



## ГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕМОСТАЗА ПРИ МАКСИМАЛЬНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ У КРЫС

М.А. КОРМИЛИЦЫНА, Е.К. ГОЛУБЕВА, О.А. ПАХРОВА

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Шереметевский пр., д. 8, г. Иваново, 153012, Россия

**Аннотация. Цель исследования** – изучить влияние глутамата натрия и оксида азота на состояние клеточного и коагуляционного гемостаза при максимальной физической нагрузке у крыс. **Материал и методы исследования.** Исследование выполнено на 37 беспородных белых крысах-самцах (27 опытных, 10 контрольных). Для моделирования анаэробной физической нагрузки использовалась методика Порсолта вынужденного плавания с грузом 10-13% от массы тела. Опытным животным за 15 минут до нагрузки подкожно вводили раствор глутамата натрия или нитрита натрия до достижения в крови конечной концентрации 1000 мкмоль/л. В крови определяли агрегационную активность тромбоцитов и коагуляционные свойства плазмы. Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения *Microsoft Excel* и *Statistica 6.0*. **Результаты и их обсуждение.** В ходе исследования показано, что максимальная физическая нагрузка приводит к значительному увеличению продолжительности латентного периода, уменьшению скорости, степени агрегации и процента дезагрегации тромбоцитов. Глутамат натрия уменьшает выраженность депрессивного эффекта нагрузки на агрегационные свойства кровяных пластинок, что проявляется менее выраженным удлинением латентного периода, большей степенью агрегации и возрастанием дезагрегации тромбоцитов, тогда как нитрит натрия усугубляет эффекты физической нагрузки. Предельная мышечная нагрузка приводит к развитию гипокоагулемии вследствие истощения плазменных факторов свёртывания крови. Глутамат натрия и нитрит натрия способствуют прогрессирующему снижению свертывающей способности плазмы крови при предельной мышечной нагрузке.

**Ключевые слова:** максимальная физическая нагрузка, тромбоциты, коагуляционный гемостаз, оксид азота, глутамат.

## HUMORAL REGULATION OF HEMOSTASIS UNDER MAXIMUM PHYSICAL LOAD IN RATS

M.A. KORMILITSYNA, E.K. GOLUBEVA, O.A. PAKHROVA

Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Health of Russian Federation,  
Sheremetevsky pr., 8, Ivanovo, 153012, Russia

**Abstract. The research purpose** was to study the effect of monosodium glutamate and nitric oxide on the state of cellular and coagulation hemostasis during maximum physical activity in rats. **Material and research methods.** The study was performed on 37 outbred white male rats (27 experimental, 10 control). To simulate anaerobic physical activity, the Porsolt technique of forced swimming with a load of 10-13% of body weight was used. Experimental animals were injected subcutaneously with a solution of monosodium glutamate or sodium nitrite 15 minutes before exercise until a final blood concentration of 1000  $\mu\text{mol/L}$  was reached. In the blood, the aggregation activity of platelets and the coagulation properties of plasma were determined. Statistical analysis was performed using *Microsoft Excel* and *Statistica 6.0* software. **Results and its discussion.** The study showed that maximum physical activity leads to a significant increase in the duration of the latent period, a decrease in the rate, degree of aggregation and the percentage of platelet disaggregation. Monosodium glutamate reduces the severity of the depressive effect of the load on the aggregation properties of platelets, which is manifested by a less pronounced lengthening of the latent period, a greater degree of aggregation and an increase in platelet disaggregation, while sodium nitrite aggravates the effects of physical activity. Limiting muscle load leads to the development of hypocoagulemia due to the depletion of plasma coagulation factors. Monosodium glutamate and sodium nitrite contribute to a progressive decrease in the coagulation ability of blood plasma with maximum muscle load.

