВИЕ ФУРОСЕМИДА И АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА
ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Направление подготовки 06.03.01 «Биология»

Исполнитель: обучающаяся 242 группы Дурягина Арина Павловна
Научный руководитель: к.б.н., доцент Петрова Наталья Борисовна

Сыктывкар 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1 Обзор литературы.....	6
1.1 Строение мембраны эритроцитов.....	6
1.2 Осмотическая резистентность эритроцитов и факторы, влияющие на неё.....	7
1.3 Симпато–адреналовая система: строение, функции и механизм передачи гормонального сигнала.....	9
1.4 Адренореактивность и методы её оценки.....	11
1.5 Фуросемид – петлевой диуретик.....	12
1.5.1 Фармакология	12
1.5.2 Побочные действия	13
1.5.3 Лекарственное взаимодействие.....	13
1.6 Метаболизм, фармакодинамика и побочные действия ацетилсалициловой кислоты.....	14
1.6.1 Фармакодинамика	14
1.6.2 Фармакокинетика.....	14
1.6.3 Побочные действия.....	15
1.6.4 Лекарственное взаимодействие.....	15
Глава 2 Материалы и методы исследования.....	16
2.1 Материалы исследования.....	16
2.2 Методы исследования.....	16
2.2.1 Метод определения осмотической резистентности и адренореактивности эритроцитов человека.....	17
2.3 Статистические методы.....	20
Глава 3 Результаты исследования и их обсуждение.....	21
3.1 Осмотическая резистентность эритроцитов человека.....	21
3.2 Осмотическая резистентность эритроцитов при действии пропранолола. Адренореактивность организма человека.....	25

3.3 Действие фуросемида на осмотическую резистентность и адренореактивность эритроцитов.....	32
3.4 Действие ацетилсалициловой кислоты на осмотическую резистентность и адренореактивность эритроцитов	38
3.5 Сравнительный анализ действия фуросемида и ацетилсалициловой кислоты на функциональные свойства мембраны эритроцитов.....	43
Выводы.....	44
Список литературы.....	45
Обозначения и сокращения.....	52

ВВЕДЕНИЕ

От физико–химического состояния мембраны эритроцитов (Эр) зависит процесс активного транспорта ионов, особенности функционирования мембран–ассоциированных ферментов, характер взаимодействия клетки со средой. Мембрана составляет всего 1 % от массы Эр, но именно она определяет гомеостаз и его функциональное состояние [27]. Плазматическая мембрана обладает уникальными рецепторно–сигнальными функциями регуляции важнейших клеточных процессов [13].

Для определения физико–химических характеристик, функциональных свойств, измеряют осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ). ОРЭ уменьшается по мере старения Эр [19]. Поэтому, у зрелых и пожилых людей она ниже, а у детей, особенно новорожденных, ОРЭ больше, поскольку содержится большое количество ретикулоцитов.

Для оценки состояния симпато–адреналовой системы (САС) организма используются различные фармакологические средства. Наиболее информативными являются методы с фармакологической блокадой адренорецепторов антагонистами. Наиболее часто используемым антагонистом адренорецепторов является пропранолол (ПП). Фармакологическое название – анаприлин. Это лекарственное средство раньше использовалось в медицинской практике для лечения сердечно–сосудистых заболеваний. ПП снижал частоту сердечных сокращений, расширял сосуды за счёт блокады адренорецепторов [43].

Фуросемид – диуретик, применяется в медицине как мочегонное средство, действует на всем протяжении петли Генли, подавляет активный транспорт различных ионов, выводит воду. Кроме того, он может ингибировать белок полосы 3 (б.п.3) мембраны Эр, изменяя протонный транспорт через мембрану [36], влиять на дыхательную функцию, и, следовательно, на транспорт CO_2 . Изменение его функционального состояния может влиять на резистентность к различным факторам через встроенные в мембрану рецепторы [36]. На мембране Эр находятся рецепторы

к различным гормонам, наиболее распространёнными являются инсулин, ангиотензин, окситоцин, в том числе адреналин, норадреналин и дофамин [50].

На мембране Эр присутствуют в большом количестве β_2 – адренорецепторы – основные рецепторы, по которым можно оценить состояние САС [54]. Через адренорецептор гормональный сигнал САС транслируется на внутриклеточных процессах Эр. Согласно данным радиолигандных исследований, в одном Эр человека содержится до 90–300 β -АР [18].

Ацетилсалициловая кислота (далее – АСК), или аспирин – является агентом противовоспалительного звена стрессорного ответа: АСК изменяет состояние фосфолипазы A_2 в мембране (вызывает блокаду активности фермента). При расщеплении арахидоновой кислоты образуются простагландины (ПГ), которые являются медиаторами воспаления [2].

Известен как антитромбический препарат [51]. Отдельные аспекты взаимодействия АСК с цитоплазматической мембраной не ясны. Поэтому более углубленное исследование механизма повреждающего действия кислоты ацетилсалициловой на цитоплазматическую мембрану является актуальным.

В связи с тем, что недостаточно известно, как эти вещества действуют на функциональные свойства мембраны эритроцитов, была поставлена **цель**:

Изучить функциональные свойства мембраны эритроцитов человека (осмотическую резистентность и адренореактивность) при действии фуросемида и ацетилсалициловой кислоты.

Для достижения цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать осмотическую резистентность и адренореактивность эритроцитов
 - А) в контроле и при действии бета-адреноблокатора пропранолола (ПП);
 - Б) при действии фуросемида как мембранно – активного вещества –активатора протонного транспорта;
 - В) при действии ацетилсалициловой кислоты – агента противовоспалительного звена стрессорного ответа.
2. Провести сравнительный анализ действия фуросемида и АСК на функциональные свойства мембраны эритроцита.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Строение мембраны эритроцитов

В настоящее время принятой моделью строения мембраны является жидкостно–мозаичная, предложенная Дж. Николсоном и С. Синджером в 1972 г. Согласно модели, мембрана – это подвижная мозаика, образованная из белков (около 50 %) и липидов (около 40 %) [4]. Мембрана Эр выглядит следующим образом: на внешней поверхности расположены липиды, сиаловая кислота, антигенные олигосахариды. Внутренняя поверхность представлена гликолитическими ферментами, натрием, кальцием, АТФ–азой, гликопротеинами и гемоглобином. Липиды эритроцитарной мембраны регулируют подвижность внутримембранных белков, обеспечивая нормальное функционирование ферментов и рецепторов, также регулируют трансмембранный транспорт веществ, иммунный ответ Эр [34]. Толщина мембраны составляет около 10 нм, она примерно в миллион раз более проницаема для анионов, чем для катионов [10]. Липидный состав мембраны Эр: 25 % – холестерол, 60 % – фосфоглицериды, 5–10 % – гликолипиды и незначительное количество эфиров холестерола, свободных жирных кислот, сульфатов и триглицеридов. В составе фосфолипидов 17 % – сфингомиелин, 25 % – фосфатидилхолин, 22 % – фосфатидилэтаноламин и 10 % – фосфатидилсерин. Среди жирных кислот преобладают пальмитиновая, олеиновая, линолевая и линоленовая [29].

Белковый состав мембраны характеризуется строго упорядоченной структурой, белковые молекулы занимают определенное положение относительно липидного бислоя и в большинстве имеют ориентацию, перпендикулярную бислою. Белковый каркас состоит в основном из спектрин–актинового комплекса, связанного с мембраной через б.п. 3 и гликофорин посредством анкирина и белок полосы 4.1. Б.п.3 содержит на N – конце кислый участок, связанный с некоторыми гликолитическими ферментами и молекулой гемоглобина. Спектрин–актиновая сеть образует треугольные ячейки под поверхностью мембраны, стабилизируя ее и ограничивая латеральную подвижность мембранных белков [29].

Мембрана Эр составляет всего 1 % от веса Эр, но именно она определяет его гомеостаз и функциональное состояние [27]. Нормальное функционирование эритроцитарной мембраны зависит от её микровязкости, которая определяется, в основном, биолипидным слоем [13] и зависит от накопления насыщенных жирных кислот [7, 39], холестерина [50]. Мембрана должна быть в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому в живых системах при продолжительном понижении температуры окружающей среды наблюдается адаптационное изменение состава мембран, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода [5]. В работах В.Ф. Антонова и сотрудников доказано, что при фазовых переходах из гель – в жидкокристаллическое состояние и обратно в липидном бислое образуются сквозные каналы радиусом 1 – 3 нм, по которым через мембрану могут переноситься ионы и низкомолекулярные вещества. Вследствие этого при температуре фазового перехода резко увеличивается ионная проводимость мембраны. Увеличение ионной проводимости мембран может спасти клетку от криоповреждений (повреждения при охлаждении) за счёт увеличения выхода из клетки воды и солей – привести к нарушению её барьерной функции, что препятствует кристаллизации воды внутри клетки. По-видимому, первичный механизм криоповреждений биологических мембран связан с фазовым переходом в гель-состояние. Поэтому биологические мембраны содержат большое количество холестерина, уменьшающего изменения в мембране, сопровождающие фазовый переход. Молекулы холестерина, располагаясь между фосфолипидными молекулами, упорядочивают бислой в жидком и разупорядочивают в твердом состоянии и таким образом уменьшают различия жидкокристаллической и гель-структур [5].

1.2 Осмотическая резистентность эритроцитов и факторы, влияющие на неё

Эр представляют собой самую многочисленную и самую изученную популяцию клеток крови. Физико-химические свойства Эр определяются ионной проницаемостью их мембран. Резистентность мембран по отношению к

лизирующим факторам среды определяются с помощью тестов, в числе которых весьма привлекательна ОРЭ [8].

ОРЭ позволяет косвенно судить о функциональных возможностях клеток в норме и при различных физических состояниях [8]. Под ОРЭ называют устойчивость их в гипотонических растворах (т.е. растворы с меньшей концентрацией раствора натрия хлорида). Начальную стадию гемолиза, которая выражена лишь появлением лёгкого желтоватого оттенка жидкости, обозначают как минимальную резистентность Эр. Концентрация раствора, вызвавшего полный гемолиз, определяет собой максимальную резистентность. Колебания между той и другой носят название ширины резистентности [40]. Минимальная резистентность Эр определяется максимальной концентрацией гипотонического раствора натрия хлорида (в серии растворов с постепенно уменьшающейся концентрацией), при которой начинается разрушение наименее устойчивых Эр, находящихся в растворе в течение 3 ч. А максимальная резистентность определяется максимальной концентрацией гипотонического раствора натрия хлорида, вызывающего в течение 3 ч разрушение всех Эр помещенной в этот раствор крови. У здоровых людей минимальная резистентность Эр равна 0,45 – 0,50 %, максимальная – 0,35 – 0,40 % раствора натрия хлорида [12].

