

УДК 612.014.43

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ И ТКАНЕВОЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОБАХ У ВЕЛОСИПЕДИСТОВ ВМХ

Литвин Ф. Б.

*Смоленская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, Смоленск,
Россия
E-mail: bf-litvin@yandex.ru*

В работе показаны возможности применения метода лазерной доплеровской флоуметрии для оценки состояния системы микроциркуляции кожных покровов в верхних конечностях 14 высококвалифицированных спортсменов велосипедистов ВМХ. Состояние микрокровотока и уровень метаболизма оценивали при проведении локальных температурных проб с разным температурным режимом. Для оценки адаптивных изменений применялся вейвлет-анализ сигнала, регистрируемого методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ)-грамм. Уровень метаболизма оценивали способом флуоресцентной спектроскопии по оценке активности тканевых коферментов: восстановленного НАДН и окисленного кофермента ФАД. По результатам тепловой и холодной проб выявлен разный уровень функционального резерва микроциркуляторного русла, состояние адаптационных механизмов, а также изменения концентрации коферментов.

Ключевые слова: микроциркуляция, спортсмены, лазерная доплеровская флоуметрия, температурная проба, коферменты.

ВВЕДЕНИЕ

В современном спорте достижение рекордных показателей зависит от адекватного запросам рабочих органов, обеспечения клеток пластическим и энергетическим материалом [1]. Непосредственным исполнителем по доставке этих ресурсов выступает микроциркуляторное русло. Система микроциркуляции обладает изменчивостью динамических характеристик и создает условия для адаптации кровотока к внешним нагрузкам [2]. Изучение показателей микроциркуляции имеет важное прикладное значение для спортивной физиологии. В частности, при соревновательной деятельности в различных температурных природно-климатических условиях. Для оценки функционального состояния организма и уровня его работоспособности в зависимости от температурного фона среды, перспективным диагностическим инструментом выступает тепловая и холодная пробы. Исследованиями последних лет [3, 4] были выявлены функциональные изменения нутритивного кровотока, особенности механизмов регуляции в зависимости от величины локальной температуры. Открытым остается вопрос биоэнергетического обеспечения клеточного метаболизма. Возможность витального изучения работы ферментных систем клеточного метаболизма появилась с

использованием флуоресцентной спектроскопии для характеристики флуоресценции восстановленных никотинамидадениндинуклеотидов (НАДН) и окисленных флавопротеидов (ФП) в видимой области спектра [5]. Активность ферментов зависит от многих факторов, среди которых первостепенное значение имеет температура среды. Повышение температуры в интервале 0–50 °С обычно приводит к плавному увеличению ферментативной активности, что связано с ускорением процессов формирования фермент-субстратного комплекса и всех последующих событий катализа. При повышении температуры на каждые 10 °С скорость реакции увеличивается примерно вдвое (правило Вант-Гоффа) [6]. Окислительный метаболизм зависит от того в окисленной или восстановленной форме находятся коферменты НАДН, НАД⁺, НАДФН, ФАД⁺, ФАДН₂ участвующие в окислительно-восстановительных реакциях [7–9]. Следовательно, соотношение окисленных и восстановленных форм окислительного метаболизма определяется функциональной активностью клетки. Количественные флуориметрические показатели весьма информативны для интегральной оценки функционального состояния организма [5].

В связи с этим целью исследования явилось изучение функциональных изменений и уровня метаболизма при температурных пробах у велосипедистов ВМХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях приняло участие 14 велосипедистов ВМХ от 1 разряда до МС на базе СДЮШОР Брянской области. Все участники экспериментальных исследований были ознакомлены с содержанием исследования и подписали форму информированного согласия с указанием их готовности к участию в работе. Исследование гемодинамических и метаболических параметров осуществлялось с использованием ЛДФ – канала и флуоресцентной спектроскопии комплекса «ЛАЗМА МЦ» (ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва). Тепловую и холодную пробы проводили при помощи аппарата «ЛАЗМА-ТЕСТ» ((ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва). В процессе исследований оптический зонд устанавливали на вентральной поверхности 4 пальца правой кисти. Для частотного анализа различных механизмов регуляции: пассивных, формирующихся вне микроциркуляторного русла и попадающих в микрососуды извне с током крови, и активных, образующихся в микроциркуляторном русле и отражающих динамические изменения тонус-формирующих механизмов, применялась программа LDF3.0.2.384 (ООО НПП «ЛАЗМА»). Программа реализует непрерывное вейвлет-преобразование с использованием в качестве анализирующего вейвлета комплекснозначный вейвлет Морле [10, 11]. Каждое исследование состояло из 4 этапов: базовый тест в течение 8 мин, охлаждение до 10 °С – 1 мин и локальные тепловые пробы 35 °С и 40 °С по 4 мин каждая. Таким образом, общая длительность измерения составляла 17 минут. Все исследования проводились в положении сидя в условиях физического и психологического покоя с адаптацией испытуемых к температуре помещения 20–24 °С в течение 10 минут. В качестве параметров, анализируемых методом ЛДФ, регистрировали неосцилляторные показатели базального кровотока: показатель перфузии (ПМ, пф. ед.), среднее квадратичное отклонение (флак, СКО, пф. ед.), коэффициент вариации (Kv, %). С помощью вейвлет-анализа ЛДФ-сигнала