**Keywords:** maximum physical activity, platelets, coagulation hemostasis, nitric oxide, glutamate.

**Актуальность.** Физическая нагрузка сопровождается активацией процессов аэробного и анаэробного гликолиза. При этом увеличивается концентрация лактата в мышечной ткани и в крови. Повышение

уровня лактата приводит к увеличению кислотности крови, возникновению лактат-ацидоза и недостатку кислорода, что оказывает влияние на функции клеток и органов. Так, острая гипоксия головного мозга проявляется в таком явлении, как эксайтотоксичность, которая является частью ишемического каскада. При физической нагрузке в крови возрастает содержание тромбоцитов, активация которых проявляется увеличением их агрегационной способности, что может привести к протромбогенным состояниям. Показано, что в условиях увеличения кислотности крови происходит стимуляция процессов адгезии, агрегации тромбоцитов и активация плазменных факторов свёртывания крови. Кратковременная физическая нагрузка повышает агрегационные свойства тромбоцитов. Длительная физическая нагрузка способствует изменению коагуляционных и фибринолитических свойств плазмы. У тренированных людей после нагрузки снижается уровень протромбина, плазминогена и их ингибиторов [4].

Из активных тромбоцитов высвобождается глутамат, который может участвовать в развитии патологических состояний. Глутамат натрия является возбуждающим медиатором в головном мозге, но при патологии он превращается в эксайтотоксин, вызывая сужение сосудов, уменьшение активности мелатонина и каталазы, увеличение проницаемости сосудистой стенки, способствуя развитию воспаления нервной ткани. Лактат-ацидоз только усиливает эффект эксайтотоксичности. Повышенная возбуждимость способствует притоку кальция и усилению выделения глутамата. Известно о модулирующем влиянии оксида азота на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз [3]. Актуальным является изучение влияния гуморальных факторов на гемостаз при различных функциональных состояниях. Эта информация позволит выявить возможные причины и механизмы нарушения процесса свертывания крови и может быть использована для успешной терапии и профилактики таких патологических состояний, как ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, цереброваскулярные нарушения.

**Цель исследования** – изучить влияние глутамата натрия и оксида азота на состояние клеточного и коагуляционного гемостаза при максимальной физической нагрузке у крыс.

**Материал и методы исследования.** Для исследования были выбраны 37 белых беспородных крыс-самцов (из которых 27 животных были опытными, а 10 животных контрольными), массой 300-350 г. Все крысы содержались в условиях вивария на стандартном рационе питания, имели свободный доступ к воде. Манипуляции с крысами проводились согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (ETS № 123, принятой в Страсбурге 18.03.1986 и подтвержденной 15.06.2006.). На проведение исследований получено разрешение этического комитета ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России (№ 5 от 06.11.2019 г). Моделью максимальной физической нагрузки была выбрана методика Порсолта вынужденного плавания с грузом. Лабораторным животным, перед плаванием, к основанию хвоста привязывался груз, массой 10-13% от массы тела для моделирования анаэробной физической нагрузки. Температура воды находилась в диапазоне 22-27°C. Группу контроля составили 10 интактных животных. Опытные крысы были разделены на три группы. Животные первой группы плавали без каких-либо дополнительных воздействий. Критерием максимальной физической нагрузки служил отказ от попыток всплыть на поверхность и опускание на дно бассейна без плавательных движений. Крысам второй и третьей групп за 15 минут до нагрузки подожно вводили раствор глутамата натрия или нитрита натрия соответственно в количествах, необходимых для достижения в крови конечной концентрации 1000 мкмоль/л [2]. Все результаты сравнивались с контрольными параметрами интактных крыс. Эвтаназию животных производили при помощи цервикальной дислокации. Кровь забирали из левого желудочка сердца, смешивали с цитратом натрия в соотношении 9:1, после чего при центрифугировании в течение 15 минут при 1500 об/мин., получали обогащенную тромбоцитами плазму, которую использовали для исследования агрегационной активности тромбоцитов. Бедной тромбоцитами плазму получали путем повторного центрифугирования оставшейся крови в течение 10 минут при 3000 об/мин. Агрегационную активность тромбоцитов оценивали на анализаторе агрегации тромбоцитов АТ-02 (Россия) турбидиметрическим методом. Агрегацию тромбоцитов вызывали раствором АДФ в конечной концентрации 5 мкмоль/л. Определяли продолжительность латентного периода (лаг-фаза) (с), скорость агрегации (на 30-й секунде) (%/мин), степень агрегации (%), время агрегации (с), степень дезагрегации (%). Для оценки коагуляционных свойств производили определение *активированного частичного тромбопластинового времени* (АЧТВ), тромбинового времени, протромбинового времени и содержание фибриногена в бедной тромбоцитами плазме. Измерения производили на полуавтоматическом коагулометре ECL 105 (*ErbaLachema*, Чехия), при помощи диагностических наборов (ООО "Технология-Стандарт").