Природные условия Крайнего Севера для здоровья организма значительно более тяжёлые, чем в средней полосе. Поэтому, ОРЭ может отражать воздействие природных условий на организм человека. Так, Денисенко О. Д. говорит о повышении ОРЭ из артериальной крови у детей, рожденных в летний период. Далее автор ссылается на то, что резистентность Эр обуславливается физико–химическими свойствами плазмы крови, состоянием клеточной мембраны Эр, количеством и структурой гемоглобина [48].

ОРЭ возрастает при повышении температуры гемолизирующего раствора и падает при его снижении. Наиболее вероятной причиной температурных сдвигов ОРЭ являются изменения упругих свойств оболочки [37].

Стоит отметить еще один фактор – возраст клеток, который определяет ОРЭ. Особенности устойчивости клеток отражают своеобразие физиологического

состояния эритропоеза новорожденных. Известно, что ОРЭ уменьшается по мере старения Эр [20]. Поэтому, у зрелых и пожилых людей этот показатель ниже, а у детей, особенно новорожденных, ОРЭ больше [20].

1.3 Симпато–адреналовая система: строение, функции и механизм передачи гормонального сигнала

Мозговой слой надпочечников и симпатическая нервная система составляют анатомическую и физиологическую единицу, называемую САС.

Регуляция секреторной деятельности мозгового слоя надпочечников осуществляется симпатическими импульсами [23]. САС осуществляет регуляторное адаптационно–трофическое влияние на все процессы жизнедеятельности человека, что позволяет при изменении окружающих условий поддерживать гомеостаз [16].

САС является составной частью вегетативной нервной системы и делится на три отдела: 1) центральный, 2) периферический и 3) мозговой слой надпочечников и другие скопления хромоаффинных клеток.

Центральный отдел симпатической нервной системы образуется холинергическими нейронами, тела которых расположены в боковом промежуточном веществе спинальных сегментов. Аксоны этих клеток через передние рога выходят из спинного мозга и в симпатических ганглиях контактируют с адренергическими нейронами, дающими начало постганглионарным адренергическим нервам [53].

В головном мозге также обнаружены адренергические структуры, которые образуют норадренергические и дофаминергические пути – это группа клеточных тел, расположенных в варолиевом мосту и в продолговатом мозге, даёт начало большим восходящим и нисходящим трактам. Дофаминергические пути образуются длинными и короткими отростками тел дофаминергических нейронов, находящихся в чёрном веществе, в ножках мозга и в гипоталамусе [53].

Периферический отдел симпатической нервной системы образуется нейронами, тела которых сосредоточены в так называемых сегментарных ганглиях, а также в вертебральных и коллатеральных ганглиях. Аксоны нервных клеток ганглия

иннервируют сердце, гладкие мышцы кровеносных сосудов и внутренних органов, железы и интрамуральные ганглии [1].

Клетки мозгового слоя надпочечников и ряд скоплений, разбросанных по ходу сосудов, хорошо окрашиваются солями хрома, поэтому их называют хромаффинными клетками. В мозговом слое надпочечников млекопитающих, в частности лабораторных животных, имеются два типа секреторных клеток: норадреналин-образующие – Н – клетки и адреналин – образующие – А – клетки. Исключение составляют лишь морские свинки и кролики – у них в мозговом слое надпочечников имеются только А – клетки [19].

В области окончаний адренергических нервов и хромаффинных клеток надпочечников протекают многочисленные процессы, обеспечивающие нормальное функционирование САС. Это биосинтез, резервирование, высвобождение, рецепция, захват и ферментативная инактивация медиаторов симпатической нервной системы – норадреналина и дофамина, и гормонов мозгового слоя надпочечников – адреналина и норадреналина [1]. По своей природе катехоламины представляют собой производные пирокатехина – 3,4 – диоксифенола, иначе называемого катехолом, откуда и название всей группе, включающей в себя адреналин, норадреналин и дофамин [1].

Будучи одновременно гормонами мозгового слоя надпочечников и медиаторами нервной системы, они участвуют в создании необходимых условий, обеспечивающих жизнедеятельность организма в меняющихся условиях внешней среды. Катехоламины оказывают действие на мозг, сердце и кровообращение, гладкую мускулатуру и целый ряд других физиологических функций [23]. Синтез катехоламинов в мозговом слое надпочечников стимулируется нервными импульсами, поступающими по чревному нерву. Выделяющийся в синапсах ацетилхолин взаимодействует с холинергическими рецепторами никотинового типа и возбуждает нейросекреторные клетки надпочечника. Синтез катехоламинов может увеличиваться под действием инсулина и глюкокортикоидов, а также при гипогликемии [46].

1.4 Адренореактивность и методы её оценки

САС является важнейшим компонентом нейрогуморальной регуляции организма. Изменения функционального состояния САС способствует адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды, к формированию его стрессовой реакции и патогенезу наиболее распространенных заболеваний [9]. Одним из проявлений системных реакций организма в ответ на изменение САС является адренореактивность. Форменные элементы крови первыми соприкасаются с биологическими активными соединениями, которые транспортируются к месту приложения и могут влиять на функциональные свойства самих клеток крови [49].

Перспективным объектом для получения информации о состоянии адренорецепторов в организме человека являются клетки крови, а именно Эр [41]. Изначально Эр считались достаточно редуцированными клетками и рассматривались как резервуары для транспорта кислорода и углекислого газа, однако впоследствии было установлено, что они обладают значительным набором сигнальных молекул [56]. Мембрана Эр имеет функционально-активные адренорецепторы. В настоящее время не вызывает сомнения важная роль САС [56].

Поскольку мембрана Эр содержит функционально активные β_2 -АР, были предложены способы оценки состояния САС по изменениям физико-химических показателей Эр в присутствии β -адреноблокатора – пропранолола [14, 41]. 1) В.Н. Соминский изучал осмотическую резистентность Эр при действии пропранолола [43] Местом приложения многих воздействий служат такие структурные элементы мембраны, как гликокаликс и Р-АР. Показано, что блокада β -АР в пропранололе существенно влияет на устойчивость Эр по отношению к гемолитикам [42]; их связывание с агонистами изменяет эластичность мембраны. Известно, что пропранолол эффективно замедляет гипотонический гемолиз *in vitro* [41]. Механизм этого явления не выяснен, но показано, что он конкурентно определяется концентрацией катехоламинов, опосредован β -АР мембран Эр и хорошо отражает состояние β -АР в тканях [41]. 2) И.Л. Голенда первым предложил метод кинетического исследования АР Эр крови человека, основанный на регистрации

кинетики кислотного гемолиза в присутствии β -адреноблокатора – пропранолола [14]. 3) Другой метод (И.Г. Длусская) определения АР по величине β -адренорецепции клеточных мембран (β -АРМ), основан на изменении осморезистентности Эр в присутствии адреноблокирующего агента [44].

Степень взаимодействия адренорецепторов с адренергическими веществами определяется рядом факторов и может изменяться при различных патологических состояниях или периода жизни человека [47]. Рядом авторов установлено изменение АР Эр при различной патологии сердечно–сосудистой системы [44], эндокринопатиях [33], онкопатологиях [45], воспалительных заболеваниях органов малого таза у женщин [16].

1.5 Фуросемид – петлевой диуретик

Диуретики являются составной частью терапии сердечно–сосудистых заболеваний, в частности таких распространенных, как сердечная недостаточность (СН) и артериальная гипертония (АГ).

Уменьшение артериального давления (АД) при АГ и объема циркулирующей крови при СН благоприятно отражается на результатах лечения диуретиками и улучшает прогноз [60, 61].

Биодоступность фуросемида существенно отличается интер– и индивидуальной вариабельностью в пределах 10 – 90%, всасывание фуросемида изменяется при приеме пищи [52, 58, 62]. Фуросемид представляет собой сульфаниламидное соединение – производное антраиловой кислоты с метилфуриловым радикалом. Отличительной особенностью является быстро наступающее действие (3–4 минут после внутривенного введения), хотя продолжительность его сравнительно невелика. По силе действия он превосходит большинство других диуретиков.

1.5.1 Фармакология

Фуросемид действует на всем протяжении толстого сегмента восходящего колена петли Генле, подавляет активный транспорт ионов. Существенно усиливает почечный кровоток (за счёт увеличения синтеза простагландинов в почках).

Увеличивает выведение бикарбонатов, фосфатов, ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , повышает рН мочи [63].

Быстро и достаточно полно всасывается при любом пути введения. Биодоступность при приеме внутрь составляет обычно 60 – 70 % [63].

Эффективен при сердечной недостаточности (как острой, так и хронической), улучшает функциональный класс сердечной недостаточности, т.к. снижает давление наполнения левого желудочка [63].

1.5.2 Побочные действия

Пациенты, которым назначается фуросемид, должны быть предупреждены о возможном развитии симптомов, связанных с чрезмерной потерей жидкости и/или электролитов. Существует вероятность развития ортостатической артериальной гипотензии. При этом медленное изменение положения тела способно в определенной степени предупреждать снижение артериального давления при переходе из горизонтального в вертикальное положение.

Добавление препаратов калия при терапии фуросемидом и/или соблюдение определенного диетического режима (прием пищи, богатой калием) необходимо для предотвращения развития гипокалиемии [63].

1.5.3 Лекарственное взаимодействие

Комбинация фуросемида и ацетилсалициловой кислоты временно уменьшают клиренс креатинина у пациентов с хронической почечной недостаточностью. Сообщается о случаях увеличения концентрации азота мочевины крови, сывороточного креатинина и калия и увеличение массы тела при одновременном приеме фуросемида и аспирина [63].

У пациентов, получающих фуросемид и салицилаты, могут развиваться токсические эффекты из-за наличия конкуренции в почечной экскреции и, следовательно, замедления выведения салицилатов [63].

1.6 Метаболизм, фармакодинамика и побочные действия ацетилсалициловой кислоты

1.6.1 Фармакодинамика

АСК относится к группе НПВП (нестероидные противовоспалительные препараты). Сравнение НПВП по их основным фармакодинамическим эффектам (болеутоляющему, жаропонижающему, противовоспалительному) позволяет сказать о том, что аспирин является наименее активным [31].

