

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

DOI: 10.1134/S086981391812004X

**АДАПТИВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ЭРИТРОЦИТОВ КРЫСЫ ПОСЛЕ
ЦИКЛА ПРИНУДИТЕЛЬНОГО ПЛАВАНИЯ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭКСТРАКТА ЗЕЛЕНОГО ЧАЯ
И АММОНИЙНОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

© Н. В. Гончаров, И. В. Миндукушев, А. В. Новожиллов,
Е. А. Корф, Т. В. Тавровская, М. А. Терпиловский, Д. А. Хмелевской,
Е. А. Скверчинская, А. И. Кривченко

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: ngoncharov@gmail.com

Изучение препаратов природного происхождения, повышающих выносливость и(или) ускоряющих восстановление, является важнейшей задачей спортивной медицины и физиологии. В настоящей работе представлены результаты сравнения эффектов декофеинизированного экстракта зеленого чая (ЭЗЧ) и одного из эндогенных продуктов метаболизма аминокислот — аммиака, который в виде раствора хлорида аммония (NH_4Cl) был апробирован в самостоятельном виде и в сочетании с ЭЗЧ как стимулятор физической работоспособности. В модели принудительного плавания установлен стимулирующий эффект NH_4Cl , превышающий действие ЭЗЧ. Выявлены разнонаправленные адаптивные изменения некоторых биохимических показателей плазмы крови и эритроцитов крыс в группах с применением ЭЗЧ и NH_4Cl , а также усиление действия препаратов на продолжительность выполнения плавательной нагрузки при совместном их использовании. Предложен механизм оптимизации кислородтранспортной и «челночной» функции эритроцитов хлоридом аммония в условиях интенсивной физической нагрузки.

Ключевые слова: физическая нагрузка, выносливость, адаптация, нутрицевтик, аммоний, эритроцит.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 12. С. 1428—1441. 2018

N. V. Goncharov, I. V. Mindukshev, A. V. Novozhilov, E. A. Korf, T. V. Tavrovskaya, M. A. Terpilovsky, D. A. Khmelevskoy, E. A. Skverchinskaya, A. I. Krivchenko. ADAPTIVE BIOCHEMICAL CHANGES OF RAT ERYTHROCYTES AFTER THE CYCLE OF FORCED SWIMMING WITH THE USE OF GREEN TEA EXTRACT AND AMMONIUM PRECONDITIONING. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: ngoncharov@gmail.com.

The study of natural compounds, increasing endurance and (or) accelerating recovery, is the most important task of sports medicine and physiology. This paper presents the results of compa-

ring the effects of decaffeinated green tea extract (GTE) and one of the endogenous products of amino acid metabolism, ammonia, which was tested as a solution of ammonium chloride (NH_4Cl) alone and in combination with GTE as a stimulator of physical performance. In a forced swimming model, the stimulating effect of NH_4Cl was established, which exceeded the action of GTE. Multidirectional adaptive changes of some biochemical parameters of blood plasma and erythrocytes were revealed in rats using GTE and NH_4Cl , as well as enhancing effect of combined application of these compounds on the performance of rats. A mechanism is proposed for optimizing the oxygen transport and shuttle function of erythrocytes by ammonium chloride under conditions of intense physical activity.

Key words: physical load, endurance, adaptation, nutraceutical, ammonium, erythrocyte.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 12. P. 1428—1441. 2018

Исследование механизмов действия препаратов природного происхождения, повышающих выносливость и снижающих утомление, является одним из важнейших направлений спортивной физиологии и медицины. Нутрицевтики (биологически активные добавки и компоненты продуктов питания, минералы и метаболиты природного происхождения, не входящие в списки запрещенных препаратов) могут повышать физическую работоспособность путем положительного влияния на баланс сигнальных и метаболических процессов в клетках и тканях организма [1]. Действие ряда нутрицевтиков, к которым относится экстракт зеленого чая (ЭЗЧ), связано с усилением катаболизма жиров, повышением чувствительности к инсулину и толерантности к глюкозе [2]. Эти и другие эффекты могут способствовать повышению выносливости животных в экспериментальных моделях беговой и плавательной нагрузки [3, 4]. Ранее мы установили, что применение ЭЗЧ в тесте принудительного плавания приводит к повышению выносливости крыс за счет дополнительного участия в работе медленных мышц, адаптация которых сопряжена с повышением экспрессии генов, ответственных за регуляцию баланса ионов Ca^{2+} [5]. Среди биохимических механизмов адаптации, находящихся в реципрокных отношениях с ионами Ca^{2+} , процессы генерации и потребления АТФ имеют определяющее значение в условиях как аэробной, так и анаэробной нагрузки. Лактат и аммиак ранее считались побочными продуктами метаболизма, перенос и нейтрализация которых исключительно в печени осуществлялась посредством циклов Кори и аланина. Переоценка роли лактата была произведена достаточно давно и ныне он рассматривается как важнейший межклеточный энергетический челнок и сигнальный агент [6]. В быстрых мышцах повышается экспрессия монокарбоксилатного переносчика 4-го типа (MCT4) для усиленного экспорта лактата, который попадает в эритроциты и медленные мышцы через MCT1 [7]. Эритроциты помогают транспортировать лактат от клеток-продуцентов к клеткам-потребителям, причем роль эритроцитов у тренированных спортсменов повышается [8].

Однако отношение к аммиаку как исключительно токсическому агенту за последние десятилетия практически не изменилось. Аммиак непрерывно образуется во всех органах и тканях организма. Наиболее активными его продуцентами являются органы с высоким обменом аминокислот и биогенных аминов — нервная ткань, печень, кишечник, мышцы. Основные биохимические источники аммиака — неокислительное дезаминирование некоторых аминокислот в печени, окислительное дезаминирование глутамата во всех тканях, кроме мышечной, дезамидирование глутамина и аспарагина, катаболизм биогенных аминов, жизнедеятельность бактерий толстого кишечника, распад пуриновых и пиримидиновых оснований при участии аденилаткиназы и АМФ-дезаминазы. Аммиак является чрезвычайно токсичным соединением,

