

ВЛИЯНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ

Ермолаева Е.Н., Сашенков С.Л., Кантюков С.А., Петухова В.И.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, e-mail: ermen33@mail.ru

Хроническую физическую нагрузку субмаксимальной мощности моделировали на крысах ежедневным плаванием в течение 30 минут на протяжении 21 дня. В 1–7-й дни эксперимента плавание не было отягощено грузом, с 8-го по 21-й день проходило с грузом, равным 2% массы тела. На 9-й, 15-й и 21-й день эксперимента животных подвергали дополнительной физической нагрузке: плавание в течение 4 минут с грузом массой 20% от массы тела. Церулоплазмин вводили на 1-е, 4-е и 7-е сутки физической нагрузки в суммарной дозе 60 мг/кг массы тела. Забор крови производили на 9-е, 15-е, 21-е сутки через 15–20 минут после нагрузки. При физических нагрузках изменяется состояние клеточных мембран: усиливается осмотический, кислотный гемолиз эритроцитов, повышается их сорбционная способность. Церулоплазмин обладает положительным мембранопротекторным действием относительно сорбционной резистентности. Явного положительного эффекта действия церулоплазмина относительно устойчивости эритроцитов к осмотическому и кислотному воздействию зарегистрировано не было. Механизм действия церулоплазмина можно объяснить его неспецифическим эритропоэтическим эффектом к 21-м суткам хронической физической нагрузки. Мембраны молодых вновь образованных эритроцитов более устойчивы к повреждающим воздействиям.

Ключевые слова: физическая нагрузка, церулоплазмин, эритроциты, клеточная мембрана

THE INFLUENCE OF CERULOPLASMIN ON THE STATE OF THE ERYTHROCYTES MEMBRANES IN CHRONIC SUBMAXIMAL EXERCISE CAPACITY

Ermolaeva E.N., Sashenkov S.L., Kantyukov S.A., Petukhova V.I.

South Ural State Medical University (SUSMU), Chelyabinsk, e-mail: ermen33@mail.ru

Chronic submaximal exercise capacity was modeled in rats, daily swimming, the workload has increased gradually: 1-7 day – sailing without cargo, 8-21 day - loaded 2% of body weight within 30 minutes to 21 days. On the 9th, 15th and 21st days of the experiment, the animals were subjected to additional physical activity: they swam for 4 minutes with a weight of 20% of body weight. Ceruloplasmin was administered at 1, 4 and 7 day physical activity, total dose 60 mg/kg of body weight. The blood tests were carried out on 9, 15, 21 days after 15 to 20 minutes after exercise. Under physical stress changes the state of cell membranes: enhanced osmotic, acid hemolysis of red blood cells, increases their sorption capacity. Ceruloplasmin has a positive membranoprotective action regarding sorption resistance. A clear positive effect of ceruloplasmin on the resistance of red blood cells to osmotic and acidic effects was not registered. The mechanism of action of ceruloplasmin can be explained by its nonspecific erythropoietic effect to 21 days of chronic physical activity. Membranes of young newly formed red blood cells are more resistant to damaging effects.

Keywords: physical activity, ceruloplasmin, erythrocytes, cell membrane

При интенсивной физической нагрузке необходимо иметь высокий O_2 транспортный потенциал, коррелирующий с аэробной работоспособностью. В большинстве исследований показано улучшение реологических свойств крови у тренированных лиц [1]. Умеренные тренировки на выносливость позволяют увеличить объем плазмы и снизить сгущение крови. В то же время снижение уровня гематокрита у спортсменов может быть результатом «спортивной анемии». Это явление объясняется гемолизом эритроцитов во время физических упражнений [2], что связано с интенсивностью и видом упражнения. При