АСК подавляет агрегацию тромбоцитов, уменьшает их адгезию путём угнетения циклооксигеназы и синтеза тромбоксана A_2 . По мере увеличения концентрации препарата в плазме крови сначала развивается антиагрегатный эффект, затем жаропонижающий и болеутоляющий, а далее урикозурический и противовоспалительный (уровни салицилата в плазме в мг/мл соответственно: до 4, от 4 до 6, от 8 до 10, 28 – 48 – противовоспалительная область), 30 – 40 мг АСК блокируют агрегацию в течение 96 ч, необратимое действие на циклооксигеназу может быть уже при дозе 180 мг/сут. В дозе 1000 – 1500 мг/сут ингибирует до 90 % тромбоцитарных функций, увеличивает венозный кровоток через 1 – 3 ч на 3 – 7 дней, что соответствует продолжительности жизни тромбоцита [31].

В суточной дозе 2 – 3 г незначительно усиливает фибринолиз и снижает синтез витамин К–зависимых факторов свёртывания в печени, снижает уровень липидов в плазме, в малых дозах уменьшает содержание глюкокортикоидов и увеличивает уровень инсулина плазмы [31].

1.6.2 Фармакокинетика

Аспирин быстро всасывается в желудке и тонкой кишке. Биодоступность около 100 %. При приёме желточного буфера скорость всасывания её снижается, но увеличивается растворимость и ускоряется переход в тонкую кишку. АСК быстро гидролизуется до салициловой кислоты эстеразами крови и тканей [31].

1.6.3 Побочные действия

Невысокие дозы АСК способны учащать и увеличивать объем кровотечений при небольших операциях. АСК приводит к снижению продукции слизи, синтеза гликопротеидов, что является основой механизма её повреждающего действия на слизистую оболочку желудка (кровотечения из желудочно–кишечного тракта). Повреждения и кровотечения возникают чаще при дефиците витамина С, высокой кислотности, забросе желчи в желудок, хронические повреждения ЖКТ, нарушение режима питания и дозирования АСК. Длительный приём АСК в дозе 2 – 3 г/сут вызывает потерю через ЖКТ до 10 мл/сут крови у 10 %, а в дозе 3 – 6 г/сут – у 70 % больных. Всё это может привести в железодефицитной анемии (чаще у женщин). Также препарат может вызвать гемолиз у больных с дефицитом глюкозо–6–фосфатдегидрогеназы в Эр, а длительный приём больших доз способствует развитию дефицита фолиевой кислоты и может привести к макроцитарной анемии [31].

1.6.4 Лекарственное взаимодействие

АСК усиливает действие антикоагулянтов, всех НПВП (кроме индометацина вследствие уменьшения его всасывания под влиянием АСК), гипогликемизирующее действие производных сульфонилмочевины (нарушается их экскреция канальцами почек, снижается связывание с белками плазмы крови и увеличивается освобождение инсулина; уменьшается урикозурический эффект бутадiona и других урикозурических средств (например, антурана), т.е происходит угнетение выделения мочевой кислоты через почки [31].

Наблюдается снижение диуретического эффекта – спиронолактона, фуросемида (т.к диуретический эффект зависит от активности ПГ в почках, а их образование подавлено салицилатами).

Ульцерогенный эффект АСК потенцируется кофеином и алкоголем, снижается циметидином, глюкагоном и антацидами. При приёме АСК может изменяться концентрация в крови общего белка, кальция, холестерина, тироксина, мочевой кислоты, что следует учитывать при лабораторной диагностике [31].

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Материалы исследования

Экспериментальная часть работы была проведена на кафедре биологии Сыктывкарского государственного университета в период 2019 г с 11 июня по 13 июля. Для исследования использовалась венозная кровь доноров мужчин и женщин в возрасте от 23 до 35 лет, предоставленная сотрудниками ГУ «Республиканская станция переливания крови» в г. Сыктывкаре.

Общее количество проб по фуросемиду составило: 28 (14/14 мужская и женская кровь соответственно). Количество проб по ацетилсалициловой кислоте: 19 (9/10 женская и мужская соответственно). Средняя температура на момент взятия пришлась на 23,5 °С, минимальная – 19 °С, максимальная – 28 °С.

2.2 Методы исследования

Проведено 3 серии экспериментов

1 серия экспериментов – контрольная. Исследование действия ПП на Эр
человека

2 серия – исследование ОРЭ при отдельном и комбинированном с ПП действии
фуросемида

3 серия – исследование ОРЭ при отдельном и комбинированном с ПП действии АСК

Во всех сериях экспериментов использовалась методика определения ОР и АР по методу Длусской, Стрюк [44].

2.2.1 Метод определения осмотической резистентности и адренореактивности эритроцитов человека

ОРЭ оценивалась по оптической плотности надосадочной жидкости (ОПн.ж.) в буферном растворе (состав: натрий фосфорнокислый двузамещённый 12 – водный – 17,9 г/л, натрий фосфорнокислый однозамещённый 2 – водный – 11,7 г/л, натрий хлористый – 106,3 г/л), соответствующем гипотоническому раствору 0,45 NaCl. Для определения адренореактивности Эр человека использовалась соль пропранолола – раствор адренореактивного вещества (состав: [1– (1–изопропиламино) – 3 – (1 – нафталенил – окси) – 2 – пропанола гидрохлорид – 7,5 г/л], 5 мл – 1 флакон.

Методика проведения:

1 серия экспериментов

0,2 цельной крови добавлялось к 0,2 мл физиологического раствора (9 %-го) и перемешивалось, избегая пенообразования. В центрифужные пробирки вносились реагенты по схеме, описанной в таблице 1.

Таблица 1 – Метод определения адренореактивности Эр

	Контрольная проба, мл		Опытная проба, мл	
	1	2	1	2
Буфер	2,5	2,5	2,5	2,5
Раствор адренореактивного вещества	–	–	0,1	0,1
Вода дистиллированная	0,1	0,1	–	–
Образец крови	0,05	0,05	0,05	0,05
Перемешать без пенообразования				
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре				
Перемешать без пенообразования				
Инкубировать 15 минут при комнатной температуре				
Центрифугировать 10 минут при 1500 об/мин				

Надосадочный слой затем переносился в кювету ФЭКа (фотоэлектроколориметра) КФК – 2 МП и измерялась плотность контрольных и опытных проб против физиологического раствора при длине волны 540 нм в кювете толщиной поглощающего свет слоя 5 мм.

Величина β -АРМ вычислялась по формуле:

$$\beta\text{-АРМ} = \frac{E_{o1} + E_{o2}}{E_{k1} + E_{k2}} * 100 \%,$$

где β -АРМ – величина показателя адренореактивности, усл.ед.

E_{o1} и E_{o2} – оптические плотности опытных проб, ед. опт. плотности,

E_{k1} и E_{k2} – оптические плотности контрольных проб, ед. оптич. плотности.

Для исследования состояния САС использовался метод определения адренореактивности Эр по величине β -адренорецепции клеточных мембран (β -АРМ), основанный на изменении осморезистентности Эр в присутствии адреноблокирующего агента – соли пропранолола (из набора «Бета-АРМ АГАТ») [44].

Согласно методике β -АРМ, высокие ее значения отражают высокую степень адренорецепторного обеднения мембраны в результате десенситизации при гиперadrenergических состояниях, а низкие показатели β -АРМ характерны для гипосимпатикотонии [44].

2 – я серия экспериментов

Используя тот же ход действий, описанный в таблице 1, ставилось 2 серии экспериментов для отдельного и комбинированного действия с фуросемидом. В суспензию добавляли фуросемид (производство – открытое акционерное общество «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь, г. Борисов).

Сначала готовился маточный раствор (для фуросемида): растворяли в 5 мл NaCl 0,04 мл фуросемида (из этого раствора брали дозатором 0,2 мл крови и добавляли 0,2 мл NaCl, далее согласно таблице 1).

В суспензию добавляли фуросемид.

1 серия: отдельное действие фуросемида: контроль без фуросемида – в пробирки добавляли 0,2 мл NaCl+0,2 мл крови и контроль с фуросемидом – добавляли 0,2 мл NaCl+0,04 мл фуросемида+0,2 мл крови):

2 серия: комбинированное действие (опыт с фуросемидом и опыт ПП+фуросемид).
Конечная концентрация для фуросемида 0,02 %.

3 – я серия экспериментов

Также используя методику определения ОРЭ, ставилась 3 – я серия экспериментов для отдельного и комбинированного действия с АСК (производство: «открытое акционерное общество «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь, г. Борисов).

Маточный раствор (для АСК): растворяли в 5 мл NaCl 0,05 г АСК (из этого раствора брали дозатором 0,2 мл крови и добавляли 0,2 NaCl, далее по таблице 1).

В суспензию добавляли АСК (конечная концентрация 0,1 %).

1 серия: отдельное действие АСК (контроль без АСК – в пробирки добавляли 0,2 мл крови+0,2 мл NaCl и контроль с АСК – добавляли 0,2 мл NaCl+0,1АСК+0,1 мл крови).

2 серия: комбинированное действие (опыт с АСК и опыт ПП+АСК).
Конечная концентрация для АСК 0,1 %.

2.3 Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel.

Нормальность распределения показателей проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку у нас распределение являлось ненормальным, вместо среднего значения использовали медиану.

Вычисляли медиану (Me), сигму (SD), коэффициент вариации (V), стандартную ошибку среднего (m).

Достоверность различий оценивали методом парных сравнений для зависимых выборок по T -критерию Вилкоксона (в таблицах оценивали погрешность $Me \pm SD$).

Глава 3 Результаты исследования и их обсуждение

3.1 Осмотическая резистентность эритроцитов человека

Для определения ОРЭ и физико–химических свойств Эр был применен метод гипоосмотического гемолиза в буферном растворе, по осмотическому давлению соответствующем 0,45% NaCl.

Показатель резистентности довольно вариабелен [32]. Резистентность Эр зависит от степени их зрелости, формы и от изменения состава плазмы. Более осмотически устойчивыми являются клетки, поступившие в кровоток из костного мозга, в особенности менее зрелые, которые имеют уплощённую дисковидную форму [3].

Среди факторов, определяющих ОРЭ, необходимо отметить фактор возраста клеток. Установлено, что молодые клетки обладают повышенной ОР. Резистентность Эр к осмотическому гемолизу зависит не только от возраста красных клеток крови, но и от возраста организма, которому они принадлежат [11].

Чем выше значение ОПн.ж., тем выше интенсивность гемолиза, и тем меньше ОРЭ.

Полученные результаты представлены в виде $Me \pm SD$ в таблице 2.