поэтому в тканях существуют реакции связывания (обезвреживания) аммиака через образование глутамата, глутамина, аспарагина и карбамоилфосфата. Следует, однако, понимать, что в мышцах генерация аммиака может рассматриваться не только как результат катаболизма аминокислот в качестве источника энергии, но и как компенсаторный механизм для связывания иона водорода и нейтрализации органических кислот (в первую очередь лактата), уровень которых повышается при физической нагрузке, нарушая ионный баланс. В отличие от нетренированных добровольцев повышение выносливости тренированных спортсменов связано не с повышением VO_2 и окислительной емкости мышц, а с адаптивными изменениями в системе регуляции баланса (гомеостаза) ионов Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , H^+ и лактата [9]. Роль аммиака в этой системе адаптивных изменений изучена очень слабо, хотя понятно, что избыток аммиака — это плохо, и применение, например, аргинина и цитруллина, компонентов цикла мочевины, с целью нейтрализации аммиака, образующегося при утилизации разветвленных аминокислот, позволяет повысить выносливость бегунов на длинные дистанции [10]. Действие же малых количеств аммиака/аммония на физическую работоспособность практически не изучено. Кроме того, остается малоизученной роль эритроцитов как транспортного челнока для лактата и аммиака в экстремальных условиях, несмотря на то что кинетические характеристики, белки-переносчики и некоторые закономерности транспорта этих метаболитов в эритроциты и обратно были неоднократно описаны за последние 50 лет [8, 11–13].

Цель настоящей работы — анализ влияния ЭЗЧ и малых доз хлорида аммония (NH_4Cl , 10 мг/кг) на продолжительность плавания и биохимический статус эритроцитов крыс после цикла экстремальных физических нагрузок. В своей работе мы исходили из предположения, что аммиак как один из конечных продуктов катаболизма, влияющий на ионный баланс клеток и кислотно-основное состояние организма, свободно проникающий в эритроциты и другие клетки, в малых дозах введенный в организм через желудочно-кишечный тракт незадолго до выполнения аэробно-анаэробной нагрузки, может способствовать адаптивной перестройке метаболических путей в эритроцитах в условиях предельной физической нагрузки, оптимизируя их основные функции и в конечном итоге повышая выносливость организма.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты проводились с соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 2000 г., а также в соответствии с «Правилами проведения работ с подопытными животными», утвержденными комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН. Крысы-самцы аутбредной линии Вистар содержались в стандартных условиях вивария. Крыс массой 200 ± 10 г предварительно адаптировали к воде в течение 5 дней при температуре воды 32°C , на 6-й день проводили тестирование с грузом 7 % от массы тела: плавание по 3 мин с интервалом 1 мин при температуре воды 28°C до полного утомления. По результатам тестирования крыс разделили на группы в зависимости от продолжительности плавания, так чтобы группы существенно не отличались по средней, минимальной и максимальной продолжительности плавания. Было сформировано 5 групп: 1) интактный контроль (ИК) — животные, не подвергнутые физической нагрузке, $n = 9$; 2) положительный контроль (NaCl) — плавание и введение раствора хлорида натрия в дозе

10 мг/кг, $n = 14$; 3) группа ЭЗЧ — плавание и введение разведенного в воде декофеинизированного экстракта зеленого чая (Sunphenon 90D, Taiyo International Inc., США) ежедневно после приема пищи за 2 ч до нагрузки и через 2 ч после окончания нагрузки в дозе 12 мг/кг в пересчете на катехины, суточная доза катехинов — 24 мг/кг, $n = 21$; 4) группа NH_4Cl — плавание и введение хлорида аммония (Вектон, Россия) в дозе 10 мг/кг за 5 мин до начала плавательной нагрузки, $n = 23$; 5) группа ЭЗЧ + NH_4Cl — плавание и препараты по схеме групп ЭЗЧ и NH_4Cl , $n = 17$. Все препараты вводили перорально, объем вводимых за один раз растворов одному животному не превышал 0.3 мл.

Крысам вводили препараты начиная с понедельника 2-й недели эксперимента. В течение шести дней 2-й и 3-й недель крыс подвергали *нормированной* нагрузке: плавание по 3 мин с интервалом 1 мин при температуре воды 28 °С с грузом 7 % от массы тела, общая продолжительность плавания составляла 50—60 % от показателей тестирования. В первый день 3-й недели эксперимента — промежуточное тестирование (плавание по 3 мин с интервалом 1 мин при температуре воды 28 °С до полного утомления), затем в течение последующих 5 дней продолжение нормированной нагрузки. В течение четырех дней 4-й недели эксперимента давали *предельную* нагрузку — те же условия, но до полного утомления. На 4-й день через 5 мин после окончания нагрузки — взятие крови из хвостовой вены для определения уровня лактата фотометрическим методом с помощью портативного биохимического анализатора Accutrend Plus (Roche Diagnostics GmbH, Германия). На пятый день 4-й недели эксперимента, т.е. через сутки после окончания плавательной нагрузки, животных умерщвляли посредством декапитации гильотиной. Кровь собирали в охлажденные гепаринизированные пробирки, центрифугировали 3 мин при 800g и отбирали плазму для анализа. Эритроциты отмывали дважды в охлажденном растворе 145 мМ NaCl, центрифугируя суспензию эритроцитов при 800g по 3 мин. Надосадок и верхний слой эритроцитов (10 % от общего объема) отбрасывали. Отмытые эритроциты и плазму хранили при -70 °С.

Определение концентрации метгемоглобина (metHb) проводили, используя непрямой метод Evelyn и Malloy в модификации Кушаковского [14]. Определение активности АТФаз проводили по методу Казеннова [15]. Предварительно отделенные от плазмы и отмытые 2 раза охлажденным физиологическим раствором (145 мМ NaCl) эритроциты обрабатывали 1%-ным Твином-20 в 0.25 М сахарозе на 20 мМ трис-НСl буфере (объемы 1 : 1, экспозиция 60 мин при 20 °С). Затем суспензию эритроцитов инкубировали 30 мин при 44 °С в среде следующего состава, мМ конечной концентрации: NaCl — 100, KCl — 10, трис-НСl — 50, MgCl_2 — 3, ЭДТА — 1, АТФ — 2 (рН 7.4). Реакцию останавливали добавлением 0.2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. Активность Na/K-АТФазы определяли по приросту неорганического фосфора (Фн, чувствительность 0.01 мкМ) в среде инкубации и рассчитывали по разнице между активностью АТФаз без ингибитора и в присутствии ингибитора — 0.2 мМ уабаина. Активность выражали в мкмоль Фн в час на грамм гемоглобина эритроцитарной массы. Об активности Ca-АТФазы судили по разнице прироста Фн в среде инкубации, содержащей кроме вышеперечисленного 0.2 мМ CaCl_2 в первом случае и 0.2 мМ CaCl_2 с 0.2 мМ уабаина во втором. Использовали ЭДТА, АТФ и уабаин фирмы Sigma, остальные реактивы — фирмы Вектон. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой на водяной бане в течение 1 ч при температуре 99 °С [16], в качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали 1,1,3,3-тетраэтоксипропан