выполнении интенсивной физической нагрузки было обнаружено, что около 0,04% от общего числа циркулирующих эритроцитов лизируются [3]. Наиболее часто причиной внутрисосудистого гемолиза является механическая травма эритроцитов, которую можно предотвратить, используя специальную обувь с хорошей амортизацией. Было показано, что упражнения изменяют проницаемость мембраны эритроцитов, что коррелирует с содержанием гаптоглобина в крови. Другими возможными причинами для «спортивной анемии» могут быть недостаточное потребление белка, изменение профиля липидов в крови, а также дефицит железа. У тренированных лиц в крови преобладают молодые эритроциты и ретикулоциты [4]. Эти вновь образованные эритроциты облегчают прохождение крови через капилляры из-за более высокой текучести мембран, эластичности и деформируемости, что облегчает приток крови в работающие мышцы. Тренировки могут уменьшить вязкость крови за счет повышения деформируемости эритроцитов. Увеличение текучести мембран эритроцитов было зарегистрировано у спринтеров и бегунов на длинные дистанции. Число исследований о влиянии физической нагрузки на стабильность мембран невелико [5]. Важным фактором, приводящим к снижению стабильности мембран, является окислительный стресс. Свободные радикалы дестабилизируют плазматическую мембрану, увеличивают ее проницаемость и снижают текучесть. Актуальным является вопрос о стабилизации клеточных мембран эритроцитов антиоксидантными препаратами, в частности церулоплазмином.

Цель исследования – определить влияние церулоплазмина (ЦП) на состояние клеточных мембран эритроцитов при хронических физических нагрузках субмаксимальной мощности.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 42 белых беспородных крысах. Все эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных. Контрольную группу составили интактные животные. На одну точку исследования брали по 6 животных. Хроническую физическую нагрузку субмаксимальной мощности моделировали ежедневным плаванием животных в течение 30 минут на протяжении 21 дня эксперимента, при этом в 1–7-й дни плавание происходило без груза, а с 8-го по 21-й день – с грузом, соответствующим 2% от массы тела. ЦП вводили внутримышечно в дозе 50% от его физиологического уровня в сыворотке крови на 1-е, 3-и, 5-е сутки эксперимента в суммарной дозе 60 мг/кг от веса тела. В опытах использовали церулоплазмин (НПО «Иммунопрепарат», Уфа). Забор крови производили внутрисердечно на 9-й, 15-й и 21-й день эксперимента после дополнительной максимальной физической нагрузки – плавания в течение 4 минут с грузом 20% от массы тела. Осмотическую резистентность эритроцитов определяли фотометрически по отношению к

растворам хлорида натрия в концентрациях от 0,85% до 0,10% [6]; кислотную резистентность – на основании различной кислотоустойчивости эритроцитов по отношению к HCl [6]; сорбционную резистентность эритроцитов – по способности поглощать краситель метиленовый синий в зависимости от функционального состояния их клеточной мембраны [7]. Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с помощью пакета программ анализа данных Statistica 6.0. Полученные результаты обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики и представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Для определения достоверности различий средних величин применяли критерии непараметрической статистики Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза.

Результаты исследования и их обсуждение

В литературе указывается, что физические нагрузки изменяют состояние клеточных мембран, в том числе и мембран эритроцитов. Дисбаланс физико-химических свойств мембраны может сделать клетку дисфункциональной, препятствуя оксигенации тканей [8]. Показано, что острая интенсивная физическая нагрузка сопровождается снижением осмотической устойчивости эритроцитов [9, 10].

На рисунке 1 представлены осмограммы при ХФН субмаксимальной мощности на 9-е, 15-е и 21-е сутки.