Таблица 2 – Значения оптической плотности надосадочной жидкости крови доноров

Пол	Количество проб	ОПн.ж, усл.ед.
Женский	14	0,261±0,065*
Мужской	14	0,326±0,083*

Примечание: *разница между мужской и женской ОПн.ж. достоверна ($p < 0,01$)

Как видно из таблицы 2, ОРЭ крови женщин выше ОРЭ крови мужчин на 20% (т.е. меньше значения ОПн.ж).

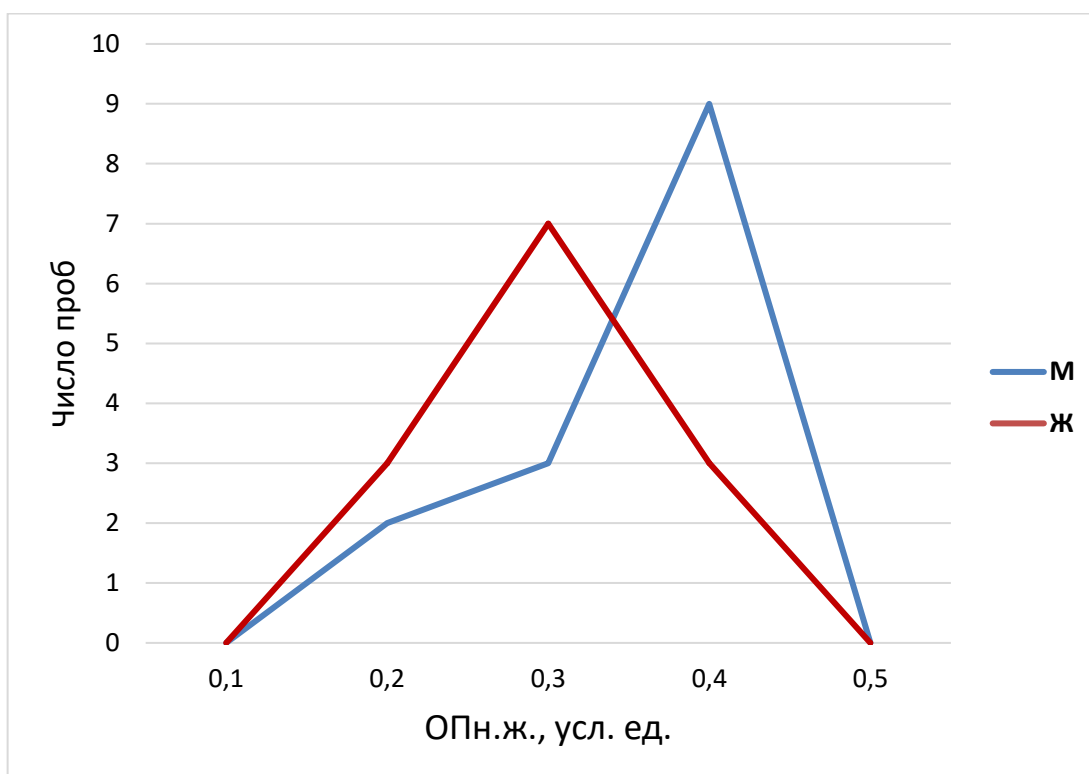


Рисунок 1 – Характер распределения ОПн.ж. у мужчин и женщин

Характер распределения проб крови у мужчин и женщин одновершинен (рис. 1), однако кривая распределения эритроцитарной популяции у женщин более пологая. Пик ОПн.ж. у мужчин сдвинут в область высоких значений 0,4 – 0,5. Это свидетельствует о большей неоднородности в эритроцитарной популяции женщин, с увеличением доли высоко- и средне-стойких Эр.

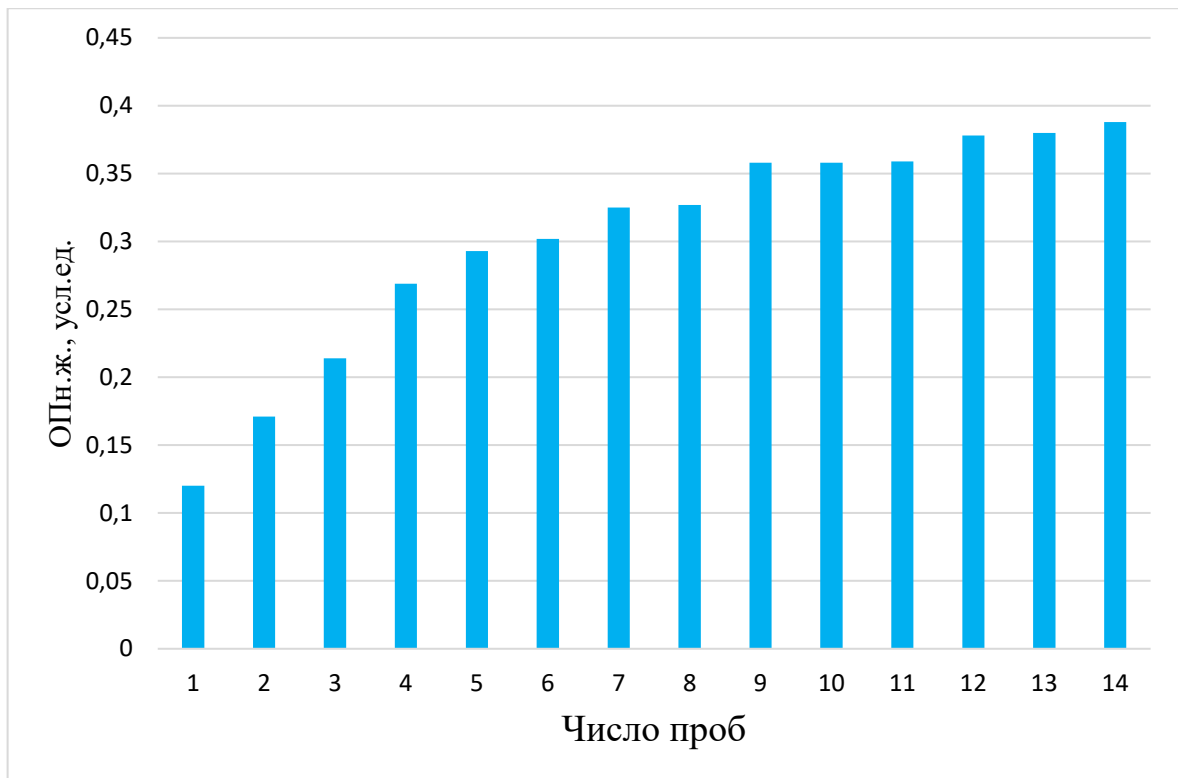


Рисунок 2 – Индивидуальные различия по распределению проб в буферном растворе среди мужчин (отмечено по возрастанию ОПн.ж).

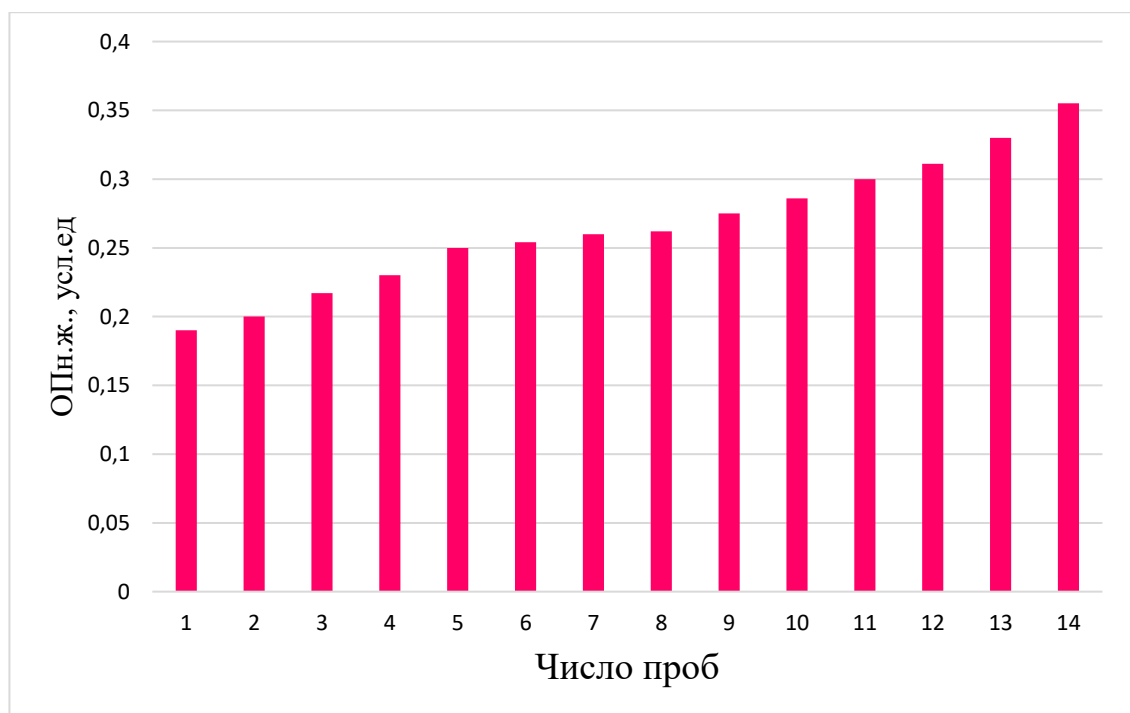


Рисунок 3 – Индивидуальные различия по распределению проб в буферном растворе среди женщин (отмечено по возрастанию ОПн.ж).

Индивидуальная изменчивость в способности Эр выдерживать внутриклеточное давление варьирует как у мужчин, так и у женщин, как это видно на рисунках 2 – 3. У мужчин показатель ОПн.ж. варьирует от 0,120 до 0,388 усл.ед., у женщин от 0,190 до 0,355 усл.ед. Слева направо наблюдаются увеличение показателей в 3 раза для мужчин и в 2 раза для женщин. Таким образом, имеются половые различия по ОРЭ у мужчин и женщин.

ОРЭ человека способна находиться в зависимости от множества условий: взаимоотношения размера клетки к участку плоскости цитоплазматической оболочки, её гибкости; изменение качество оболочки под воздействием физических и экологических условий [35].

Имеется также гипотеза о наличии различных фракций Эр, которая базируется на представлении о том, что мембрана Эр содержит аквапорины разных типов, обеспечивающих транспорт воды из среды в Эр и обратно. Это означает, что число аквапорин определяется скоростью гемолиза Эр в гипотоническом растворе. Авторы полагают, что с возрастом число их увеличивается, ускоряя транспорт воды в клетку и снижая ОРЭ человека [57].

