

КОАГУЛОЛОГИЯ

© БАЗАРИН К.П., САВЧЕНКО А.А., 2017

УДК 612.112:796.071

Базарин К.П.^{1,2}, Савченко А.А.^{2,3}

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ В ДИНАМИКЕ ГОДОВОГО МАКРОЦИКЛА

¹КГАУ ДПО «Красноярский краевой институт повышения квалификации работников физической культуры и спорта», Красноярск;

²ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск;

³ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

Физическая нагрузка провоцирует достоверные изменения в системе свертывания крови, в частности повышение свертываемости крови, в том числе увеличение риска тромбообразования. Однако, долговременные изменения в системе свертывания крови у спортсменов остаются практически не изученными. Нами показано, что параметры агрегационной способности тромбоцитов у спортсменов имеют существенные долговременные изменения в ходе годового тренировочно-соревновательного макроцикла. Максимальным изменениям подвержены величина лаг-фазы и площадь под кривой агрегации тромбоцитов. Лаг-фаза на кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном существенно повышена в окончании соревновательного периода; снижается до контрольных значений за время отдыха в переходном периоде и падает значительно ниже показателей контрольной группы в ходе подготовительного периода. Площадь под кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном достоверно снижена относительно контрольных значений в окончании соревновательного периода, превышает контрольный уровень в переходном периоде и не имеет достоверных отличий от контроля в подготовительном периоде. Изменения функциональной активности тромбоцитов оказывают значимое влияние на работу иммунной системы, что модулирует течение процессов адаптации к спортивной деятельности в целом.

Ключевые слова: тромбоциты; агрегация; физическая нагрузка; спорт

Для цитирования: Базарин К.П., Савченко А.А. Изменения показателей коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов у квалифицированных спортсменов в динамике годового макроцикла. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (11): 686-689. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-11-686-689>

Bazarin K.P.^{1,2}, Savchenko A.A.^{2,3}

THE ALTERATIONS OF INDICES OF COLLAGEN-INDUCED AGGREGATION OF THROMBOCYTES IN QUALIFIED SPORTSMEN IN THE DYNAMICS OF ANNUAL MACRO-CYCLE

¹The kraii state autonomous institution of advanced professional education "The Krasnoyarsk kraii institute of advanced training of workers of physical culture and sport", Krasnoyarsk, Russia

²The Federal state budget scientific institution "The research institute of medical problems N.A. Semashko national research institute of public health", 105064 Moscow, Russia

³The Federal state autonomous educational institution of higher education "The Siberian federal university", Krasnoyarsk, Russia

The physical load provokes reliable alterations in the blood coagulation system, specifically increasing of blood coagulability, including increasing of thrombus formation. However, the long-term alterations in the blood coagulation system in sportsmen are still unexplored. The article demonstrates that in sportsmen parameters of aggregation capacity of thrombocytes have significant long-term alterations during annual training competition macro-cycle. The maximal alterations have to do with value of lag-phase and area under the curve of aggregation of thrombocytes. The lag-phase on the curve of aggregation of thrombocytes under stimulation with collagen is significantly increased in termination of competition period; it decreases up to control values during resting time in transition period and significantly falls down below control group indices during preparatory period. The area under the curve of aggregation of thrombocytes under stimulation with collagen is reliably decreased as to control values at the termination of competition period. It exceeds the control level during transition period and it has no reliable differences against control values during preparatory period. The alterations of functional activities of thrombocytes significantly effect functioning of immune system that modulates course of processes of adaptation to sport activities in general.

Key words: thrombocytes; aggregation; physical load; sport.

For citation: Bazarin K.P., Savchenko A.A. The alterations of indices of collagen-induced aggregation of thrombocytes in qualified sportsmen in the dynamics of annual macro-cycle *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (11): 686-689. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-11-686-689>

Для корреспонденции: Базарин Кирилл Петрович, руководитель Центра инновационных технологий в спорте КГАУ ДПО «Красноярский краевой институт повышения квалификации работников физической культуры и спорта»; e-mail: kpbazarin@gmail.com

For correspondence: *Bazarin K.P.*, the head of the center of innovative technologies in sport of the kraii state autonomous institution of advanced professional education "The Krasnoyarsk kraii institute of advanced training of workers of physical culture and sport". e-mail: kpbazarin@gmail.com