(Sigma), активность глутатионпероксидазы 1-го типа (ГП1) в эритроцитах (конечная концентрация гемоглобина 300 мкг/мл) и глутатионпероксидазы 3-го типа (ГП3) в плазме крови (разведение в 40 раз до реакции) определяли по методу Разыграева [17]. В обоих случаях в качестве реагентов использовали пероксид водорода (концентрацию последнего контролировали спектрофотометрически с использованием коэффициента молярного поглощения, составляющего при 240 нм $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и восстановленный глутатион (Sigma). Концентрацию общего и окисленного глутатиона (ОГ) определяли по методу [18] с использованием металлического цинка в качестве восстановителя окисленной формы глутатиона, восстановленной формы глутатиона (ВГ) — по методу [19]. Определение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) осуществляли спектрофотометрически при $+37^\circ\text{C}$ в среде pH 8.9 следующего состава, мМ: 100 глицина, 100 NaH_2PO_4 , 5 ЭДТА, 1 НАД^+ , 1 глицеральдегид-3-фосфата. Реакцию начинали внесением гемолизата, конечная концентрация гемоглобина (Hb) составляла 350 мкг/мл реакционной смеси. Регистрировали увеличение абсорбции смеси через 2 мин при длине волны поглощения 340 нм на спектрофотометре UV-2401 PC (SHIMADZU, Япония). Общую концентрацию Hb в отмытых эритроцитах определяли гемиглобинцианидным методом (наборы фирмы Синтакон, Россия). Активность каталазы оценивали по методу [20], глутатионредуктазы (ГР) — по [21], глутатион-S-трансферазы (GST) — по [22] (конечная концентрация гемоглобина 900 мкг/мл), активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) — с использованием наборов RANDOX (Великобритания).

Статистическая обработка материала включала в себя расчет среднего значения и стандартной ошибки среднего ($m \pm \text{SEM}$), а также медианы, 1 и 3 квартиля. Оценку значимости различий между сформированными группами проводили по критерию Стьюдента и Манна—Уитни, для оценки различий зависимых выборок использован Т-критерий Вилкоксона. Уровень корреляции рассчитывали по Спирмену (значение ρ , 2-сторонняя). Различия считали значимыми при уровне достоверности 95 % ($p < 0.05$). Расчеты проводили в двух совместимых средах Excel 2016 и IBM SPSS 23.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Продолжительность плавания и уровень лактата. Оценка работоспособности крыс в тесте принудительного плавания (вынужденное плавание с грузом) показала, что сочетание ЭЗЧ и NH_4Cl повышает продолжительность плавания в 1, 2, 3 и 4-й день предельной нагрузки на 4-й неделе эксперимента (рис. 1). Суммарная продолжительность плавания за 4 дня предельной нагрузки также была максимальной в группе ЭЗЧ+ NH_4Cl . Все экспериментальные группы, за исключением группы NaCl , показали статистически значимый прирост продолжительности плавания в 4-й день предельной нагрузки по отношению к 1-му дню, наиболее выраженный в группе NH_4Cl ($p = 0.05$ для ЭЗЧ, $p = 0.008$ для NH_4Cl , $p = 0.01$ для ЭЗЧ+ NH_4Cl). Средний уровень лактата через 5 мин после окончания нагрузки в 4-й день составил от 6.7 мМ в группе NaCl до 7.8 мМ в группе ЭЗЧ, через час он восстанавливался до уровня интактного контроля (см. таблицу). В группе положительного контроля (NaCl) выявлена обратная корреляционная зависимость между уровнем лактата через 5 мин после нагрузки и продолжительностью плавания в 4-й день (-0.755 , $p < 0.05$).

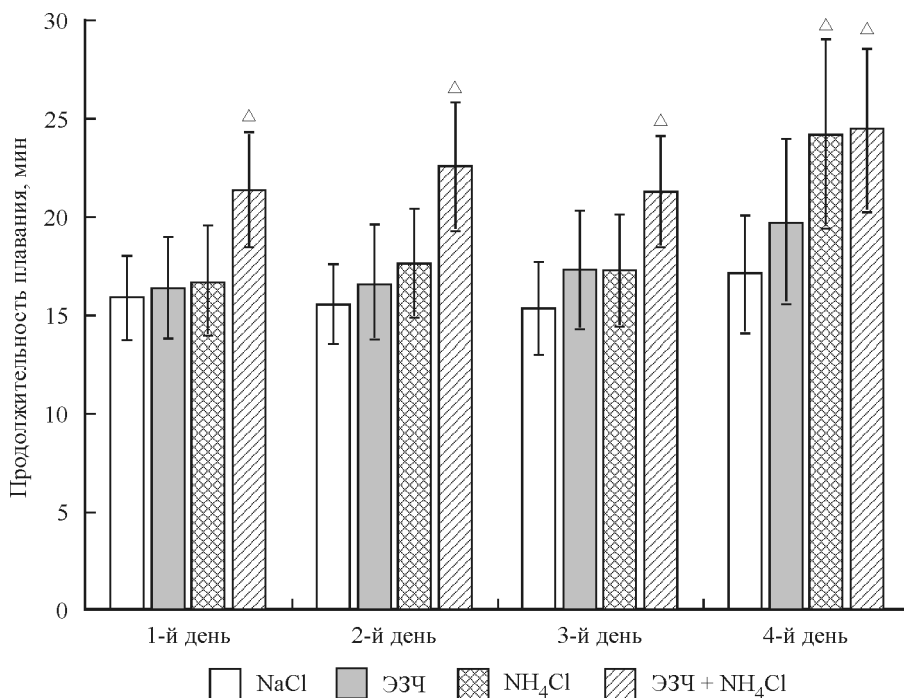


Рис. 1. Продолжительность плавательной нагрузки на 4-й неделе эксперимента для четырех групп животных: NaCl, ЭЗЧ, NH₄Cl, ЭЗЧ + NH₄Cl. Данные представлены по дням (1, 2, 3 и 4-й день) в виде $m \pm SEM$. Δ — $p < 0.05$ по сравнению с группой NaCl.