Есть противоречивые данные в литературе: у млекопитающих на примере крыс имеются половые различия в осмотической резистентности Эр – у молодых самцов она выше, чем у самок [21].

Некоторыми авторами (Крысова А.В. и др.) показано, что ОРЭ у мужчин выше, чем у небеременных женщин. Эти различия зависят, скорее всего, от того, что андрогены повышают деформируемость мембран Эр и одновременно снижают число белков–аквапоринов, тем самым уменьшают проницаемость мембраны Эр для воды [25, 57]. Также Крысова А.В. и др. выявили, что у женщин ОРЭ зависит от фазы менструального цикла, но не зависит от его длительности.

У нас же получилось, что у женщин Эр оказались устойчивее, это можно объяснить тем, что эстрогены – защищают Эр, а андрогены, наоборот, повреждают, оказывая увеличение деформации мембраны Эр мужчин [41].

Из литературы известно, что адреналин влияет на ОРЭ, повышая ее [24]. Предполагается, что индивидуальность показателей проб мужчин и женщин (рис. 2,

3) изначально зависит от количества адреналина в каждой пробе. Эта гипотеза проверится действием адrenoблокатора (пропранолола).

3.2 Осмотическая резистентность эритроцитов при действии пропранолола.

Адренореактивность организма человека

Исследованная кровь доноров–мужчин и женщин характеризуется наличием Эр со всевозможным структурно–функциональным состоянием оболочки, что выражается огромным спектром приобретенных сведений, также разным характером воздействия солей пропранолола на стабильность оболочки в гипотонической среде [43].

Данные по ответу на соли пропранолола и показателю адренореактивности представлены в таблицах 3 – 4.

Таблица 3 – Значения ОПн.ж для мужчин и женщин

№ пробы	Мужчины, усл. ед.		Женщины, усл. ед.	
	Контроль 1	Опыт 1	Контроль 1	Опыт 1
1	0,358	0,164	0,355	0,150
2	0,293	0,198	0,330	0,117
3	0,388	0,166	0,311	0,120
4	0,214	0,071	0,300	0,145
5	0,327	0,194	0,250	0,100
6	0,380	0,259	0,260	0,120
7	0,269	0,087	0,262	0,105
8	0,302	0,095	0,200	0,100
9	0,325	0,097	0,275	0,123
10	0,358	0,114	0,190	0,068
11	0,359	0,089	0,286	0,066
12	0,378	0,176	0,230	0,057

Окончание таблицы 3

№ пробы	Мужчины, усл. ед.		Женщины, усл. ед.	
	Контроль 1	Опыт 1	Контроль 1	Опыт 1
13	0,120	0,068	0,217	0,085
14	0,171	0,067	0,254	0,079
Me±SD	0,326±0,083	0,105±0,060	0,261±0,048*	0,103±0,029*
m	0,022	0,016	0,013	0,08
V, %	27	46	18	28

Примечание: *у женщин значения контроля относительно опыта достоверны $p < 0,01$.

Как видно из таблицы 3, и у мужчин, и у женщин пропранолол понижал значения ОПн.ж., т.е. повышал ОРЭ, оказывая мембранно–стабилизирующее действие.

У мужчин значения ОПн.ж. крови снижается на 68 %, у женщин – на 59 % (табл. 4).

Таблица 4 – Показатели ответа на соли пропранолола (ОПн.ж. под действием адrenoблокатора) и адrenoреактивности доноров

Группа	Количество проб	ОПн.ж. под действием адrenoблокатора	% снижения ОПн.ж	Бета–АРМ, усл. ед.
Мужчины	14	0,105±0,060*	68	33±14
Женщины	14	0,103±0,029*	59	40±8

Примечание: *значения достоверны между ОПн.ж. мужчин и женщин ($p < 0,01$).

Мембранно–стабилизирующее действие адrenoблокатора (уменьшение жидкостности мембраны) зависит от адrenoрецепторов Эр, а десенситизация адrenoрецепторов клеточных мембран при различных состояниях сопровождается увеличением количества катехоламинов [17, 43].

Действие адrenoблокатора ослабевает по мере нарастания ОПн.ж. Эр. Низкая осмотическая устойчивость и пониженный ответ на пропранолол, возможно, связана с результатом повышенной загруженности бета-адренорецепторов и высокой концентрацией катехоламинов, либо имело изначально пониженное количество бета-адренорецепторов на поверхности клетки [43].

Состояние САС зависит от ряда причин, включающих биосинтез катехоламинов, количество и функциональное состояние адренорецепторов. Под влиянием стимуляции катехоламинами может изменяться количество и функциональное состояние адренорецепторов на мембранах [44]. Адренореактивность между значениями мужчин и женщин не достоверна (табл. 4) ($p > 0,05$).

Величина β -АРМ прямо пропорциональна активности САС и обратно пропорциональна плотности адренорецепторов на мембранах клеток [44].

В таблицах 5 – 6 представлены значения АР Эр мужчин и женщин.

Таблица 5 – Величина β -АРМ Эр мужчин

№ пробы	β -АРМ, усл. ед
1	45
2	67
3	42
4	32
5	59
6	68
7	32
8	31
9	29
10	32
11	25

Окончание таблицы 5

№ пробы	β -АРМ, усл. ед
12	33
13	56
14	32
Me\pmSD	33\pm14
m	3,84
V, %	33,4

Таблица 6 – Величина β -АРМ Эр женщин

№ пробы	β -АРМ, усл. ед.
1	42
2	35
3	39
4	48
5	40
6	46
7	40
8	50
9	45
10	36
11	23
12	25
13	39
14	31
Me\pmSD	40\pm8
m	0,02
V, %	20,9

Из таблиц 5–6 видно, что показатель адренореактивности Эр мужчин – доноров по медиане составлял 33 ± 14 усл. ед., а у женщин – доноров 40 ± 8 усл. ед. Полученные данные находились выше верхней границы нормы, установленной разработчиками метода (2 – 20 усл. ед.) [44]. Согласно методике β -АРМ, высокие значения данных отражают высокую степень адренорецепторного обеднения мембраны в результате десенситизации при гиперadrenergических состояниях (более 20 усл. ед.) [44].

На рисунке 4 представлены показатели адренореактивности, полученные в ходе исследования. Как видно, все показатели и у мужчин, и у женщин находятся выше нормы, установленными разработчиками метода.

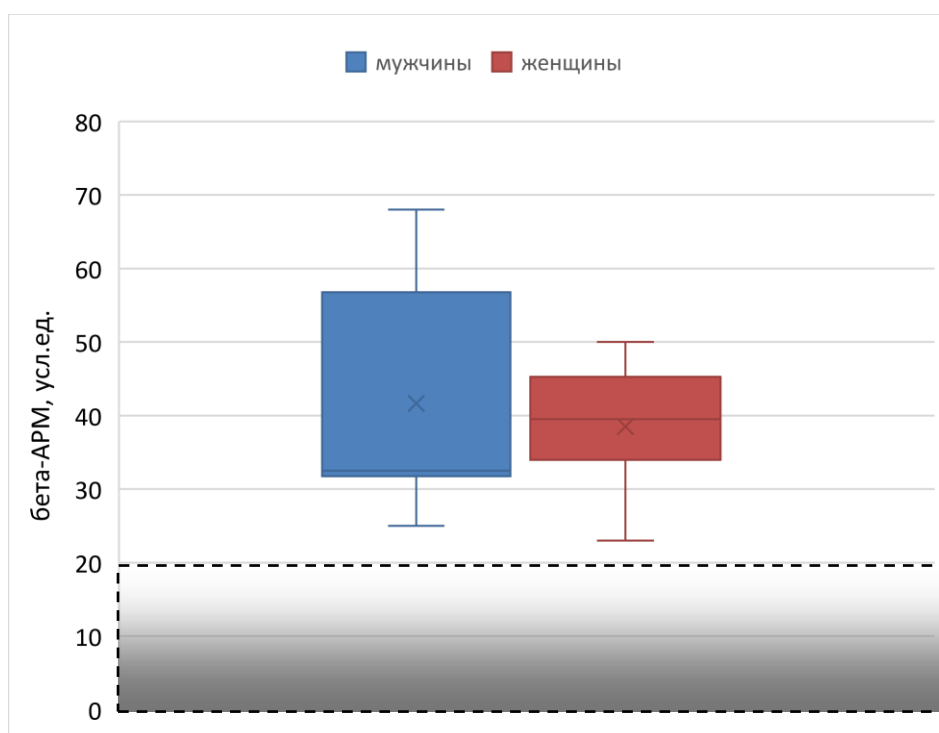


Рисунок 4 – Показатели адренореактивности мужчин–доноров и женщин–доноров. Штрихом отмечена физиологическая норма

Вариабельность показателя была широкой, пределы колебаний β -АРМ доноров–мужчин составил от 25 до 67 усл. ед. (табл. 5). У доноров – женщин этот показатель варьировал от 23 до 50 (табл. 6).

Анализ литературы показал, что разные авторы вводят, по результатам собственных исследований, неоднозначные диапазоны нормальных величин

практически здоровых людей и эта величина может зависеть от многих факторов, в том числе сезона и возраста, функционального состояния (табл. 7).

Исследования этих авторов сводятся к тому, что у практически здоровых людей в возрасте 16–45 лет β -АРМ находится в пределах нормы, указанной разработчиками метода (2 – 20 усл. ед.), либо немного превышают ее. Показатели β -АРМ людей пожилого возраста превышают данные значения, это говорит о том, что с возрастом активность САС изменяется, соответственно, и показатель β -АРМ. Эти исследования были проведены не на Севере России, а в более благоприятных климатических и социальных регионах [6, 15, 26].