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support*

Received 20.06.2017
Accepted 03.07.2017

Введение. Долговременные изменения в системе свертывания крови у спортсменов остаются практически не изученными. Большинство исследователей концентрируются на изучении срочных эффектов. Нами не было найдено работ, охватывающих временной диапазон более 24 ч после окончания физической нагрузки. В ряде исследований показана достоверная реакция системы свертывания крови на физическую нагрузку, как повышение свертываемости крови, в том числе увеличение риска тромбообразования [1, 2]. Показана активация агрегации тромбоцитов непосредственно после физической нагрузки, пропорционально ее длительности, мало зависящая от конкретного вида спорта [2, 3]. С ростом нагрузки возникает снижение индуцированной агрегации тромбоцитов, пропорционально величине нагрузки. В частности отмечается снижение агрегации при стимуляции коллагеном на 60% [3]. Имеются данные о взаимосвязи повышенного выброса катехоламинов при высокой физической нагрузке и снижению активации тромбоцитов у спортсменов. Таким образом, по данным многих авторов, агрегационная способность тромбоцитов достоверно изменяется под влиянием физических нагрузок. Однако долговременные динамические изменения указанных процессов остаются неисследованными.

Тромбоцитарно-нейтрофильные взаимодействия являются предметом активных научных исследований в настоящее время. В том числе, как показано в ряде работ, физическая нагрузка стимулирует образование лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов [4] и, в частности, тромбоцитарно-нейтрофильных комплексов, ведущих к активации последних [5]. Взаимодействие нейтрофилов с активированными тромбоцитами является необходимой фазой развития как воспалительного процесса, так и непосредственно «дыхательного взрыва» [6].

Таким образом, целью исследования явилось изучение изменений агрегационной способности тромбоцитов у квалифицированных спортсменов в различных периодах годового тренировочно-соревновательного макроцикла и выявление корреляционных взаимосвязей с изменениями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 155 спортсменов, представителей различных видов спорта: 96 мужчин, средний возраст $24,34 \pm 3,54$ лет; 59 женщин, средний возраст составил $23,12 \pm 2,3$ лет. Виды спорта: спортивное ориентирование бегом, легкая атлетика (бег на средние и длинные дистанции), лыжные гонки, биатлон, регби, футбол. Квалификация: мастеров спорта международного класса 15; мастеров спорта 53, кандидатов в мастера спорта 77, имеющих 1-й разряд — 10. Контрольная группа состояла из 101 человека, не испытывающих систематических высоких физических нагрузок: 53 мужчины, средний возраст $23,17 \pm 2,54$ года, 48 женщин, средний возраст $22,12 \pm 3,01$ года.

Образцы венозной крови забирали из локтевой вены

обследуемых натощак, в состоянии покоя, как минимум через 12 ч после окончания физической нагрузки. Пробы были взяты в течение 3 дней после окончания соревновательного периода. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом, обследуемые давали добровольное информированное согласие на участие в эксперименте.