Биохимические показатели эритроцитов. Физическая нагрузка (группа NaCl) приводила к значимому изменению биохимических показателей эритроцитов (рис. 2). По отношению к показателям интактных животных в группе NaCl выявлено снижение уровня ВГ и МДА на 27 %, снижение активности Г6ФДГ на 25 % и ГАФД на 19 %, но повышение активности ГП1 на 30 % и каталазы на 11 %. Следует отметить более чем 2-кратное снижение активности Са-АТФазы в группе NaCl, однако из-за малой выборки по данному показателю ($n = 3$) и, соответственно, большой погрешности выявленное отклонение недостоверно (см. таблицу). Снижение активности ГР на 19 % также имеет характер тенденции ($p < 0.1$), хотя это отклонение максимально среди всех остальных групп. Изменения показателей ВГ и ГП1, а также каталазы указывают на усиленное потребление глутатиона в эритроцитах, в том числе на нейтрализацию гидроперекисей и предотвращение перекисного окисления липидов (ПОЛ), что, однако, не обеспечивает полноценную защиту ГАФД и не предотвращает эритроциты от АФК-индуцируемого апоптоза [23]. Активность пентозофосфатного шунта снижена и не компенсирует потери ВГ. В то же время снижение активности Г6ФДГ не может быть обусловлено непосредственным воздействием аммония на фермент, так как для этого требуются сублетальные концентрации аммония [24]. Снижение активности ГАФД свидетельствует об ослаблении гликолитического пути утилизации глюкозы, возможно, вследствие окислительной модификации фермента, что уменьшает генерацию NADH и восстановительный потенциал метгемоглобинредуктазы и других NADH-зависимых ферментов. Тем не менее, судя по отсутствию изменений уровня metHb, имеющегося количества NADH достаточно для вос-

Биохимические показатели эритроцитов и плазмы крови
(данные представлены в виде $m \pm SEM$)

Группа	ИК	NaCl	ЭЗЧ	NH ₄ Cl	ЭЗЧ + NH ₄ Cl
Показатели в плазме крови					
Лактат 5 мин, мМ	3.27 ± 0.63	6.71 ± 1.57*	7.81 ± 1.10*	7.11 ± 1.11*	7.44 ± 1.19*
Лактат 1 ч, мМ		2.85 ± 0.30	2.93 ± 0.59	2.64 ± 0.34	3.00 ± 0.46
ГПЗ сутки, мкмоль GSH/мин/г Hb	84.1 ± 11.6	74.8 ± 8.2	80.2 ± 11.3	57.7 ± 10.3	56.0 ± 10.1
Показатели эритроцитов через сутки после окончания цикла плавательной нагрузки					
MetHb, %/г Hb	0.36 ± 0.03	0.42 ± 0.15	0.44 ± 0.11	0.34 ± 0.03	0.51 ± 0.08*
GSH/GSSG	2.50 ± 0.37	2.42 ± 0.37	3.17 ± 0.54	2.36 ± 0.24	2.40 ± 0.26
ГР, нмоль GSH/мин/ г Hb	1177 ± 146	962 ± 121	1097 ± 89	997 ± 101	1173 ± 157
GST, мкмоль GSH- конъюгатов/мин/ г Hb	3.18 ± 0.26	3.24 ± 0.21	3.24 ± 0.12	2.92 ± 0.21	3.09 ± 0.23
ЛДГ, мкмоль НАД + /мин/г Hb	95.9 ± 11.4	89.4 ± 5.5	84.6 ± 11.5	82.4 ± 7.2	83.0 ± 10.8
Са-АТФаза, мкмоль Pi/ч/г Hb	7.58 ± 1.84	3.31 ± 3.05	6.56 ± 2.09	11.25 ± 3.12 ^Δ	9.21 ± 1.71 ^Δ
Na/K-АТФаза, мкмоль Pi/ч/г Hb	43.0 ± 4.8	51.1 ± 5.2	47.0 ± 3.8	42.3 ± 4.6	54.9 ± 6.5

Примечание. * $p < 0.05$ — достоверность отличий от группы ИК, Δ — $p < 0.05$ по сравнению с группой NaCl.

становления metHb. Поскольку NADH образуется не только в результате активности ГФДГ, но также из лактата в результате «обратной» активности ЛДГ (хотя на самом деле для эритроцитарной изоформы ЛДГ1 такая активность является «прямой»), по-видимому, имеет место переориентация эритроцитов на импорт лактата параллельно с адаптивным повышением экспрессии монокарбоксилатного переносчика 1-го типа (MCT1) [8]. Образующийся под действием ГАФД 1,3-бисфосфолипид (1,3-БФЛ), по всей видимости, утилизируется преимущественно через шунт Рапопорта—Люберинга с образованием 2,3-БФЛ, что является наиболее значимой адаптивной реакцией эритроцитов, направленной на снижение сродства гемоглобина к кислороду и повышение его отдачи в тканях, а также поддержание эластичности (деформируемости) эритроцитов [25]. Активизация этого шунта сопряжена с уменьшением синтеза АТФ в фосфолипидкиназной реакции, что объясняет снижение активности Са-АТФазы и предполагает повышение уровня ионов Са²⁺. В результате активируются Са-зависимые К-каналы, это сопряжено с выходом воды через аквапорины (AQ1), входом ионов Cl⁻ через AE1-обменник и дополнительным понижением внутриклеточного pH [26]. Выход воды обуславливает уменьшение объема эритроцитов и повышение концентрации Hb в качестве главного внутриклеточного аниона и осморегулятора. Таким образом, выявленные изменения биохимических показателей в эритроцитах крыс группы положительного контроля позволяют предполагать усиление активности шунта Рапопорта—Люберинга и Са-зависимого снижения pH; возможно усиление АФК-индуцируемого эритроптоза с последующим обновлением пула эритроцитов. По-видимому, эритроциты данной группы импортируют лак-