Таблица 7 – Диапазоны величин адренореактивности организма

β -АРМ, усл. ед.	Авторы
12±8 (16 – 45 лет)	А.И. Байдаулетова, Ю.Э. Азимова (2004) (Средняя полоса России) [6]
60% ≥ 20; 40% укладываются в верхнюю часть диапазона нормы	А.В. Гулин, К.И. Засядько (Липецк, 2005) [15]
20 – 40	А.В. Курята, Е.В. Соя. (Днепропетровск, 2003) [26]
6–95 (27±1,7) Доноры–мужчины	г. Сыктывкар (Н.Б. Петрова), n= 271 [38]
14–45 (31±2,5) Доноры–мужчины	г. Воркута (О.Д. Денисенко), n=30 [38]
25–67 (33±14) Доноры–мужчины	Собственные данные (n=14), г. Сыктывкар
23–50 (40±8) Доноры–женщины	Собственные данные (n=14), г. Сыктывкар

Н.Б. Петровой, О.Д. Денисенко была показана адренореактивность Эр мужчин–доноров (г. Сыктывкар). На период с 20 марта 2009 г. по 22 янв. 2010 г. в среднем АР составляла $24 \pm 1,4$ усл. ед., на период с 27 окт. 2010 г. по 22 дек. 2013 г. – 29 ± 2 усл. ед. В более северных регионах (г. Воркута) средний показатель АР крови мужчин–доноров был $31 \pm 2,5$ усл. ед. Пределы колебаний показателя от 14 до 45 усл. ед [38].

По собственным данным, частота встречаемости гиперадренергического состояния (выше 20 усл. ед.) показателя АР составил 100 % как для мужчин, так и для женщин–доноров. Вероятно, это может быть связано с достаточно жарким летом периода исследования (средняя температура была $24 \pm 5^\circ\text{C}$), что могло повысить активность САС, а, соответственно, и величину β –АРМ.

Частота встречаемости гиперадренергического состояния (выше 20 усл. ед.) у мужчин доноров, проживающих в г. Сыктывкар, составляла 53–65 %. В г. Воркута – 80–86% в зависимости от периода исследования. Предполагается что высокие величины β –АРМ, чаще всего, связаны с условиями Севера, поскольку доноры, как правило, люди трудоспособного возраста, практически здоровые и не испытывающие дискомфорта в момент взятия крови. [38].

В статье Н.Б. Петровой, О.Д. Денисенко говорится о том, что более высокий уровень адренореактивности у жителей Севера, возможно, связан со стрессом и обусловлен комплексом адаптивных изменений, которые реализуются как на организменном, на органном и клеточном уровнях: активацией систем неспецифической адаптации, увеличенным обменом катехоламинов, интенсификацией обменных механизмов и гомеостатических систем, поддерживающих температурный гомеостаз. Эти изменения могут рассматриваться как «плата за адаптацию» при проживании в холодном климате [38].

3.3 Действие фуросемида на осмотическую резистентность и адренореактивность эритроцитов

2 – я серия эксперимента

Данные по влиянию фуросемида на ОРЭ мужчин и женщин представлены в таблицах 8–9. В таблице 8 у мужчин в контрольных пробах отмечено увеличение значений ОПн.ж, т.е. уменьшение ОРЭ на 6 %. Различия не достоверны.

В опытных пробах наблюдается сходная картина: при сочетанном действии ПП с фуросемидом отмечено уменьшение ОРЭ на 15 %. Различия не достоверны.

Таблица 8 – Значения ОПн.ж. по контролю (без фуросемида) и опыту (с фуросемидом). Мужская кровь

№ пробы	1 серия (контроль), усл. ед.		2 серия (опыт), усл. ед.	
	К ₁	О ₁	К ₂	О ₂
1	0,358	0,164	0,419	0,155
2	0,293	0,128	0,282	0,161
3	0,388	0,166	0,346	0,131
4	0,214	0,071	0,225	0,086
5	0,327	0,194	0,347	0,187
6	0,420	0,200	0,409	0,210
7	0,269	0,087	0,346	0,099
8	0,302	0,095	0,321	0,077
9	0,325	0,097	0,403	0,184
10	0,358	0,110	0,323	0,104
11	0,359	0,089	0,381	0,097
12	0,378	0,126	0,453	0,232
13	0,120	0,068	0,113	0,033
14	0,200	0,067	0,136	0,049

Окончание таблицы 8

	1 серия (контроль)		2 серия (опыт)	
	K ₁	O ₁	K ₂	O ₂
Me±SD	0,326±0,083	0,101±0,040	0,346±0,102	0,117±0,066
m	0,022	0,016	0,027	0,018
V, %	27,3	45,8	31,7	50,1

Таблица 9 – Значения ОПн.ж. по контролю (без фуросемида) и опыту (с фуросемидом). Женская кровь

№ пробы	1 серия (контроль), усл. ед.		2 серия (опыт), усл. ед.	
	K ₁	O ₁	K ₂	O ₂
1	0,355	0,150	0,345	0,137
2	0,330	0,117	0,293	0,078
3	0,311	0,120	0,268	0,094
4	0,300	0,145	0,316	0,139
5	0,250	0,100	0,155	0,055
6	0,260	0,120	0,241	0,110
7	0,262	0,105	0,239	0,087
8	0,200	0,100	0,160	0,057
9	0,275	0,123	0,254	0,066
10	0,190	0,068	0,156	0,065
11	0,286	0,066	0,295	0,062
12	0,230	0,057	0,207	0,041
13	0,217	0,085	0,112	0,037
14	0,254	0,079	0,250	0,052
Me±SD	0,261±0,048*	0,103±0,029**	0,245±0,069*	0,065±0,033**
m	0,013	0,008	0,018	0,009
V, %	18	28	29,3	42,3

Примечание: различия между контрольной пробой (*) и опытной (**) достоверны (p<0,01).

Исходя из таблицы 9, в контрольных пробах у женщин отмечены достоверные различия (уменьшение ОПн.ж. на 6 %), а, значит, увеличение ОРЭ.

В опытных пробах наблюдалась сходная картина. При сочетанном действии ПП с фуросемидом наблюдались достоверные различия в уменьшении ОПн.ж., т.е. увеличение ОРЭ на 58 % (в 85 % случаев). Усиливается эффект ПП.

Таким образом, относительно и контроля, и опыта, можно сказать, что фуросемид уменьшал значения ОПн.ж. у женщин, увеличивая ОРЭ. Можно отметить, что изменение контроля, возможно, связано с протонным транспортом, а опыта – с влиянием фуросемида на состояние адренорецепторов.

Фуросемид действует на протонный транспорт и регулирует потоки в цикле Джекобса – Стюарта (в эритроците).

Эритроцитарная мембрана содержит большое количество белков, выполняющих различные функции. За транспорт анионов и протонов через мембрану отвечает белок полосы 3 (б.п.3, капнофорин). На рис. 5 показана схема его функционирования при добавлении в среду с эритроцитами кислоты [59].

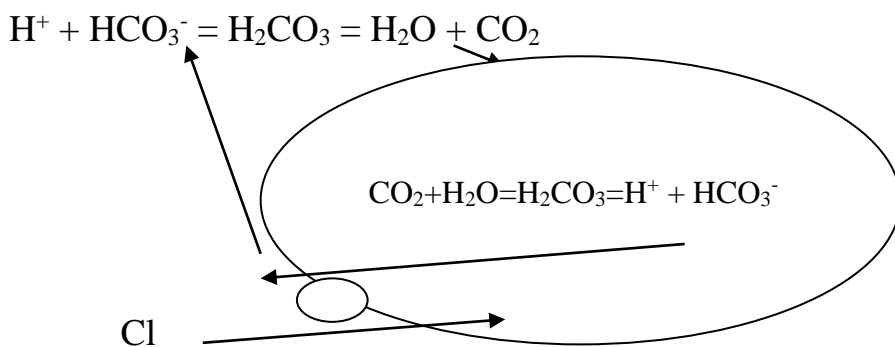


Рисунок 5 – Транспорт H^+ через мембрану Эр в цикле Джекобса–Стюарта

Показатели адренореактивности мужчин и женщин представлены в таблицах 10–11. В таблице 10 можно видеть, что у мужчин–доноров фуросемид оказал неоднозначное воздействие на АР (64 % – понижает, 21 % – повышает, а 15 % и вовсе не изменяется). Уменьшение АР примерно на 8 %. Разница статистически не достоверна ($p>0,05$).

Таблица 10 – Значения β -АРМ Эр мужчин в контроле и с фуросемидом (опыт)

№ пробы	Контроль, усл. ед.	Опыт, усл. ед.
1	45	36
2	67	57
3	42	36
4	32	18
5	59	54
6	68	29
7	32	27
8	31	22
9	29	45
10	32	32
11	25	26
12	33	51
13	56	28
14	32	27
Me±SD	33±14	30,5±12,3
m	3,9	3,3
V, %	35,6	35,3

Как видно из таблицы 11 – фуросемид во всех пробах (кроме одной) понижал адренореактивность Эр женщин (в среднем на 13 %). Данные по женской крови достоверны ($p < 0,01$).

Таблица 11– Значения β -АРМ Эр женщин в контроле и с фуросемидом (опыт)

№ пробы	Контроль, усл. ед.	Опыт, усл. ед.
1	42	39
2	35	26
3	39	34
4	48	44
5	40	35
6	46	45
7	40	36
8	50	35
9	45	25
10	36	41
11	23	21
12	25	19
13	39	34
14	31	20
Me±SD	40±8*	34,5±8,7*
m	0,02	2,35
V, %	21	27

Примечание: *достоверны значения между контролем и опытом ($p < 0,01$)

Существуют разные варианты передачи гормонального сигнала от β -адренорецепторов к мембране Эр.

Классическая схема трансдукции гормонального сигнала (через белок аденилатциклазу, цАМФ (аденилатциклазный путь) и соответствующие ферменты) присутствуют в зрелых Эр. Поскольку они практически лишены всех органоидов, синтез ферментов АЦ-пути тоже значительно снижен или вовсе отсутствует [41]. Однако по мнению некоторых авторов, [25] адренорецепторы могут находиться в плазме крови и адсорбироваться на мембране Эр.

Второй вариант: Тихомирова и др. [45] отмечают, что основной путь регуляции может осуществляться и через регуляцию $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ транспорта. Очевидно, фуросемид может осуществлять свой эффект через оба пути трансдукции гормонального сигнала. Поскольку этот агент ингибирует б.п.3, при этом изменяется и состояние липидно-белковой стромы самой мембраны и встроенных в неё АР и ферментов $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ обмена [45].

3.4 Действие ацетилсалициловой кислоты на осмотическую резистентность и адренореактивность эритроцитов

3 – я серия экспериментов

Данные по действию АСК на ОРЭ мужчин и женщин (контроль и опыт) приведены в таблицах 12–13. Исходя из таблицы 12, во всех контрольных пробах мужчин–доноров под действие АСК наблюдается увеличение ОПн.ж. (за исключением одного), значит, уменьшение ОРЭ на 23 % (в 8 из 10 пробах).

В опытных пробах при сочетанном действии ПП с АСК можем видеть уменьшение ОРЭ в 4,2 раза.