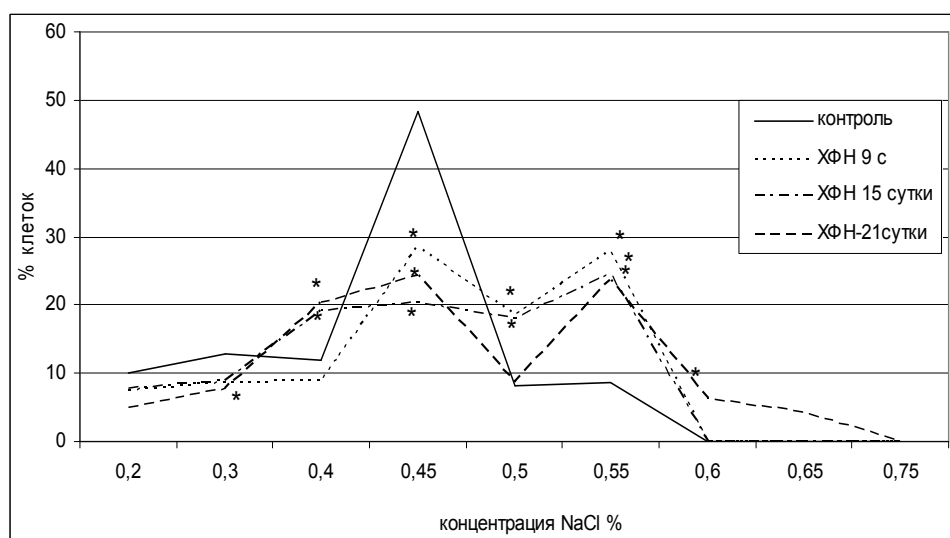


Рис. 1. Изменение осмотической резистентности эритроцитов при ХФН субмаксимальной мощности (тройное правило); * – статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,5$) между контрольной и экспериментальной группами

При ХФН субмаксимальной мощности выявляются две популяции эритроцитов относительно осмотического воздействия. На 9-е сутки эксперимента регистрируется два

пика гемолиза эритроцитов при концентрациях NaCl 0,45 и 0,55%, зона максимального гемолиза смещена вправо. На 15–21-е сутки наблюдается расширение основания кривой осмограммы в диапазоне концентрации NaCl 0,3–0,6%, что свидетельствует об увеличении доли более устойчивых к осмотическому воздействию клеток.

На фоне введения ЦП на 9-е сутки сохраняются два пика гемолиза эритроцитов. На 15-й день эксперимента при введении ЦП увеличивается пик максимального гемолиза при концентрации NaCl 0,55%. На 21-е сутки ЦП сглаживает осмограмму: ее площадь становится больше, а основание – уже, чем при ХФН. Таким образом, ЦП при исследовании на 15-е и 21-е сутки способствует гемолизу старых осмотически неустойчивых клеток (NaCl 0,5–0,6%) (рис. 2).

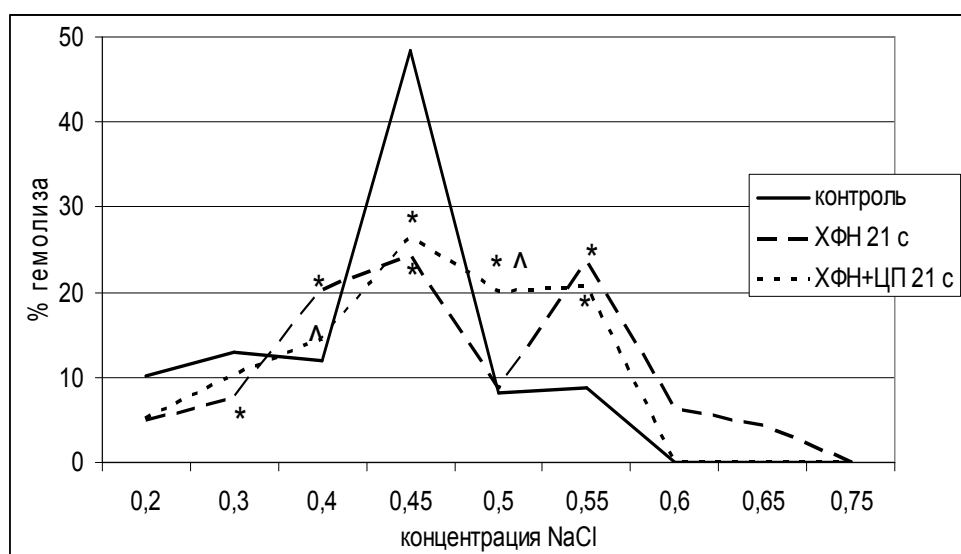


Рис. 2. Осмотическая резистентность эритроцитов при ХФН субмаксимальной мощности под влиянием ЦП на 21-е сутки эксперимента; * – статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни между контролем и ХФН; ^ – достоверность между ХФН и ХФН+ЦП

Относительно кислотного воздействия на 9-е сутки при ХФН субмаксимальной мощности эритроциты стали гемолизироваться на 1 минуту раньше ($p < 0,05$) и достоверно более интенсивно в зоне 8,5–10 минут. Пик гемолиза по времени относительно контроля не изменился. Кривая относительно контроля расширяется вправо и влево. На 15-е сутки ХФН кислотная эритрограмма подобна контрольной с некоторым расширением в обе стороны. Популяция эритроцитов на 21-й день тренировочного процесса становится однородной, пики гемолиза не регистрируются, и кривая в целом сдвигается вправо (рис. 3).