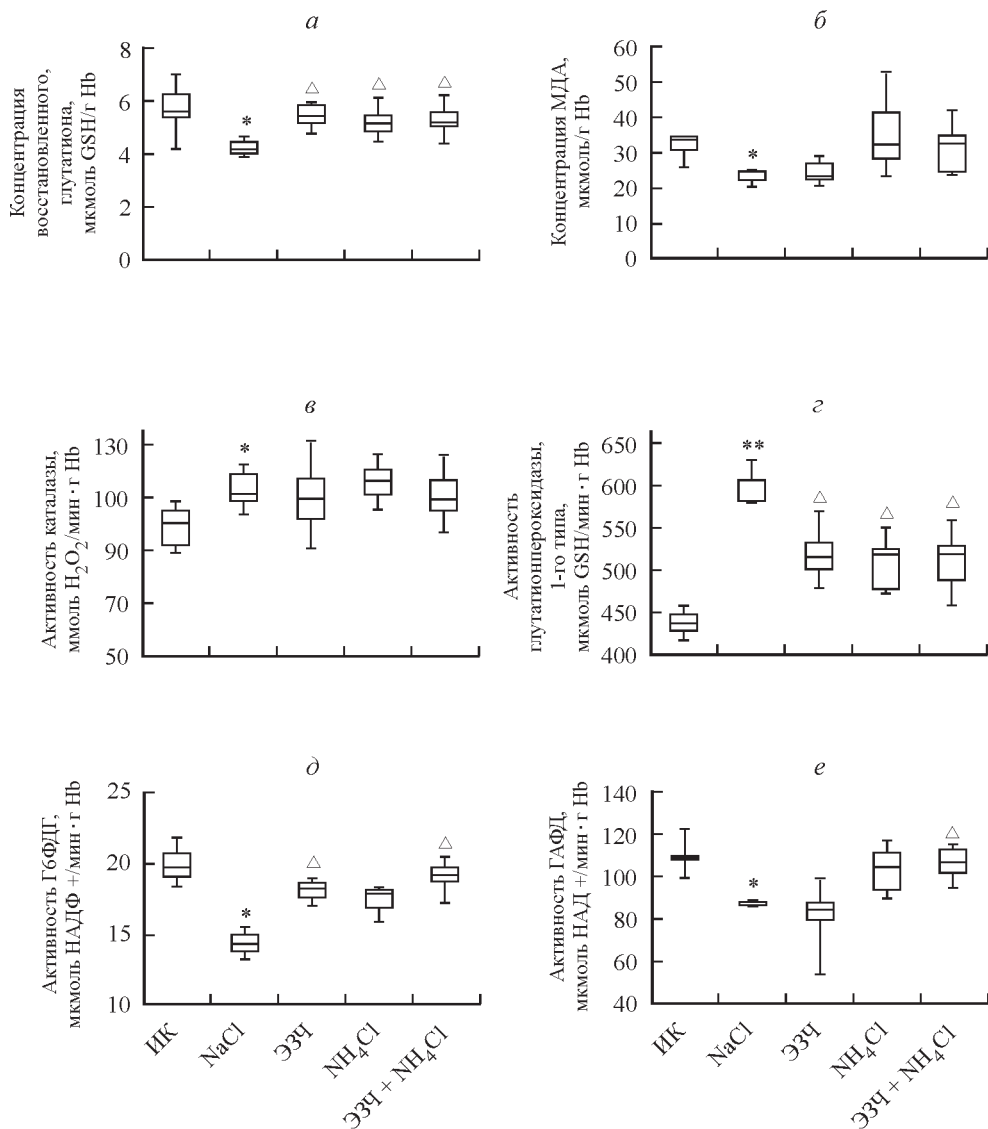


Рис. 2. Биохимические показатели эритроцитов крыс через сутки после окончания цикла плавательной нагрузки для пяти групп животных.

ИК — интактный контроль; NaCl — плавание + NaCl; ЭЗЧ — плавание + экстракт зеленого чая; NH₄Cl — плавание + хлорид аммония; ЭЗЧ + NH₄Cl — плавание + совместное введение препаратов. Данные представлены в виде медиан, 1 и 3 квартиля и крайних значений. * $p < 0.05$ по сравнению с группой ИК (** $p < 0.01$), Δ — $p < 0.05$ по сравнению с группой NaCl.

тат не столько для передачи его медленным мышечным волокнам или печени, сколько для генерации NADH через ЛДГ и поддержания активности метгемоглобинредуктазы; этим также объясняется обратная корреляция между уровнем лактата и продолжительностью плавания крыс в последний день эксперимента. Физиолого-биохимическая адаптация эритроцитов данной группы крыс направлена главным образом на сохранение действующего пула, функциональная активность которого неуклонно снижается; эритропоэз,

возможно, повышен, но его интенсивность не соответствует возросшим потребностям организма.

В группе ЭЗЧ концентрация ВГ статистически значимо выше на 32 % по сравнению с группой NaCl и соответствует уровню интактного контроля, а соотношение ВГ/ОГ на 32—35 % выше, чем в группе ИК и других экспериментальных группах. Как и в группе NaCl, уровень МДА и активность ГАФД снижены по сравнению с группой ИК, однако статистической значимости эти отклонения не имеют, так же как и повышение уровня metHb и активности каталазы (рис. 2, см. таблицу). Активность Г6ФДГ достоверно выше соответствующего показателя в группе NaCl и фактически не отличается от уровня ИК. Таким образом, ЭЗЧ существенно снижает напряжение в системе глутатиона, стабилизируя активность пентофосфатного шунта, а также смягчает снижение активности гликолиза. Образующийся 1,3-БФГ, скорее всего, утилизируется 3-фосфоглицераткиназой с образованием АТФ и сохранением активности Са-АТФазы, что предотвращает Са-зависимый эриптоз, но из-за вероятного дефицита 2,3-БФГ возможно снижение эластичности эритроцитов и нарушение их кислородтранспортной функции. В пользу такого предположения говорит тенденция к снижению активности ЛДГ на 12 % ($p < 0.1$), что может быть связано с необходимостью дополнительного понижения внутриклеточного pH для эффективной реализации эффекта Бора (рKa пирувата существенно ниже рKa лактата: 2.45 vs 3.80). Однако импортируемый лактат в меньшей степени используется ЛДГ по сравнению с эритроцитами группы NaCl. Физиолого-биохимическая адаптация эритроцитов крыс группы ЭЗЧ направлена, по-видимому, на выполнение их основной кислородтранспортной функции в условиях повышенного ангиогенеза и митохондриогенеза в медленных мышечных волокнах при действии ЭЗЧ.