определяли амплитуды колебаний кровотока разных частотных диапазонов. Наиболее низкая частота (0,0095–0,02 Гц) характерна для эндотелиальных колебаний, обусловленных периодическими сокращениями эндотелиоцитов. Эндотелиальные колебания отражают воздействие гуморально-метаболических факторов на микрососудистое русло и характеризуют состояние нутритивного кровотока [12]. Колебания в частотах 0,07–0,15 Гц, или миогенные колебания, обусловлены периодической активностью гладкомышечных волокон артериол, приводящих к изменению диаметра их просвета (вазомоции) [13]. На такую периодичность констрикции и дилатации микрососудов накладываются нейрогенные колебания (0,02–0,046 Гц), отражающие симпатическую регуляторную активность [14]. К высокочастотным колебаниям относятся дыхательные (0,15–0,4 Гц) и пульсовые (0,8–0,16 Гц). Дыхательные волны представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки [14]. Пульсовые колебания кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [10]. Методом флуоресцентной спектроскопии оценивали спектральную мощность тканевых коферментов: восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и окисленного флавинадениндинуклеотида (ФАД). Проводился статистический анализ полученных данных. Для сравнения переменных использовался непараметрический критерий Т Вилкоксона. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе полученных данных с первоначальным кратковременным (1 минута) понижением температуры в области зондирования микрокровотока и последующим ее повышением было выявлено разнонаправленные изменения гемодинамических показателей микроциркуляторного русла кожи. Понижение температуры до 10 °С сопровождается снижением перфузии на 25 % и показателя флакса – на 54 % (таблица 1).

Снижение величины флакса обычно свидетельствует об угнетении активных вазомоторных механизмов модуляции тканевого кровотока или преобладании в регуляции тонических симпатических влияний [15]. Кратковременное воздействие низкой температуры не позволяло регистрировать эндотелиальные колебания. Среди активных механизмов отмечается достоверное снижение на 35 % амплитуды нейрогенных и на 37 % миогенных осцилляций ($p < 0,05$). Следовательно, кратковременное холодное раздражение терморцепторов вызывает мощную вазоконстрикторную реакцию миоцитов в стенке мелких артериол и гладкомышечных клеток прекапиллярных сфинктеров. Среди пассивных механизмов при охлаждении до 10 °С существенных изменений не наблюдается. Снижение притока крови в обменное звено микроциркуляторного русла, по всей видимости, ограничивает поступление энергетического субстрата (глюкоза) и кислорода в клетку, кратковременно замедляя реакции с участием коферментов. В результате снижается активность НАДН в дыхательной цепи митохондрий на уровне комплекса I. По сравнению с базовым уровнем содержание НАДН

повышается на 16 %. Одновременно на 10 % повышается содержание окисленной формы ФАД. Показатель соотношения ФАД/НАДН снижается на 6 %, видимо замедляются и реакции окислительного фосфорилирования, поскольку, как отмечает Карнаухов [6], если соотношение ФАД/НАДН увеличивается, то состояние митохондрии расценивается как активное. Это сопровождается высоким содержанием АДФ, высоким содержанием субстрата и интенсивным дыханием.

Таблица 1
Динамика гемодинамических показателей и уровня метаболизма в системе микроциркуляции при температурных пробах ($M \pm m$)