Вариационный анализ результатов проводился в электронных таблицах *Microsoft Excel* и программе *Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.)*. При помощи критерия Шапиро-Уилка оценивали нормальность распределения. Чтобы оценить достоверность наблюдаемых различий использовали *t*-критерий Стьюдента и непараметрические критерии Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни. Данные представлены в виде выборочного среднего (*M*) и ошибки среднего (*m*). Различия считались достоверными при уровне значимости статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Проведенное исследование показало, что у всех испытывавших максимальную физическую нагрузку крысы параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов значительно отличаются от показателей интактных животных (табл.1).

Так, физическая нагрузка сопровождается значительным увеличением продолжительности латентного периода, уменьшением скорости, максимальной амплитуды агрегации и процента дезагрегации тромбоцитов. Это указывает на угнетение агрегационной способности кровяных пластинок, вероятно, на фоне развивающегося лактат-ацидоза, который угнетает стимулирующее влияние АДФ на обратимую агрегацию тромбоцитов. Удлинение латентного периода, возможно, обусловлено уменьшением количества плотных гранул тромбоцитов или повреждением сигнальных механизмов адгезии тромбоцитов в результате нарушения экспрессии рецепторов. Повышенное количество водородных ионов в среде приводит к уменьшению степени диссоциации карбоксильных групп сиаловых кислот, и как следствие, снижению взаимного отталкивания и спонтанному необратимому склеиванию кровяных пластинок. Это, в свою очередь, проявляется снижением агрегирующего действия АДФ [4].

Таблица 1

Показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов ( $M \pm m$ )

Группа	Латентный период, с	Скорость агрегации, %/мин	Степень агрегации, %	Время агрегации, с	Степень дезагрегации, %
Контроль (n=10)	8,70±0,17	47,00±5,93	62,55±2,19	394,29±20,51	3,41±0,49
1 группа (физическая нагрузка, n=9)	21,43±0,99 *(p=0,00001)	2,71±0,46 *(p=0,0000)	7,06±0,65 *(p=0,0000)	359,86±28,10	1,07±0,70 *(p=0,02)
2 группа (глутамат натрия, n=9)	14,40±2,06 *(p=0,05) ^ (p=0,02)	3,86±0,84 *(p=0,0000)	18,44±4,18 *(p=0,00006) ^ (p=0,05)	344,60±25,16	17,24±4,78 *(p=0,04) ^ (p=0,03)
3 группа (нитрит натрия, n=9)	13,08±0,66 *(p=0,00002) ^ (p=0,00002)	0,95±0,26 *(p=0,0000) ^ (p=0,007) # (p=0,02)	1,62±0,31 *(p=0,0000) ^ (p=0,00004) # (p=0,02)	240,00±10,84 *(p=0,0000) ^ (p=0,0004) # (p=0,01)	0,00±0,00 *(p=0,0000) # (p=0,02)