В группе NH₄Cl значение большинства биохимических показателей эритроцитов не отличается от значений группы ИК, за исключением активности Са-АТФазы, которая примерно на 40 % выше соответствующей активности в группах ИК и ЭЗЧ и в 3.4 раза выше активности Са-АТФазы в группе NaCl (рис. 2; см. таблицу). Это позволяет предполагать, что аммонийное прекондиционирование способствует активизации основных метаболических путей эритроцитов, оптимизации процессов связывания и отдачи кислорода наряду с мобилизацией пула молодых эритроцитов [27]. Повышенные энергозатраты эритроцитов должны быть обеспечены определенными звеньями гликолиза, генерирующими АТФ, в частности 3-фосфоглицераткиназой. Шунт Рапопорта—Люберинга в этих условиях не активирован, а повышение отдачи кислорода эритроцитами обеспечивается преимущественно метаболическим ацидозом в результате активности карбоангидразы в условиях повышенной нагрузки, сопряженной с генерацией углекислоты и лактата. NH₄Cl может служить триггером и (или) усилителем такого механизма биохимической адаптации. Тенденция к снижению ЛДГ на 14 % ($p < 0.1$) свидетельствует о включении дополнительного механизма понижения внутриклеточного pH (помимо активности карбоангидразы) за счет сохранения собственного пирувата, тогда как импортируемый лактат быстрых мышечных волокон, скорее всего, идет «на экспорт» в медленные волокна и печень. В то же время у крыс этой группы выявлено снижение активности ГПЗ плазмы крови на 25 % по сравнению с группой ИК, что свидетельствует об увеличении нагрузки на внеклеточные системы антиоксидантной защиты [28]. ГПЗ является компонентом липопротеинов высокой плотности, «сборка» которых осуществляется в печени, поэтому снижение белок-синтезирующей функции печени также может служить причиной снижения активности (а фактически — количества) ГПЗ. Поскольку

ку эта анаболическая функция энергозатратна, ее снижение может быть обусловлено другими энергозатратными функциями, в частности повышением активности глюконеогенеза и цикла мочевины, что сопряжено с усиленной нейтрализацией аммиака. Физиолого-биохимическая адаптация эритроцитов крыс группы NH_4Cl направлена, по-видимому, на оптимизацию кислород-транспортной функции в условиях существующей сети кровеносных сосудов и их «челночной» функции по отношению к лактату. Триггерная либо усиленная функция аммония может состоять в повышении активности карбоангидразы и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника (АЕ1) вследствие повышения pH_i , в том числе за счет акцепции H^+ вблизи анионного обменника АЕ1 нейтральными молекулами аммиака, проходящими через RgAG-канал [29]. Локальное повышение внутриклеточного pH снижает активность шунта Рапопорта—Люберинга [30], повышая, таким образом, активность АТФ-генерирующих и АТФ-потребляющих реакций и обуславливая повышение лактатной емкости эритроцитов. Высокие концентрации углекислоты сильнее влияют на связывание лактата с гемоглобином, по сравнению с влиянием высоких концентраций лактата на карбаминарование гемоглобина [31], что обуславливает экспорт лактата из эритроцитов в наиболее интенсивно работающих медленных мышцах, генерирующих значительное количество углекислоты. Имеющиеся данные позволяют предположить, что действие аммония на эритроциты вызывает эффект, противоположный эффекту Рута, т. е. повышение не только средства кислорода к гемоглобину, но и кооперативности, а значит и транспортной способности гемоглобина [32].

В группе ЭЗЧ+ NH_4Cl отмечено наиболее выраженное снижение активности ГПЗ на 31 % по сравнению с группой ИК, что, по-видимому, свидетельствует об усилении энергозатратных функций печени (детоксикация аммиака в цикле мочевины, глюконеогенез) в ущерб белок-синтезирующей. Повышение активности Са-АТФазы по отношению к группам ИК и ЭЗЧ имеет характер тенденции ($p < 0.1$), но относительно группы NaCl повышение в 2.8 раза статистически значимо (см. таблицу). Главное же отличие показателей эритроцитов этой группы от показателей группы NH_4Cl состоит в повышении активности Na/K -АТФазы и уровня metHb (см. таблицу), свидетельствуя о существенном напряжении адаптационных механизмов эритроцитов крыс, показавших высокую продолжительность плавания в течение всех четырех дней предельной нагрузки. Na/K -АТФаза, как известно, участвует в поддержании тороидальной формы и во многом определяет деформируемость эритроцитов [33]. Наряду с Са-АТФазой Na/K -АТФаза участвует в восстановлении внутриклеточного ионного баланса и формы эритроцитов после прохождения ими капиллярного русла [34]. Активизация гликолиза обычно сопряжена с генерацией лактата и соответствующим расходом NADH . Тенденция к снижению ЛДГ на 13 % ($p < 0.1$) свидетельствует о включении механизма понижения внутриклеточного pH за счет сохранения собственного пирувата. Этот же механизм способствует сохранению NADH , который необходим для метгемоглобинредуктазы, однако его, по-видимому, недостаточно, а импортируемый лактат не может обеспечить возросшую потребность в NADH , так как служит для «переброски» в медленные мышечные волокна. Как следствие — повышенный уровень metHb . Физиолого-биохимическая адаптация эритроцитов крыс группы ЭЗЧ + NH_4Cl направлена как на оптимизацию кислородтранспортной функции в условиях расширенной сети капиллярного русла, так и их «челночной» функции по отношению к лактату. В связи с этим интересно отметить, что в природе существуют аналогии подобного рода адаптивных изменений: так, у некоторых высокогорных животных, на-