Показатель	1 этап базовый тест 25 °С	2 этап охлаждение до 10 °С	3 этап нагревание до 35 °С	4 этап нагревание до 40 °С
	8 мин	1 мин	4 мин	4 мин
ПМ, пф. ед.	6,90±2,30	5,53±2,41	9,44±3,08	20,06±5,11*
σ, пф. ед.	1,37±0,26	0,89±0,15	2,03±0,38	1,57±0,43
Кv, усл. ед.	20,10±2,80	15,81±1,72	20,58±2,15	8,51±0,96*
НАДН	0,76±0,06	0,87±0,09	0,65±0,05	0,58±0,04*
ФАД	0,40±0,03	0,44±0,03	0,34±0,02*	0,31±0,02*
ФАД/НАДН	0,53±0,08	0,50±0,08	0,54±0,10	0,55±0,09
Аэ, пф. ед.	14,95±1,40	–	16,79±1,61	11,12±1,02*
Ан, пф. ед.	16,74±1,51	12,41±1,05*	18,60±1,75	15,66±1,53
Ам, пф. ед.	14,06±1,38	10,24±0,92*	19,63±2,08*	20,81±2,00*
Ад, пф. ед.	11,53±1,09	11,71±1,14	14,39±1,22*	16,18±0,35*
Ас, пф. ед.	5,50±0,28	5,61±0,32	6,73±0,44*	7,49±0,49*

Примечание: * различия по отношению к показателю базового теста (25 °С) <0,05

Следовательно, в клетках снижается интенсивность окислительно-восстановительных процессов. При нагревании ткани до 35 °С увеличивается приток крови в микроциркуляторное русло с ростом величины ПМ на 37 %, при высокой сохранности активных механизмов модуляции кровотока о чем свидетельствует рост на 48 % показателя флакса. На усилении активных механизмов регуляции указывает и стремительное повышение на 30 % величины показателя Кv при температуре 35 °С по сравнению с показателем при локальном охлаждении. Величина Кv восстанавливается до базового значения (20,58±2,15 %). Повышение температуры вызывает перегруппировку осцилляций, направленных на вазодилатацию сосудов. В результате показатель эндотелий-зависимой вазодилатации повышается на 12 %, гладкомышечных клеток артериол (нейрогенные осцилляции) на 11 %, клеток прекапиллярных сфинктеров (миогенные осцилляции) на 40 %. Повышение температуры сопровождается достоверным ростом на 22 % вклада сердечных сокращений в приток крови в артериолярное звено и на 25 % дыхательных колебаний на отток крови из веноулярного отдела микроциркуляторного русла (p<0,05). При нагревании до 35 °С

активизируется утилизация субстрата с активизацией работы коферментов. Этому способствует усиление нутритивного кровотока, с одновременным повышением диффузии кислорода из крови в ткани [16]. Активизируется реакция окисления НАДН, в результате его содержание снижается на 17 %, при этом восстанавливается окисленная форма кофермента ФАД с понижением концентрации на 18 %. На синхронную цикличность изменений активности коферментов в восстановленной и окисленной формах указывает ряд авторов [17]. Проведение тепловой пробы с повышением локальной температуры до 40°C выводит показатель ПМ на максимальную величину ($20,06 \pm 5,11$ пф. ед.). Формируется гиперемический тип микроциркуляции и изменяется приоритетность в работе регуляторных механизмов. В частности, снижается показатель эндотелий-зависимой вазодилатации в основе которого может лежать ослабление синтеза оксида азота при усилении продукции вазоконстрикторов, например эндотелина-1. Незначительно повышается тонус артериол, направленный на ограничение притока крови в систему микроциркуляции. Для улучшения оттока крови и устранения застойных явлений усиливается пропускная способность прекапиллярных артериол и метартериол с увеличением A_m на 48 % ($p < 0,05$). Одновременно на 40 % ($p < 0,05$) повышается амплитуда дыхательного ритма, что свидетельствует о повышении их значимости в оттоке крови из веноулярного звена. В работе [8] установлены положительные корреляционные связи между дыхательной модуляцией и величиной кровотока, причем теснота этой связи усиливается по мере развития гиперемии. С повышением температуры до 40 °С по сравнению с базовой температурой продолжает синхронно снижаться на 31 % уровень восстановленного кофермента НАДН и на 29 % окисленного ФАД. Энергетическая активность клеток по соотношению ФАД/НАДН тенденциозно повышается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При проведении холодной пробы с понижением температуры до 10 °С снижается интенсивность микроциркуляции и уровень колеблемости эритроцитов. Изменяется баланс сосудистых механизмов регуляции с усилением тонуса нейрогенного и миогенного ритмов. Активность внесосудистых механизмов практически не изменяется. Снижается активность коферментов окислительного метаболизма.
2. Ступенчато нарастающее воздействие температуры приводит к формированию гиперемического типа микроциркуляции, который обеспечивается синхронной работой активных и пассивных механизмов регуляции микрокровотока. Отмечается максимально высокая активность восстановленной формы кофермента НАДН и окисленной ФАД.
3. Выявленные функциональные изменения микроциркуляторного русла и клеточного метаболизма при разных температурных режимах могут быть использованы при проведении тренировочных и соревновательных физических нагрузок у спортсменов в разных климато-географических условиях окружающей среды.