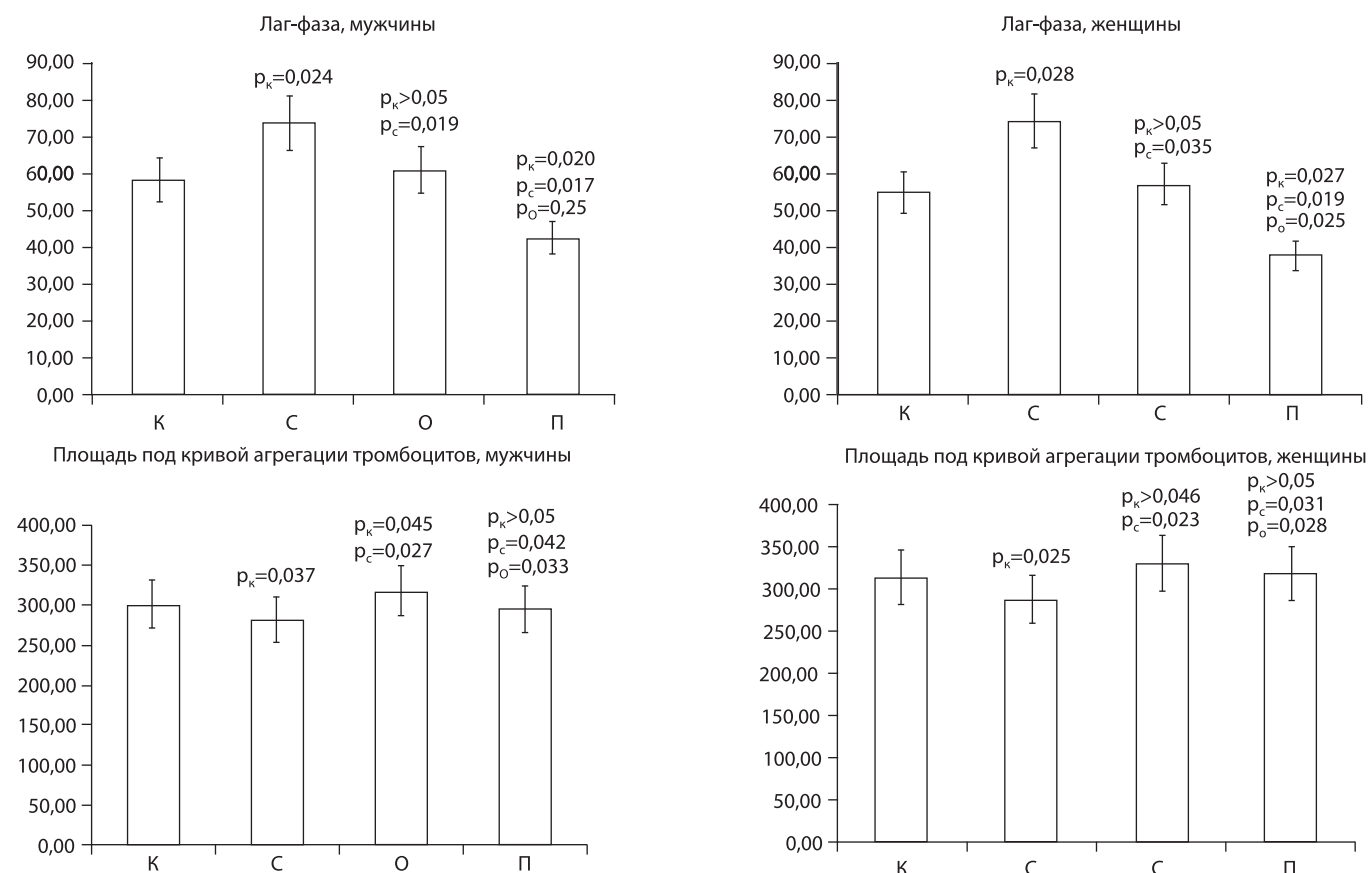
Исследования агрегации тромбоцитов выполняли на люмиагрегометре CHRONOLOG 700 с использованием реактивов Хронопар (США), в качестве активатора в кювету агрегометра вносили коллаген 2 мкг/мл. Оценивали лаг-фазу, амплитуду, угол наклона и площадь под кривой агрегации.

Выделение нейтрофильных гранулоцитов производили центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/см³ для отделения лимфоцитов, $\rho = 1,119$ г/см³ для выделения нейтрофильных гранулоцитов). Полученную суспензию нейтрофильных гранулоцитов дважды отмывали в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 400 g. Супернатант сливали, оставшиеся нейтрофильные гранулоциты разводили в 1 мл раствора Хенкса и получали взвесь. Подсчитывали количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева. При контроле морфологического состава взвесей выделенных клеток определяли чистоту выхода нейтрофильных гранулоцитов, которая составляла не менее 97%.

Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 40 мкл донорской сыворотки АВ (IV), 100 мкл люминола в концентрации 10^5 М, 50 мкл индуктора (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 610 мкл раствора Хенкса без красителя и 250 мкл лейкоцитарной взвеси (2 млн/мл) для определения спонтанной хемилюминесценции или 685 мкл раствора Хенкса и 125 мкл взвеси лейкоцитов — для индуцированной.

Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции производили в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604» (СКТБ «Наука», Красноярск). Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществлялась через компьютер. Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение (I_{max}) и площадь кривой (S).

В качестве индукторов дыхательного «взрыва» использовали опсонизированный зимозан («Sigma», США). Суспензию опсонизированного зимозана готовили следующим образом. Навеску зимозана тщательно перемешивали с донорской сывороткой АВ (IV) Rh(-) в концентрации 2 мг зимозана на 1 мл сыворотки. Инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации смесь центрифугировали 10 мин при 800 g, супернатант удаляли, а осевший зимозан ресуспендировали в 10 мл физиологического раствора и трижды отмывали по 10 мин при 800 g. Полученный опсонизированный зимозан разводили в растворе Хенкса без фенолового красного до



Величина лаг-фазы и площадь под кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном у мужчин и женщин спортсменов на разных этапах годового тренировочно-соревновательного макроцикла и лиц контрольной группы. К — контрольная группа, С — спортсмены в окончании соревновательного периода, О — спортсмены в окончании переходного периода, П — спортсмены в окончании подготовительного периода.

концентрации 2 мг/мл. Усиление хемилуминесценции, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной оценивали соотношением $S_{\text{зим}}/S_{\text{спон}}$, которое определяли как индекс активации (ИА) [7].