*Примечание:* (здесь и далее) \* – статистически значимые различия с показателями в контроле ( $p \leq 0,05$ );  
 ^ – статистически значимые различия параметров 2 и 3 групп с параметрами 1 группы ( $p \leq 0,05$ );  
 # – статистически значимые различия параметров 2 и 3 групп ( $p \leq 0,05$ )

Вызванная предельной физической нагрузкой стресс-реакция и связанное с ней высокое содержание катехоламинов приводят к появлению в крови популяции биполярных, менее зрелых тромбоцитов. Эти клетки обладают функциональной инертностью, то есть, не способны к адгезии и агрегации, что является защитной реакцией организма против развития тромбоза в условиях повышенного содержания в крови агонистов тромбоцитов, на фоне гиперкатехоламинемии.

Предварительное введение глутамата натрия несколько нивелирует описанные изменения, что проявляется менее выраженным удлинением латентного периода и большей амплитудой максимальной агрегации, чем при отсутствии дополнительных гуморальных воздействий. При этом степень дезагрегации в 5 раз возрастает по сравнению с контролем. Вероятно, взаимодействие глутамата с *N*-метил-*d*-аспартат (*NMDA*)-рецепторами и  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (*AMPA*)-рецепторами мембраны тромбоцитов приводит к стимуляции их АДФ-индуцированной агрегации. Активация *NMDA*-рецепторов сопровождается увеличением кальциевой проницаемости мембраны, количества внутриклеточного кальция и активации  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных механизмов. Происходит активация протеинкиназ, увеличение содержания арахидоновой кислоты и фактора активации тромбоцитов, стимулирующих агрегацию [5].

Экзогенный донатор оксида азота (нитрит натрия), напротив, усугубляет депрессию агрегационной активности тромбоцитов в условиях ацидоза, что проявляется наиболее выраженным уменьшением скорости и максимальной амплитуды агрегации, в отличие от животных других серий. У крыс, получавших нитрит натрия, время достижения максимальной амплитуды агрегации минимально, а дезагрегация не происходит. Ингибирующее действие оксида азота обусловлено торможением накопления внутриклеточного кальция вследствие активации гуанилатциклазы и синтеза в тромбоцитах цГМФ, который угнетает активацию фосфолипаз *A2* и *C* что предупреждает образование тромбоксанов *A2* и *B2*. Происходит распад мембранных фосфолипидов, стимулирующих накопление в тромбоцитах  $Ca^{2+}$ . Снижение актив-

ности фосфолипазы C приводит к нарушению синтеза инозитол-3-фосфата и диацилглицерола. В результате нарушается выход кальция из внутриклеточного депо. Кроме того, цГМФ тормозит движение  $Ca^{2+}$  в кровяные пластинки через плазматическую мембрану, снижая концентрацию ионов в цитоплазме тромбоцитов, а также активизирует цГМФ-зависимую протеинкиназу и  $Ca^{2+}$ -АТФазу, из-за чего происходит отток кальция из клеток и возвращение его во внутриклеточное депо. Изменение активности цГМФ-зависимой протеинкиназы, способствует фосфорилированию тромбоцитарного фосфопротеина, приводя к ингибированию тромбоцитарных рецепторов, чувствительных не только к АДФ, но и к фибриногену [6].

Максимальная физическая нагрузка приводит к нарушению коагуляционных механизмов гемостаза (табл.2). Так, тромбиновое время увеличивается на 18%, протромбиновое время – на 33%, а количество фибриногена значительно снижается (в 2 раза).