Таблица 12 – Значения ОПн.ж. по контролю и опыту (АСК). Мужская кровь

№ пробы	1 серия (контроль), усл. ед.		2 серия (опыт), усл. ед.	
	K ₁	O ₁	K ₂	O ₂
1	0,269	0,087	0,332	0,066
2	0,302	0,095	0,395	0,433
3	0,325	0,097	0,371	0,390
4	0,358	0,114	0,381	0,385
5	0,359	0,089	0,400	0,495
6	0,378	0,176	0,385	0,398
7	0,120	0,068	0,235	0,440
8	0,171	0,067	0,153	0,134
9	0,182	0,099	0,210	0,236
10	0,165	0,069	0,200	0,175
Me±SD	0,286±0,09*	0,092±0,03**	0,352±0,09*	0,388±0,13**
m	0,030	0,010	0,030	0,041
V, %	36,3	33,3	31,3	38,8

Примечание: значения достоверны между контрольными (*) и опытными (**) группами (p<0,01)

Таблица 13 – Значения ОПн.ж. по контролю и опыту (АСК). Женская кровь

№ пробы	1 серия (контроль), усл. ед.		2 серия (опыт), усл. ед.	
	K ₁	O ₁	K ₂	O ₂
1	0,275	0,123	0,371	0,395
2	0,190	0,068	0,296	0,355
3	0,286	0,066	0,276	0,321
4	0,200	0,057	0,302	0,307
5	0,125	0,066	0,357	0,370
6	0,252	0,079	0,289	0,299
7	0,219	0,062	0,306	0,371
8	0,336	0,098	0,331	0,366
9	0,125	0,042	0,315	0,349
Me±SD	0,219±0,07*	0,066±0,02**	0,306±0,03*	0,355±0,03**
m	0,02	0,01	0,01	0,01
V, %	32,1	32,7	9,9	9,3

Примечание: значения между контрольными (*) и опытными (**) пробами достоверны (p<0,01)

В таблице 13 во всех пробах наблюдается повышение ОПн.ж. В контрольных пробах под действием АСК наблюдается увеличение ОПн.ж. на 39 %, тем самым уменьшение ОРЭ у женщин.

Во всех опытных пробах при сочетанном действии ПП с АСК – также отмечено увеличение оптической плотности (в 5 p), следовательно, уменьшение ОРЭ у женщин на 81 %.

И по мужской, и по женской крови значения статистически достоверны (p<0,01).

Эффект АСК в пробах женской крови выше, чем в мужской в 1,7 раза.

В основе противовоспалительного действия АСК лежит блокада активности фермента фосфолипазы A_2 в мембране. При расщеплении арахидоновой кислоты (ненасыщенная жирная кислота) образуются простагландины (ПГ), которые являются медиаторами воспаления [2]. Стоит отметить, для того, чтобы фермент фосфолипаза A_2 был активен, необходимы ионы кальция, которые вызывают фосфорилирование фермента и его активацию. К таким факторам можно отнести, например, эстрогены [2].

Эффект ПП в опытных пробах и у мужчин, и у женщин полностью нивелируется и даже извращается, становится противоположным, повышая ОПн.ж. Возможно, АСК действует сходным образом на мембрану, так же, как и катехоламины, либо усиливает действие агонистов, снижая эффект антогонистов.

Данные по действию АСК на адренореактивность Эр мужчин и женщин представлены в таблицах 14–15.

Таблица 14 – Значения β -АРМ Эр мужчин в контроле и с АСК (опыт)

№ пробы	Контроль, усл.ед.	Опыт, усл.ед.
1	32	20
2	31	109
3	29	105
4	31	100
5	24	104
6	46	106
7	56	111
8	39	52
9	54	80
10	41	64
Me±SD	35,5±10*	102±30*
m	3,43	9,69
V, %	28	36

Примечание: * значения достоверны ($p < 0,01$)

Из таблицы 14 видно, что у мужчин (за исключением пробы № 1), аспирин повышал адренореактивность Эр. Показатели адренореактивности с АСК увеличились в несколько раз (в 2,8 р.).

Таблица 15 – Значения β -АРМ Эр женщин в контроле и с АСК (опыт)

№ пробы	Контроль, усл.ед.	Опыт, усл.ед.
1	44	106
2	35	119
3	22	116
4	28	101
5	52	92
6	29	62
7	28	77
8	39	86
9	33	103
Me±SD	33±9*	101±18*
m	3,09	6,16
V, %	27	19

Примечание: * значения достоверны ($p < 0,01$)

Адренореактивность Эр у женщин–доноров повышается с добавлением во все пробы аспирина, в среднем в 3,1 раза (табл. 15).

И у мужчин, и у женщин по опыту статистически значения достоверны ($p < 0,01$).

По данным литературы, сама АСК – гидрофильная, она не может проникать через мембрану Эр, а только её дериваты – салицилат и индометацин [55]. Если б.п.3 не работает, то идёт накопление CO_2 (регуляция рН, его увеличение).

3.5 Сравнительный анализ действия фуросемида и ацетилсалициловой кислоты на функциональные свойства мембраны эритроцитов

Исходя из полученных данных, фуросемид и АСК оказали противоположные друг другу эффекты как на ОРЭ, так и на адренореактивность. Фуросемид и АСК антагонисты в отношении внутриклеточных метаболитов, в отношении рН. АСК, в отличие, от фуросемида, блокирует эффект ПП.

У пациентов, получающих фуросемид и салицилаты, могут развиваться токсические эффекты из-за наличия конкуренции в почечной экскреции и, следовательно, замедления выведения салицилатов [63].

Может быть, наши данные могут дополнить механизмы действия фуросемида и АСК на Эр, поскольку это практически не исследовано. Тем самым можно предположить, что наши опыты являются началом для дальнейших открытий, что весьма значимо для науки.

Выводы

1. Показатели осмотической резистентности эритроцитов и эффект пропранолола на мембрану красных клеток крови человека соответствуют данным литературы. Отмечены половые различия: осмотическая резистентность эритроцитов женщин выше на 20 % по сравнению с мужчинами.

Бета-адреноблокатор – пропранолол оказывал мембранно-стабилизирующий эффект, увеличивая ОРЭ мужчин и женщин на 68 % и 59% соответственно.

2. Величина адренореактивности организма женщин составила 40 ± 8 усл.ед., мужчин – 33 ± 14 усл.ед., что соответствует региональным нормам для северных территорий. Частота встречаемости гиперadrenergического состояния (выше 20 усл.ед.) отмечено у 100 % исследуемых.

3. В эффекте фуросемида наблюдаются половые различия. Фуросемид у женщин достоверно увеличивал осмотическую резистентность эритроцитов (на 6 %) и усиливал эффект пропранолола (на 58 %). У мужчин различия недостоверны.

4. Ацетилсалициловая кислота значительно ($p < 0,01$) понижала осмотическую резистентность эритроцитов как у мужчин, так и у женщин на 39 % и 23 % соответственно.

5. Ацетилсалициловая кислота полностью нивелировала эффект пропранолола, оказывая противоположное ему действие. При сочетанном действии пропранолола с ацетилсалициловой кислотой уменьшается осмотическая резистентность эритроцитов в 4,2 – 5 раз.

Список литературы

1. Авакян, О.М. Симпато–адреналовая система: методы исследования высвобождения, рецепции и захвата катехоламинов / О.М. Авакян. – Л.: Наука, 1977. – 184 с.
2. Агаджанян, Н.А. Физиология человека: для студентов ВУЗов, специализирующихся в области медицины, биологии и валеологии / Н.А. Агаджанян, Л.З. Тель, В.И. Циркин, С.А. Чеснокова. – М.: Медицинская книга, 2003. – 528 с.
3. Адо, А.Д. Патологическая физиология [Текст] / А.Д. Адо, Л.М. Ишимова. – М.: Медицина, 1973. – 534 с.
4. Анисимов, А.А. Основы биохимии / А.А. Анисимов – М.: Высшая школа, 1986. – 551с.
5. Антонов, В.Ф. Липидные мембраны при фазовых превращениях / В.Ф. Антонов, Е.Ю. Смирнова, Е.В. Шевченко. – М.: Наука, 1992. – 321 с.
6. Байдаулетова, А.И. Клинико–нейрофизиологические корреляты адренореактивности при нейрогенных обмороках / А.И. Байдаулетова, Ю.Э. Азимова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2004. – Т. 4. – № 6. – С. 57 – 63.
7. Болдырев, А.А. Введение в биомембранологию / А.А. Болдырев. – М.: Изд–во МГУ, 1990. – С. 30.
8. Борисов, Ю.А. Резистентность эритроцитарных мембран: механизмы, тесты, оценка (обзор литературы) / Ю.А. Борисов, В.Н. Спиридонов, Е.Д. Суглубова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. № 12. С. 36 – 40.
9. Васильев, В.Н. Симпатико–адреналовая активность при различных функциональных состояниях человека / В.Н. Васильев, В.С. Чугунов. – М.: Медицина, 1985. – 214 с.
10. Вейсс, М. Физиотерапия / М. Вейсс, А. Зембатов, И. В. Осечинский. – М.: Медицина, – 1986. – 496с.

11. Войтенко, В.П. Методика определения биологического возраста человека / В.П. Войтенко, А.В. Токарь, А.М. Полюхов // Геронтология и гериатрия. Ежегодник. Биологический возраст. Наследственность и старение. – Киев: Институт геронтологии, 1984. – С. 133 – 137.
12. Вяткина, П. Полный медицинский справочник фельдшера. Часть III, 2012.
13. Геннис, Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функция / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
14. Голенда, И.Л. Кинетический способ исследования адренорецепторов в эритроцитах / И.Л. Голенда, А.Н. Голенда, А.Р. Галлеев // Физиология человека. – 1994. – Т. 20. – № 3. – С.151 – 154.
15. Гулин, А.В. Использование показателя β -адренорецепции клеточных мембран для оценки адаптации студентов в зависимости от состояния их физической подготовленности / А.В. Гулин, К.И. Засядько // Материалы второго Международного конгресса по восстановительной медицине и реабилитации. – М., – 2005 – С. 71 – 73.
16. Гусева, Е.В. Клиническое значение определения β -адренозависимой скорости оседания эритроцитов у беременных женщин и рожениц: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. / Е.В. Гусева. – Киров, 1998. – 43 с.
17. Дрыгало, Н.Н. Различие эффектов глюкокортикоидов на плотность бета-адренорецепторов в легких и коре головного мозга / Н.Н. Дрыгало [и др.] // бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1995. – Т. 120. № 3. – С. 328
18. Жихарёв, С.С. Уровень специфического связывания β -адренергических лигандов и некоторые морфофункциональные свойства эритроцитов при бронхиальной астме / М.Н. Перцева и [др] // Терапевтический архив. – 1988. – Т. 60. № 3. – С. 89 – 93.
19. Кацнельсон, З.С. Гистология и биохимия хромоаффинной ткани надпочечников / З.С. Кацнельсон, Е.М. Старбовский. Л. – 1975. – С. 1 – 223.