пример у оленьих хомячков, повышено сродство кислорода к гемоглобину, но эффект Бора практически не отличается от их равнинных или низкогорных собратьев; механизмом адаптации, повышающим отдачу кислорода тканям, является дополнительная капилляризация мышц, что способствует усилению диффузии кислорода и повышению его отдачи в «труднодоступных» местах [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В модели принудительного плавания крыс показана возможность коррекции некоторых биохимических сдвигов, вызванных предельной физической нагрузкой. Важно отметить, что оба протестированных препарата не являются допингом: ЭЗЧ — нутрицевтик, хлорид аммония — метаболит. Изменения биохимических показателей в эритроцитах крыс группы NaCl позволяют предполагать усиление активности шунта Рапопорта—Люберинга. ЭЗЧ существенно снижает напряжение в системе глутатиона, стабилизируя активность пентозофосфатного шунта, а также смягчает снижение активности гликолиза. Сохранение активности Са-АТФазы становится возможным за счет вероятного дефицита 2,3-БФГ и нарушения кислородтранспортной функции эритроцитов, что влечет за собой компенсаторное снижение активности ЛДГ и импорт лактата. Адаптация эритроцитов направлена на сохранение действующего пула и поддержание или даже усиление их кислородтранспортной функции, что представляется неизбежным с точки зрения повышенного ангиогенеза и митохондриогенеза при действии ЭЗЧ. Действие NH_4Cl способствует активизации основных метаболических путей эритроцитов, оптимизации процессов связывания и отдачи кислорода (в том числе за счет импорта/экспорта лактата), мобилизации пула молодых эритроцитов. Повышенные энергозатраты эритроцитов должны быть обеспечены звеньями гликолиза, генерирующими АТФ, что сопряжено с накоплением пирувата. Другой аспект аммонийного прекодиционирования — повышение активности глюконеогенеза и(или) цикла мочевины в печени. Физиолого-биохимическая адаптация эритроцитов крыс группы ЭЗЧ+ NH_4Cl объединяет в себе механизмы адаптации групп ЭЗЧ и NH_4Cl и направлена, с одной стороны, на оптимизацию кислородтранспортной функции в условиях расширенной сети капиллярного русла, с другой — на реализацию их «челночной» функции по отношению к лактату. Основным механизмом сопряжения между внутриклеточными и тканевыми механизмами адаптации является собственно транспортная функция эритроцитов в самом широком понимании, так как имеется в виду транспорт не только кислорода и CO_2 , но также лактата и аммиака, которые являются не пассивными «пассажирами» эритроцитов, но активно участвуют в усилении основной их функции за счет индукции либо усиления эффектов Бора, Холдейна и Рута. ЭЗЧ способствует митохондриогенезу и васкуляризации мышечной ткани I и IIА типа, тогда как ионы аммония активируют карбоангидразу, повышают лактатную и пируватную емкость эритроцитов, вторично обуславливая снижение сродства гемоглобина к кислороду, в том числе за счет уменьшения кооперативности (эффект Рута). В обычных условиях подобная функция аммиака/аммония включается на относительно поздней стадии физической нагрузки, когда заканчиваются ресурсы жиров и особенно углеводов и дополнительным источником АТФ становятся аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания.

Таким образом, ЭЗЧ и аммонийное прекондиционирование способствуют повышению выносливости в разработанной нами модели принудительного плавания. Более заметным эффект оказался в группах NH_4Cl и ЭЗЧ + NH_4Cl . Выявленные адаптивные изменения биохимических показателей эритроцитов крыс позволяют предполагать триггерную и(или) усилительную функцию экзогенного NH_4Cl , имитирующего терминальную стадию метаболического ацидоза скелетных мышц и активизирующего гликолитический путь окисления глюкозы в эритроцитах без участия шунта Рапопорта—Люберинга. В условиях прекондиционирования «подготовка» эритроцитов для работы в условиях предельной нагрузки происходит не в скелетных мышцах во время выполнения этой нагрузки, а преимущественно в перитонеальных сосудах и портальной вене. Реализация эффекта Бора осуществляется за счет повышенной лактатной (наряду с углекислотной) емкости эритроцитов. Непосредственное влияние ионов аммония на активность карбоангидразы эритроцитов и аффинность гемоглобина к кислороду, не зависящее от влияния pH_i , требует специальных исследований.

Работа выполнена при поддержке госпрограммы № АААА-А18-118012290142-9 и гранта РФФИ № 16-04-00632.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Goncharov N., Maevsky E., Voitenko N., Novozhilov A., Kubasov I., Jenkins R., Avdonin P.* Nutraceuticals in sports activities and fatigue. In: Gupta, R.C. (ed.). *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Amsterdam. Acad. Press/Elsevier. P. 177—188. 2016.
- [2] *Venables M. C., Hulston C. J., Cox H. R., Jeukendrup A. E.* Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 87(7): 78—84. 2008.
- [3] *Murase T., Haramizu S., Shimotoyodome A., Tokimitsu I., Hase T.* Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290(6): R1550—R1556. 2006.
- [4] *Новожилов А. В., Тавровская Т. В., Войтенко Н. Г., Маслова М. Н., Гончаров Н. В., Морозов В. И.* Эффективность экстракта зеленого чая в эксперименте с использованием двух моделей физической нагрузки. *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.* 158(9): 327—332. 2014. [*Novozhilov A. V., Tavrovskaya T. V., Voytenko N. G., Maslova M. N., Goncharov N. V., Morozov V. I.* Efficacy of green tea extract in two exercise models. *Bul. Exp. Biology Medicine.* 158(3): 342—345. 2015. (In Russ.)]
- [5] *Корф Е. А., Кубасов И. В., Вонский М. С., Новожилов А. В., Рунов А. Л., Курчакова Е. В., Матросова Е. В., Тавровская Т. В., Гончаров Н. В.* Экстракт зеленого чая повышает экспрессию генов, ответственных за регуляцию баланса кальция в медленных мышцах крысы, при изнуряющей физической нагрузке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 164(7): 10—14. 2017. [*Korf E. A., Kubasov I. V., Vonsky M. S., Novozhilov A. V., Runov A. L., Kurchakova E. V., Matrosova E. V., Tavrovskaya T. V., Goncharov N. V.* Green tea extract increases the expression of genes responsible for regulation of calcium balance in rat slow-twitch muscles under conditions of exhausting exercise. *Bul. Exp. Biology Medicine.* 164(1): 6—9. 2017. (In Russ.)]
- [6] *Ferguson B. S., Rogatzki M. J., Goodwin M. L., Kane D. A., Rightmire Z.* Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *Eur. J. Appl. Physiol.* 118(4): 69—728. 2018.
- [7] *Maciejewski H., Bourdin M., Feasson L., Dubouchaud H., Denis C., Freund H., Messonnier L.A.* Muscle MCT4 content is correlated with the lactate removal ability during recovery following all-out supramaximal exercise in highly-trained rowers. *Front Physiol.* 7 : 223. 2016.
- [8] *Opitz D., Lenzen E., Opiolka A., Redmann M., Hellmich M., Bloch W., Brixius K., Brinkmann C.* Endurance training alters basal erythrocyte MCT-1 contents and affects the lactate distribution between plasma and red blood cells in T2DM men following maximal exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93(6): 413—419. 2015.