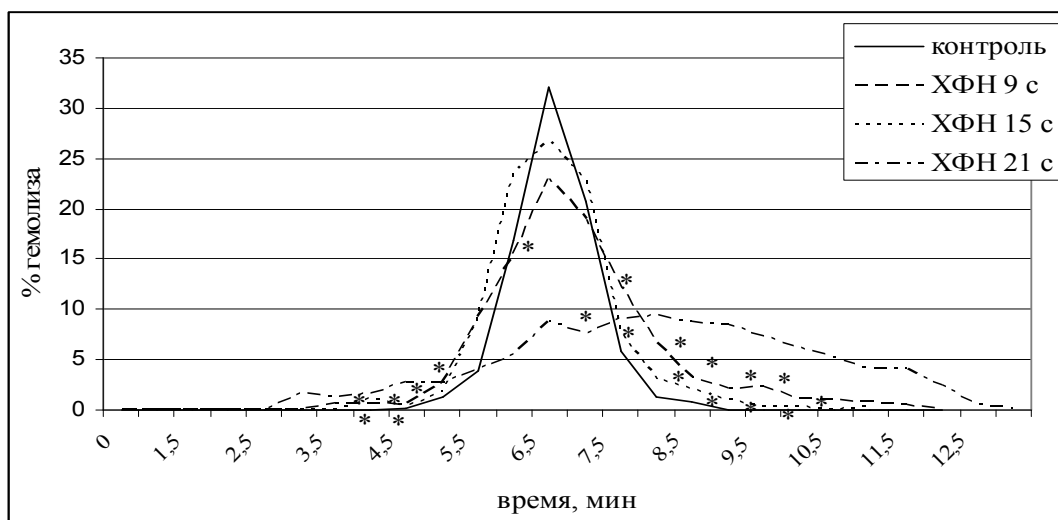


Рис. 3. Изменение кислотной резистентности эритроцитов при ХФН субмаксимальной мощности (тройное правило); * – статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,5$) между контрольной и экспериментальной группами

Итак, в целом при физических нагрузках возрастает процент кислотоустойчивых эритроцитов. Осмотическая, кислотная резистентность эритроцитов при физических нагрузках особенно снижается у нетренированных лиц, у которых преобладают «старые» эритроциты, которые легче подвергаются индуцированному внутрисосудистому гемолизу [2].

Изменение кислотной резистентности эритроцитов под влиянием ЦП на 21-е сутки при ХФН субмаксимальной мощности представлено на рисунке 4.