Список литературы

1. Очерки спортивной фармакологии. Том 4. Векторы энергообеспечения / под редакцией Н. Н. Каркищенко и В. В. Уйба. – М., СПб.: «Айсинг», 2014. – 296 с.
2. Pries A. R. Physiological basis of the microcirculation: vascular adaptation / A. R. Pries // *Klin. Monbl. Augenheikd.* – 2015. – Vol. 232, № 2. – P. 127.
3. Филина М. А. Функциональные изменения микроциркуляции крови в коже стопы при тепловых пробах у пациентов с сахарным диабетом / М. А. Филина, В. Е. Потапова, И. Н. Маковик и др. // *Физиология человека.* – 2017. – Т.4, №6. – С. 95–102.
4. Крупаткин А. И. Пульсовые и дыхательные осцилляции кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека / А. И. Крупаткин // *Физиология человека.* – 2008. – Т.34, №3. – С. 70–76.
5. Самойлов В. О. Флуоресценция компонентов дыхательной цепи митохондрий в медицинской диагностике / В. О. Самойлов // *Биофизика.* – 2013. – Т.58, вып.5. – С. 813–818.
6. Карнаухов В. Н. Люминесцентный анализ клеток / В. Н. Карнаухов – Пушкино, 2002. – 131 с.
7. Bilan D. Genetically encoded fluorescent indicator for NAD⁺/NADH ratio imaging in different cellular compartments. / D. Bilan, M. Matlashov, A. Gorokhovatsky, et. al. // «Mechanisms in Biology», The 38th FEBS Congress, 2013, St. Petersburg, Russia.
8. Green D. R. Mitochondria and apoptosis / D. R. Green, J. C. Reed // *Science.* – 1998. – Vol. 281. – P. 1309–1312.
9. Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling / Ziegler M. // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267. – P. 1550–1564.
10. Stefanovska A. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique / A. Stefanovska, M. Bracic, H. D. Kvernmo // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* – 1999. – Vol. 46, № 10. – P. 1230.
11. Tankanag A. V. A method of adaptive wavelet filtering of the peripheral blood flow oscillations under stationary and non-stationary conditions / A. V. Tankanag, N. K. Chemeris // *Phys. Med. Biol.* – 2009. – Vol. 54, № 19. – P. 5935.
12. Крупаткин А. И. Колебания кровотока частотой около 0.1 Гц в микрососудах кожи не отражают симпатическую регуляцию их тонуса / Крупаткин А. И. // *Физиология человека.* – 2009. – Т. 35, № 2. – С. 60.
13. Mück-Weymann M. E. Respiratory-dependent laser-Doppler flow motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin / Mück-Weymann M. E., Albrecht H. P., Hage D. et al. // *Microvasc. Res.* – 1996. – Vol. 52, № 1. – P. 69.
14. Söderström T. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans / Söderström T., Stefanovska A., Veber M., Svensson H. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, № 5. – P. 1638.
15. Козлов В. И. Развитие системы микроциркуляции / В. И. Козлов – М.: РУДН, 2012. – 314 с.
16. Литвин Ф. Б. Влияние апипродукта "Билар" на транспорт кислорода в системе микроциркуляции у юных лыжников-гонщиков / Ф. Б. Литвин, С. С. Голощапова, О. С. Журавков // *Тромбоз, гемостаз и реология.* – 2016. – №3, Приложение 1. – С. 252–253.
17. Трибрат Н. С. Динамика показателей окислительного метаболизма при воздействии низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона / Н. С. Трибрат, Э. Р. Джелдубаева, Е. Н. Чуян, А. Г. Трибрат // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия.* – 2019. – Т.5, №3. – С. 122–130.

FUNCTIONAL CHANGES IN THE BLOOD MICRO-CIRCULATION AND INTERSTITIAL METABOLISM AMONG THE BMX CYCLISTS' FUNCTIONAL ANALYSIS

Litvin F. B.