[9] *Hostrup M., Bangsbo J.* Limitations in intense exercise performance of athletes — effect of speed endurance training on ion handling and fatigue development. *J. Physiol.* 595(9): 2897—2913. 2017.

[10] *Cheng I. S., Wang Y. W., Chen I. F., Hsu G. S., Hsueh C. F., Chang C. K.* The supplementation of branched-chain amino acids, arginine, and citrulline improves endurance exercise performance in two consecutive days. *J. Sports Sci. Med.* 15(3): 509—515. 2016.

[11] *Hunter F. R.* Kinetic analysis of the permeability of human erythrocytes to NH₄Cl. *J. Gen. Physiol.* 51(4): 579—587. 1968.

[12] *Musa-Aziz R., Chen L. M., Pelletier M. F., Boron W. F.* Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(13): 5406—5411. 2009.

[13] *Wahl P., Zimmer C., Yue Z., Bloch W., Mester J.* Warming-up affects performance and lactate distribution between plasma and red blood cells. *J. Sports. Sci. Med.* 9(3): 499—507. 2010.

[14] *Покровский А. А. (ред.).* Биохимические методы исследования в клинике. Справочник. М. Медицина. 1969. [*Pokrovskiy A. A. (ed.).* Biohimicheskie metody issledovaniya v klinike. Spravochnik. Biochemical research methods in clinic. Directory. Moscow. Medicine. 1969. (In Russ.)].

[15] *Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д.* Исследование активности Na, К-АТФазы в эритроцитах млекопитающих. *Биохимия.* 49(7): 1089—1094. 1984. [*Kazen-nov A. M., Maslova M. N., Shalabodov A. D.* Na, K-ATPase activity in mammalian erythrocytes. *Biokhimiia.* 49(7): 1089—1094. 1984. (In Russ.)].

[16] *Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопросы мед. химии.* 33(1): 118—122. 1987. [*Gavrilov V. B., Gavrilova A. R., Mazhul L. M.* Methods of determining lipid peroxidation products in the serum using a thiobarbituric acid test. *Vopr. Med. Khim.* 33(1): 118—122. 1987. (In Russ.)].

[17] *Разыграев А. В.* Гомоцистеинпероксидазная активность плазмы крови крыс. Стехиометрия и ферментативный характер реакции. *Биомед. химия.* 59 (6): 636—643. 2013. [*Razygraev A. V.* Homocysteine peroxidase activity in rat blood plasma: stoichiometry and enzymatic character of the reaction. *Biomed Khim.* 59 (6): 636—643. 2013. (In Russ.)].

[18] *Woodward G. E., Fry E. G.* The determination of blood glutathione. *J. Biol. Chem.* 97 : 465—482. 1932.

[19] *Ellman G. L.* Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82 : 70—77. 1959.

[20] *Королюк М. А., Иванова А. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело.* (1): 16—19. 1988. [*Koroliuk M. A., Ivanova A. I., Mäiorova I. G., Tokarev V. E.* A method of determining catalase activity. *Lab. Delo.* (1): 16—19. 1988. (In Russ.)].

[21] *Юсупова Л. Б.* О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов. *Лаб. дело.* (4): 19—21. 1989. [*Iusupova L. B.* Increasing the accuracy of determining the glutathione reductase activity of erythrocytes. *Lab Delo.* (4): 19—21. 1989. (In Russ.)].

[22] *Карпищенко А. И. (ред.).* Медицинские лабораторные технологии: справочник. СПб. Интермедика. 1999. [*Karpischenko A. I. (ed.).* Medicinskiye laboratornye tehnolohii: spravochnik. Medical laboratory technologies: directory. Saint Petersburg. Intermedica. 1999. (In Russ.)].

[23] *Repsold L., Joubert A. M.* Eryptosis: An erythrocyte's suicidal type of cell death. *Biomed Res. Int.* 2018 : 9405617. 2018.

[24] *Erdogan O., Hisar O., Koroglu G., Ciltas A.* Sublethal ammonia and urea concentrations inhibit rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol.* 141(2): 145—150. 2005.

[25] *Suzuki Y., Nakajima T., Shiga T., Maeda N.* Influence of 2,3-diphosphoglycerate on the deformability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1029(1): 85—90. 1990.

[26] *Swietach P., Tiffert T., Mauritz J. M., Seear R., Esposito A., Kaminski C. F., Lew V. L., Vaughan-Jones R. D.* Hydrogen ion dynamics in human red blood cells. *J. Physiol.* 588(24): 4995—5014. 2010.

[27] *Kumar D., Rizvi S. I.* Markers of oxidative stress in senescent erythrocytes obtained from young and old age rats. *Rejuvenation Res.* 17(5): 446—452. 2014.

[28] Ueland P. M., Mansoor M. A., Guttormsen A. B., Müller F., Aukrust P., Refsum H., Svardal A. M. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status — a possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J. Nutr.* 126 (4, supp. 1): 1281S—1284S. 1996.

[29] Johnson D. E., Casey J. R. Cytosolic H⁺ microdomain developed around AE1 during AE1-mediated Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. *J. Physiol.* 589(7): 1551—1569. 2011.

[30] Cho J., King J. S., Qian X., Harwood A. J., Shears S. B. Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(16): 5998—6003. 2008.

[31] Nielsen M. S., Weber R. E. Antagonistic interaction between oxygenation-linked lactate and CO₂ binding to human hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146(3): 429—434. 2007.

[32] Jensen F. B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol. Scand.* 182(3): 215—27. 2004.

[33] Radosinska J., Vrbjar N. The role of red blood cell deformability and Na, K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Physiol. Res.* 65 : S43—S54. 2016.

[34] Danielczok J. G., Terriac E., Hertz L., Petkova-Kirova P., Lautenschlager F., Laschke M. W., Kaestner L. Red blood cell passage of small capillaries is associated with transient Ca²⁺-mediated adaptations. *Front Physiol.* 8 : 979. 2017.

[35] Jensen B., Storz J. F., Fago A. Bohr effect and temperature sensitivity of hemoglobins from highland and lowland deer mice. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 195: 10—14. 2016.

Поступила в редакцию 08.11.2018

После доработки 12.11.2018

Принята к публикации 05.12.2018