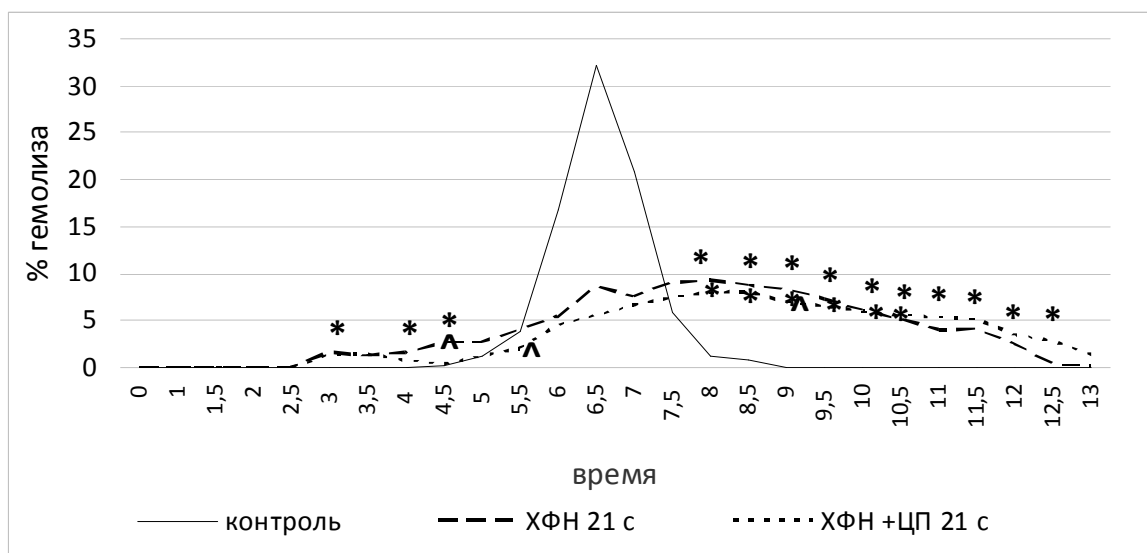


Рис. 4. Кислотная резистентность эритроцитов при ХФН субмаксимальной мощности под влиянием ЦП на 21-е сутки эксперимента; * – статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни между контрольной и экспериментальной группами; ^ – достоверность между ХФН и ХФН+ЦП

ЦП на 9-е сутки сместил кривую вправо относительно контроля и ХФН субмаксимальной мощности, увеличил популяцию устойчивых к кислотному воздействию эритроцитов с пиком гемолиза на 8-й минуте. На 15-е сутки ХФН кислотная эритрограмма подобна контролю с некоторым расширением в обе стороны. Результатом введения ЦП на 15-е сутки является появление двух пиков гемолиза эритроцитов, смещение кривой вправо, что свидетельствует о наличии в крови двух разнородных популяций эритроцитов. Популяция эритроцитов на 21-й день тренировочного процесса при субмаксимальной нагрузке становится однородной, пики гемолиза не регистрируются, и кривая в целом сдвигается вправо. Положительного или отрицательного эффекта ЦП в этот срок не проявилось. Таким образом, с одной стороны, ЦП к 21-м суткам эффективно увеличивает количество эритроцитов относительно ХФН субмаксимальной мощности, с другой – способствует разрушению менее стойких эритроцитов. Возможно, при длительных и интенсивных физических нагрузках в условиях эритропоэза увеличивается количество эритроцитов с измененными морфофункциональными показателями, что способствует снижению их осмотической устойчивости.

Мембранопротекторное действие ЦП при нагрузках можно оценить по сорбционной способности эритроцитов (таблица), которая является одним из показателей состояния мембран. Стабильность мембраны оценивается по ее способности противостоять лизису от действия ксенобиотиков, токсинов, свободных радикалов и других веществ.

Таблица 1

Влияние ЦП на сорбционную резистентность эритроцитов при ХФН субмаксимальной мощности

Группы сравнения	Контроль	Опыт (животные, подвергшиеся ХФН субмаксимальной мощности)		
		9-е сутки	15-е сутки	21-е сутки
Сорбционная резистентность, у.е.				
ХФН	11,43±1,90	14,50±0,79	28,21±2,56*	45,04±3,11*
ХФН+ЦП		14,35±1,33	23,53±4,63*	28,77±3,88*^
Примечание: * – статистическая значимость различий по критерию Манна–Уитни (p<0,05) между контролем и экспериментальной группой; ^–достоверность различий между ХФН и ХФН с ЦП аналогичного срока, количество животных в группах (n=6).				

При ХФН субмаксимальной мощности на 15-е и 21-е сутки эксперимента регистрируется достоверное увеличение сорбционной способности мембран эритроцитов.

ЦП на 21-е сутки достоверно снижает поглощение эритроцитами красителя, но не нормализует показатели до контрольных значений. Воздействие ЦП обусловлено его антиоксидантными свойствами: за счет феррооксидазной активности снижается образование OH^\cdot в реакции Фентона, происходят накопление глутатиона в клетках и генерация RS-NO из высокотоксичных свободных радикалов в тиолсодержащие молекулы клеток [11].

Выводы

Таким образом, ЦП обладает положительным мембранопротекторным действием относительно сорбционной способности. Основа мембранопротекторного действия ЦП – нормализация оксидативного потенциала жидкой части крови и клеточных мембран.