Таблица 2

Показатели коагуляционного гемостаза ( $M \pm m$ )

Группа	АЧТВ, с	Тромбиновое время, с	Фибриноген, г/л	Протромбиновое время, с
Контроль (n=10)	21,26±1,73	38,79±2,13	1,46±0,06	25,01±1,32
1 группа (физическая нагрузка, n=9)	21,95±0,76	46,08±1,72 *(p=0,02)	0,73±0,04 *(p=0,00003)	33,24±1,99 *(p=0,005)
2 группа (глутамат натрия, n=9)	29,89±1,38 *(p=0,002) ^ (p=0,0006)	45,7±3,71	0,70±0,03 *(p=0,00003)	68,24±10,95 *(p=0,02) ^ (p=0,03)
3 группа (нитрит натрия, n=9)	34,25±2,18 *(p=0,0003) ^ (p=0,0005)	41,05±3,24	0,58±0,02 *(p=0,00002) ^ (p=0,01) #(p=0,02)	59,35±12,91 *(p=0,04)

Предельная физическая нагрузка может приводить к коагулопатии потребления. Гипоксия, развивающаяся при интенсивной мышечной деятельности, сопровождается гиперкоагулемией, которая может смениться гипокоагулемией вследствие истощения ресурсов плазменных факторов свёртывания крови. Увеличение интенсивности образования тромбина, который, взаимодействуя с фибриногеном, вызывает появление в крови большого количества фибрина-мономера и его комплексов. Это приводит к рефлекторной активации антисвёртывающего аппарата. В кровоток начинают поступать гепарин и активаторы плазминогена. Плазмин расщепляет не только фибрин и фибриноген, но также V, VIII и другие плазменные факторы свертывания крови, чем объясняется гипокоагуляция в условиях гиперплазминемии. Снижение концентрации фибриногена является следствием его активного превращения в молекулы фибрина при ускоренном образовании тромбина [1].

Введение перед максимальной физической нагрузкой глутамата натрия или нитрита натрия способствует прогрессирующему снижению свертывающей способности плазмы крови. У животных обеих серий наблюдается увеличение АЧТВ по сравнению с показателем первой серии крыс, подвергнутых принудительному плаванию. Также происходит увеличение протромбинового времени, наиболее выраженное после предварительной инъекции глутамата натрия. Кроме того, влияние нитрита натрия проявляется значительным снижением концентрации фибриногена, которая на 21% меньше, чем у животных первой экспериментальной серии.

**Заключение.** Таким образом, максимальная физическая нагрузка приводит к угнетению агрегационной способности тромбоцитов и нарушению коагуляционных механизмов гемостаза у крыс. Глутамат натрия уменьшает выраженность депрессивного эффекта нагрузки на агрегационные свойства кровяных пластинок, тогда как нитрит натрия его усугубляет. Глутамат натрия и нитрит натрия способствуют прогрессирующему снижению свертывающей способности плазмы крови при предельной мышечной нагрузке.

*Работа выполнена в соответствии с планом исследования по государственному заданию ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России на 2022 г. "Функциональный резерв гемостаза и реологии крови при гипоксических состояниях в норме и патологии"*

#### Литература

1. Блажко А.А., Шахматов И.И., Ковалев И.В., Киселев В.И., Бондарчук Ю.А., Улитина О.М., Алексеева О.В. Выявление состояния тромбоцитарной готовности у крыс при однократной сверхпорого-

вой физической нагрузке разной продолжительности методом тромбоэластографии // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2019. Т.12, №4. С. 460–469. DOI: 10.17516/1997-1389-0312

2. Пахрова О.А., Голубева Е.К., Кормилицына М.А., Томилова И.К. Влияние гуморальных факторов на гемостатические свойства крови *in vitro* у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т.172, №11. С. 570–575. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-11-570-574

3. Тихомирова И.А., Муравьев А.В., Петроченко Е.П., Малышева Ю.В., Петроченко А.С. Влияние доноров оксида азота и сероводорода на показатели свертывания крови // Гемостаз, тромбоз и реология. 2022. №1. С. 45–52. DOI: 10.25555/THR.2022.1.1008

4. Шахматов И.И., Киселёв В.И. Универсальные механизмы реагирования системы гемостаза на действие различных стрессоров // Бюллетень медицинской науки. 2017. Т.5, №1. С. 14–19.