*Smolensk State Academy of Physical Culture, Sports and Tourism, Smolensk, Russia
E-mail: bf-litvin@yandex.ru*

Research of hemodynamic and metabolic parameters has occurred through the use of LDF-method and fluorescent spectroscopy of "LAZMA MC" complex (SPE "LAZMA" Ltd, Moscow). Heat and cold tests have been conducting with the "LAZMA-TEST" apparatus (SPE "LAZMA" Ltd, Moscow). Each research has involved 4 stages: baseline test for 8 minutes, cooling to a 10 degrees in 1 minute and the local thermal tests at 35 and 40 degrees for 4 minutes each. Thus, the overall duration of the measurement is 17 minutes. Spectral power flow of cofactors (reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and oxidized flavin adenine dinucleotide (FAD)) were evaluated by the fluorescent spectroscopy method. Static analysis of the data received was conducted. Non-parametric Wilcoxon signed-rank test was used for that variable. Differences were considered as credible at value $p < 0,05$. Based on cold test at 10 degrees there's a 25 % decreased perfusion and 54 % decreased performance of flax. Active work of vasomotor system of modulation of blood flow is being commandeered. Amplitude of neurogenic oscillation is reduced by 35 %, and amplitude of myogenic oscillation is reduced by 37 % ($p < 0,05$). Reactions of oxidation metabolism are slowing down. A reduced NAD content has increased by 16 % comparing to baseline performance, and oxidized FAD – by 10 %. Increasing the temperature to 35 degrees and then to 40 degrees causes the blood flow to micro-circulation to a shift to hyperaemic type of micro-circulation. Vasodilation effect is formed by reducing the tone of endotheliocytus, arterioles, metarterioles and precapillary sphincters. Increase of reaction's activity of NAD oxidation and of the FAD reduction are accompanied with statistically robust increase of their concentration compare to baseline performance. In general terms the results of the heat and cold tests revealed a different levels of functional reserve of micro-circulation, of status of adaption mechanisms as well as the changes in concentration of coenzymes.

Keywords: micro-circulation, sportsmen, laser Doppler flowmetry, heating test, coenzymes.

References

1. Essays of the sports pharmacology. Volume 4. Extrapolation vectors, edited by Karkischenko N. N. and Uiba V. V., 296 p. (SPb.: «Icing», 2014).
2. Pries A. R. Physiological basis of the microcirculation: vascular adaptation, *Klin. Monbl. Augenheikd.*, **232**, 2, 127 (2015).
3. Filina M. A. Potapova E. V., Makovik I. N., Zharkih E. V., Dremine V. V., Zherebtsov E. A., Dunaev A. V., Sidorov V. V., Krupatkin A. I., Alimicheva E. A., Masalygina G. I., Muradyan V. F., Functional Changes of Blood Microcirculation in the Skin of the Foot during Heating Tests in Patienys with Diabetes, *Human Physiology*, **4**, 6, 95 (2017).

4. Krupatkin A. I. Cardiac and respiratory oscillations of the blood flow in microvessels of the human skin, *Human Physiology*, **34**, **3**, 323 (2008)
5. Samoilov V. O. Fluorescence of mitochondrial respiration chain components in medical diagnostics, *Biophysics*, **58**, **5**, 640 (2013).
6. Karnaukhov V. N. *Luminescent cell analysis*, 131 p. (Puschino, 2002).
7. Bilan D., Matlashov M., Gorokhovatsky A., et.al. *Genetically encoded fluorescent indicator for NAD⁺/NADH ratio imaging in different cellular compartments*, «Mechanisms in Biology», The 38th FEBS Congress, (St. Petersburg, Russia. 2013).
8. Green D. R., Reed J. C. Mitochondria and apoptosis, *Science*, **281**, 1309. (1998)
9. Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1550 (2000).
10. Stefanovska A., Bracic M., Kvernmo H. D. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **46**, **10**, 1230 (1999).
11. Tankanag A. V., Chemeris N. K. A method of adaptive wavelet filtering of the peripheral blood flow oscillations under stationary and non-stationary conditions, *Phys. Med. Biol.*, **54**, **19**, 5935 (2009).
12. Krupatkin A. I. Blood flow oscillations at a frequency of about 0.1 Hz in skin microvessels do not reflect the sympathetic regulation of their tone, *Human Physiology*, **35**, **2**, 183 (2009).
13. Mück-Weymann M. E., Albrecht H. P., Hage D. et al. Respiratory-dependent laser-Doppler flux motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin, *Microvasc. Res.*, **52**, **1**, 69 (1996).
14. Söderström T., Stefanovska A., Veber M., Svensson H. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans, *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.*, **284**, **5**, 1638 (2003).
15. Kozlov V. I. *The development of the microcirculation system*, 314 p. (RUDN, 2012).
16. Litvin F. B., Goloshapova S. S., Zhuravkov O. S. Effect of apiprodukt "Bilar" on oxygen transport in microcirculation at young cross-country skiers, *Thrombosis, hemostasis and rheology*, **3**, **1**, 252 (2016).
17. Tribrat N. S., Dzheldubayeva E. I., Chuyan E. N., Tribrat A. G. Trends in the indicators for oxidizing metabolism against the low intensity electromagnetic radiation of the millimeter range, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **5**, **3**, 122 (2019).