Явного положительного эффекта действия ЦП относительно устойчивости эритроцитов к осмотическому и кислотному воздействию зарегистрировано не было, что может быть связано при физических нагрузках с ускорением оборота клеток [12] и внутрисосудистым гемолизом эритроцитов [13] с последующей активацией эритропоэза. ЦП в определенной мере при хронических физических нагрузках субмаксимальной мощности способствует этому процессу за счет неспецифического эритропоэтического эффекта [14]. Мембраны молодых вновь образованных эритроцитов более устойчивы к повреждающим осмотическим и кислотным воздействиям.

Список литературы

1. Romain A.J., Brun J.F., Varlet-Marie E. Effects of exercise training on blood rheology: a meta-analysis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2011. vol. 49. no. 1-4. P. 199-205.
2. Mairbäurl H., Ruppe F.A., Bartsch P. Role of hemolysis in red cell ATP release in simulated exercise conditions in vitro. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2013. vol. 45. no. 10. P. 1941-1947.
3. Robach P., Boisson R.C., Vincent L., Lundby C., Moutereau S., Gergelé L., Michel N., Duthil E., Féasson L., Millet G.Y. Hemolysis induced by an extreme mountain ultra-marathon is not associated with a decrease in total red blood cell volume. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2014. vol. 1. no. 24. P. 18-27.
4. Peeling P., Dawson B., Goodman C., Landers G., Wiegerinck E.T., Swinkels D.W., Trinder D. Cumulative effects of consecutive running sessions on hemolysis, inflammation and hepcidin activity. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009. vol. 1. no. 106. P. 51-59.
5. Berzosa C., Gómez-Trullén E.M., Piedrafita E., Cebrián I., Martínez-Ballarín E., Miana-Mena F.J., Fuentes-Broto L., García J.J. Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2011 vol. 6. no. 111. P. 1127-1133.

6. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София, 1968. 1064 с.
7. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лабораторное дело. 1988. № 9. С. 22-24.
8. Paraiso L.F., Gonçalves-E-Oliveira A.F., Cunha L.M., de Almeida Neto O.P., Pacheco A.G., Araújo K.B., Garrote-Filho M.D., Bernardino Neto M., Penha-Silva N. Effects of acute and chronic exercise on the osmotic stability of erythrocyte membrane of competitive swimmers. PLoS One. 2017. vol. 2. no. 12. P. E0171318.
9. Ермолаева Е.Н., Сурина-Марышева Е.Ф. Влияние церулоплазмينا на состояние мембран эритроцитов при острых экстремальных воздействиях // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012. Т. 39. № 2. С. 11-12.
10. Сурина-Марышева Е.Ф., Кривохижина Л.В., Кантюков С.А., Сергиенко В.И., Ермолаева Е.Н., Смирнов Д.М. Влияние церулоплазмينا на количество и резистентность эритроцитов при острой физической нагрузке // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 148. № 8. С. 151-153.
11. Добротина Н.А., Рутницкий А.Ю., Гладышева М.В. Полифункциональность церулоплазмينا. Обоснование применения // Успехи современной биологии. 1999. Т. 119. № 4. С. 375-379.
12. Paraiso L.F., de Freitas M.V., Gonçalves-E-Oliveira A.F., de Almeida Neto O.P., Pereira E.A., Mascarenhas Netto R.C., Cunha L.M., Bernardino Neto M., de Agostini G.G., Resende E.S., Penha-Silva N. Influence of acute exercise on the osmotic stability of the human erythrocyte membrane. Int. J. Sports Med. 2014. vol. 13. no. 35. P. 1072-1077.
13. Mohandas N., Gallagher P.G. Red cell membrane: past, present, and future. Blood. 2008. vol. 112. no. 10. P. 3939-3948.
14. Ермолаева Е.Н., Сашенков С.Л., Петухова В.И., Кантюков С.А., Сурина-Марышева Е.Ф. Изменения клеточного состава периферической крови при физических нагрузках субмаксимальной мощности под влиянием церулоплазмينا // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: материалы VII Международной научно-практической конференции (Челябинск, 11–13 октября 2018 г.). Челябинск: Изд-во ЮУрГГПУ, 2018. С. 144-147.