5. Kalev-Zylinska M.L, Morel-Kopp M-C., Ward C.M., Hearn J.I., Hamilton J.R., Bogdanova A.Y. Ionotropic glutamate receptors in platelets: opposing effects and a unifying hypothesis // Platelets. 2021. Vol.32, №8. P. 998–1008. DOI: 10.1080/09537104.2020.1852542

6. Münzer P., Borst O. CRACKing the Molecular Regulatory Mechanism of SOCE during Platelet Activation in Thrombo-Occlusive Diseases // Cells. 2022. Vol.11, №619. P. 2–19. DOI: 10.3390/cells11040619

### References

1. Blazhko AA, SHahmatov II, Kovalev IV, Kiselev VI, Bondarchuk YUA, Ulitina OM, Alekseeva OV. Vyyavlenie sostoyaniya tromboticheskoy gotovnosti u krysv pri odnokratnoj sverhporogovoy fizicheskoy nagruzke raznoj prodolzhitel'nosti metodom tromboelastografii [Identification of the state of thrombotic readiness in rats with a single super-threshold exercise of different duration by thromboelastography]. ZHurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologiya. 2019;12(4):460-9. DOI: 10.17516/1997-1389-0312. Russian.

2. Pahrova OA, Golubeva EK, Kormilicyna MA, Tomilova IK. Vliyanie gumoral'nykh faktorov na gemostaticheskie svoystva krovi in vitro u krysv [Influence of humoral factors on hemostatic properties of blood in vitro in rats]. Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny. 2021;172(11):570-575. doi: 10.47056/0365-9615-2021-172-11-570-574. Russian.

3. Tihomirova IA, Murav'ev AV, Petrochenko EP, Malysheva YUV, Petrochenko AS. Vliyanie donorov oksida azota i serovodoroda na pokazateli svertyvaniya krovi [The influence of nitric oxide and hydrogen sulfide donors on blood clotting parameters]. Gemostaz, tromboz i reologiya. 2022;1:45-52. DOI: 10.25555/THR.2022.1.1008. Russian.

4. SHahmatov II, Kiselyov VI. Universal'nye mekhanizmy reagirovaniya sistemy gemostaza na dejstvie razlichnykh stressorov [Universal mechanisms of hemostasis system response to the action of various stressors]. Byulleten' medicinskoj nauki. 2017;5(1):14-9. Russian.

5. Kalev-Zylinska ML, Morel-Kopp MC, Ward CM, Hearn JI, Hamilton JR, Bogdanova AY. Ionotropic glutamate receptors in platelets: opposing effects and a unifying hypothesis. Platelets. 2021;32(8):998-1008. DOI: 10.1080/09537104.2020.1852542

6. Münzer P, Borst O. CRACKing the Molecular Regulatory Mechanism of SOCE during Platelet Activation in Thrombo-Occlusive Diseases. Cells. 2022;11(619):2-19. DOI: 10.3390/cells11040619

---

### Библиографическая ссылка:

Кормилицына М.А., Голубева Е.К., Пахрова О.А. Гуморальная регуляция гемостаза при максимальной физической нагрузке у крыс // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2022. №5. Публикация 3-7. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-5/3-7.pdf> (дата обращения: 18.10.2022). DOI: 10.24412/2075-4094-2022-5-3-7. EDN IFWITD\*

### Bibliographic reference:

Kormilitsyna MA, Golubeva EK, Pakhrova OA. Gumoral'naja reguljacija gemostaza pri maksimal'noj fizicheskoy nagruzke u krysv [Humoral regulation of hemostasis under maximum physical load in rats]. Journal of New Medical Technologies, e-edition. 2022 [cited 2022 Oct 18];5 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-5/3-7.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-5-3-7. EDN IFWITD

\* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-5/e2022-5.pdf>

\*\*идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после выгрузки полной версии журнала в eLIBRARY