20. Кленов, Р.О. Действие адреналина, цАМФи АТФ на образование пептидов возрастными фракциями эритроцитов человека: автореф. дис. биол. наук / Р.О. Кленов. – Уфа, 2010. – 24 с.
21. Козак, М.В. Возрастные и половые различия ОРЭ при изменении свободно–радикальных процессов в организме / М.В. Козак // Естественные науки. – 2009. – № 4. – С. 89 – 96.
22. Краткая медицинская энциклопедия. В 2 – х томах / под ред. Академика РАМН В.И. Покровского. М.: НПО «Медицинская энциклопедия», «Крон–Пресс». – 1994. – Т. 2. – С. 220 – 221.
23. Крылин, В.В. Катехоламины: биосинтез (лекция) / В.В. Крылин // Клиническая и лабораторная диагностика, 2007. – №3. – С. 21 – 35.
24. Крысова, А.В. Влияние блокаторов альфа– и бета–адренорецепторов на способность адреналина изменять ОРЭ небеременных женщин / А.В. Крысова [и др]. // Вестник СПб университета. Серия 3. Биология. – 2013. – № 1. – С 54 – 56.
25. Крысова, А.В. Половые особенности ОРЭ человека, выявляемые при экспозиции эритроцитов в дистиллированной воде / А.В. Крысова, А.А. Кушнин, В.И. Циркин // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – Киров, 2011. – № 2. – с. 266 – 272.
26. Курята, Е.В. Уровень активности β –адренорецепторов, состояние функции эндотелия и мембран эритроцитов у больных старших возрастных групп с сердечной недостаточностью и их изменение под влиянием лечения / Е.В. Курята, А.В. Соя // Укр. мед. альманах. – 2003. – Т. 2 – № 2. – С. 84 – 86.
27. Левтов, В.А. Реология крови / В.А. Левтов, С.А. Регирер, Н.Х. Шадрина. – Москва: Медицина, 1982. – 270 с.
28. Манухин, Л.А., Смурова, Е.А. Характеристика кинетики взаимодействия β –адренорецепторов эритроцитов со специфическим блокатором пропранололом Л.А. Манухин, Е.А. Смурова // Биологические мембраны. – 1994. – Т. 11. – № 5. – С.489 – 494.
29. Мищенко, А.А. Зависимость кислотно–основных свойств эритроцитов человека, крысы и лягушки от адреналина, пропранолола и фитогемагглютининов:

Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. № 03.00.13. / А.А. Мищенко. – Сыктывкар, 2000. – 20 с.

30. Орбели, Л.А. Лекции по физиологии нервной системы / Л.А. Орбели. – Л., 1938. – С. 183 – 269.

31. Основные лекарственные средства / под ред. В.С. Гасилина, А.И. Мартынова. М.: Медицинский центр при Правительстве Российской Федерации, 1998. – С. 105 – 106.

32. Панцхава, А.Д. Способ определения уклонения средней осмотической резистентности эритроцитов // Патент СССР № 126232, МПК G01N33/49, 1969.

33. Петрова, Н.Б. Кислотная резистентность и адренореактивность эритроцитов женщин с тиреоидной патологией // Медицина – здоровье: Науч. труды I съезда физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, Москва, 2005. – С. 170.

34. Погорелов, В.М. Лабораторно–клиническая диагностика анемий / В.М. Погорелов, Г.И. Козинец, Л.Г. Ковалева. М.: МИА, 2004. – 173 с.

35. Потапенко, А.Я. Осмотическая устойчивость эритроцитов: Учебное пособие / А.Я. Потапенко, А.А. Кягова, А.М. Тихомиров // ГОУ ВПО ГРМУ, 2006. – 16 с.

36. Потарова, Н.В. Влияние фуросемида и салицилата Na^+ *invitro* на динамику переноса H^+ через мембрану эритроцитов взрослых доноров и новорожденных / А.А. Мищенко, Н.В. Потарова: дипл. работа. – Сыктывкар, 2005.

37. Рабанович, Ф.М. О факторах, определяющих осмотическую резистентность эритроцитов / Ф.М. Рабанович, А.Г. Рыбкина, А.Д. Манаенков // Физиология и патология эритроцитов. – Красноярск, 1974. – С. 209 – 216.

38. Разнообразие, структура и функционирование биологических систем на Севере / под ред. С.В. Загировой [и др.] // монография: Адренореактивность организма человека на Севере. – Сыктывкар, 2015. – Глава 4. 1. – С. 172 – 196.

39. Рязанцева, Н.В. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза: контуры проблемы / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Е.А. Степовая // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 2. – С. 62 – 69.

40. Синёв, А.В. Клиническая диагностика внутренних болезней домашних животных / А.В. Синёв. – Москва – 1946.
41. Соминский, В.Н. Использование эритроцитов для прижизненной оценки функционального состояния адренорецепторов / В.Н. Соминский, Л.В. Бердышева, Р.К. Блума // Росс. Физиол. журнал им. И. М. Сеченова. – 1989. – Т.75. – № 2. – С. 189 – 193.
42. Соминский, В.Н. Количественный анализ взаимодействия пропранолола с мембраной эритроцитов по его антигемолизирующему эффекту / В.Н. Соминский, К.В. Окунь, Ю.А. Аншелевич // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1988. – № 3. – С. 86.
43. Соминский, В.Н. Повышение осмотической резистентности эритроцитов под влиянием пропранолола / В.Н. Соминский, К.В. Окунь// Лабораторное дело. – 1981. – № 9. – С. 525.
44. Стрюк, Р.И. Адренореактивность и сердечно–сосудистая система / Р. И. Стрюк, И.Г. Длусская. – М., 2003. – 160 с.
45. Тихомирова, И.А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов: Автореф. дисс. д–ра. биол. наук. / И.А. Тихомирова. – Ярославль, 2006. – 48 с.
46. Ткачук, В.П. Введение в молекулярную эндокринологию: Учеб. пособие / В.П. Ткачук. – М.: Изд–во Моск. ун–та, 1983. – 256 с.
47. Трошкина, Н.А. Клиническое значение оценки адренореактивности эритроцитов / Н.А. Трошкина, С.А. Дворянский, В.И. Циркин // Здоровье человека на севере. – 2008. – № 2. – С. 43 – 45.
48. Фатенков, В.Н. Состояние мембран и метаболизма эритроцитов // Ишемическая болезнь сердца: учебник для вузов 1 том / В.Н. Фатенков, О.В. Фатенков. – Самара: Офорт. – 2006. – С. 41.
49. Физиология системы крови /под ред. А.Я. Ярошевского. – Л., 1968. – 280 с.
50. Черницкий, Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарной мембраны / Е.А. Черницкий, А.В. Воробей. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.

51. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients // *Br Med J.* – 2002. – V. 324. P. 71 – 86.
52. Brater, D.C. Diuretic therapy. *N. Engl. J. Med.* 1998; V. 339. – 95 p.
53. Livett, B. G. Histochemical visualization of peripheral and central adrenergic neurons. – *Brit. Med. Bull.*, 1973, V. 29, № 2, – P. 93 – 99.
54. Lomsadze, G. Age related alterations of adrenoreceptor activity in erythrocyte membrane / Lomsadze G., Khetsuriani R., Arabuli M., Intskirveli N., Sanikidze T. // *Georgian Med. News.* 2011 N 195. – P. 58–61.
55. Mazorow, D.L., Haug, A, Bull, R, Effects of aspirin, indomethacin, and sodium salicylate on human erythrocyte membrane as detected with electron spin resonance spectroscopy // *Thromb Res.* – 1985. – V. 15. – № 6. P. – 779–792.
56. Minetti, G., Low P.S. Erythrocyte signal transduction pathways and activates adenylate cyclase in human erythrocyte membrane at physiological calcium plasma concentrations / G. Minetti, P.S. Low // *Blood Cell. Mol. Diseases.* – 1997. – V. 263. – P. 223 – 228.
57. Mola, M. Futomated cell-based assay for screening of aquaporin inhibitors / M. Mola [et al] // *Anal. Chem.* – 2009 – № 81. – 2011. – № 2–2. – P. 266 – 272.
58. Murray, M.D. Variable furosemide absorption and poor predictability of response in elderly patients / M.D. Murray, K. M. Haag, P.K. Black, S.D. Hall, D.S. Brater // *Pharmacotherapy.* – 1997. – V. 17. – P. 98 – 106.
59. Nikinmaa, N. Regulation of acid and ion transport across the membrane of nucleated erythrocytes / N. Nikinmaa, B. Tufts // *Can. J. Zool.* – 1989. – V. 67. – P. 3039 – 3045.
60. Reyes, A.J., Taylor, S.H. Diuretics in cardiovascular medicine: the new clinicopharmacological bases that matter / A.J. Reyes, S.H. Taylor // *Cardiovascular. Drugs Ther.* – 1999. – V.13. – P. 71 – 98.
61. Siscovic, D.S. Diuretic therapy or hypertension and the risk of primarycardiacarrest / D.S. Siscovic, T.E. Raghunathan, B.M. Psaty // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – P. 7.

62. Vargo, D.L. Bioavailability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of torsemide and furosemide in patients with congestive heart failure / D.L. Vargo, W.G. Kramer, P.K. Back, W.B. Smith // Clin. Pharm. Ther. – 1995. – V. 57. – P. 9.

63. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента / URL: [https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_821.htm] (дата обращения 01.06.2020).

Обозначения и сокращения

АР – адренореактивность

АСК – ацетилсалициловая кислота (аспирин)

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

ОПн.ж. – оптическая плотность надосадочной жидкости

ОРЭ – осмотическая резистентность эритроцитов

САС – симпато–адреналовая система

Эр – эритроцит

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно.
Использованные в работе материалы и концепции из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них.

Отпечатано в 1 экземпляре.

Библиография 63 наименования.

Один экземпляр в бумажном и электронном варианте сдан на кафедру.

“26” июня 2020 г.

(дата)

(подпись)

Дурягина Арина Павловна
(Ф. И. О)