Результаты и обсуждение. Нами были исследованы динамические изменения параметров агрегационной способности тромбоцитов в ответ на активацию коллагеном у квалифицированных спортсменов в динамике годового тренировочно-соревновательного макроцикла.

Величина амплитуды кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном незначительно снижена относительно контрольных значений у спортсменов в окончании соревновательного периода. В окончании переходного и подготовительного периодов данный показатель соответствует контрольным величинам и не имеет достоверных отличий как от них, так и между собой. Отличия по величине амплитуды кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном между мужчинами и женщинами спортсменами в соответствующих периодах недостоверны ($p > 0,05$).

Величина угла кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном у спортсменов в окончании соревновательного периода не имеет достоверных отличий от показателей контрольной группы. В переходном и подготовительном периодах величина угла достоверно выше контроля и показателей соревновательного периода. Подготовительный период характеризуется значительным ростом угла кривой агрегации. Отличия между

мужчинами и женщинами спортсменами в окончании соответствующих периодов годового макроцикла недостоверны ($p > 0,05$).

Величина лаг-фазы на кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном существенно повышена в окончании соревновательного периода; снижается до контрольных значений за время отдыха в переходном периоде и падает значительно ниже показателей контрольной группы в ходе подготовительного периода. Во всех трех фазах годового макроцикла данный показатель у спортсменов имеет достоверные отличия друг от друга (см. рисунок). Имеются отличия по величине лаг-фазы при стимуляции коллагеном между мужчинами и женщинами спортсменами в соответствующих периодах.

Площадь под кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном у спортсменов в различных фазах годового тренировочно-соревновательного макроцикла имеет следующие особенности (см. рисунок): достоверно снижена относительно контрольных значений в окончании соревновательного периода, достоверно превышает контрольный уровень в переходном периоде и не имеет достоверных отличий от контроля в подготовительном периоде. Отличия по величине площади под кривой агрегации тромбоцитов при стимуляции коллагеном между мужчинами и женщинами спортсменами в соответствующих периодах недостоверны ($p > 0,05$).

Значительное увеличение лаг-фазы в окончании соревновательного периода можно связать со снижением

Корреляционные взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови и показателями агрегационной способности тромбоцитов у мужчин и женщин спортсменов в динамике годового макроцикла

Показатель		Мужчины		Женщины	
		Амплитуда коллаген	Лag-фаза коллаген	Амплитуда коллаген	Лag-фаза коллаген
T _{max} спонтанная	r	0,80	-0,75	0,81	-0,77
	p	0,011	0,015	0,011	0,016
T _{max} индуцированная	r	-0,62	0,77	-0,67	0,75
	p	0,027	0,015	0,031	0,019
I _{max} спонтанная	r	0,79	-0,78	0,80	-0,79
	p	0,011	0,013	0,011	0,012
I _{max} индуцированная	r	0,70	-0,80	0,74	-0,79
	p	0,020	0,011	0,021	0,017
S спонтанная	r	-0,78	0,79	-0,77	0,82
	p	0,012	0,011	0,14	0,11
S индуцированная	r	0,79	-0,77	0,78	-0,79
	p	0,012	0,017	0,012	0,013

чувствительности рецепторов тромбоцитов в силу их избыточной стимуляции коллагеном, выделение которого в кровотоке при физической нагрузке значительно повышается [8—10]. Полученные данные хорошо согласуются с результатами, приведенными в исследовании [11], в частности свидетельствующими о том, что параметры агрегации тромбоцитов у спортсменов в период отдыха (переходный) и лиц, не испытывающих систематических физических нагрузок, не имеют достоверных отличий. Однако, у спортсменов на фоне физической нагрузки возникает достоверное снижение агрегации при активации коллагеном.

Нами исследованы корреляционные взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови и показателями агрегационной способности тромбоцитов у спортсменов в динамике годового макроцикла. Результаты приведены в таблице.

Из представленных данных видно, что изменения функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови у спортсменов в течение годового макроцикла имеют взаимосвязь с изменениями показателей агрегационной способности тромбоцитов, что свидетельствует об общности физиологических механизмов реакции на факторы спортивной деятельности, а также подтверждает тезис о непосредственном участии тромбоцитов в активации нейтрофильных гранулоцитов при физической нагрузке.

Заключение. Нами показано, что параметры агрегационной способности тромбоцитов у спортсменов имеют существенные долговременные изменения в ходе годового тренировочно-соревновательного макроцикла. Важно отметить активно исследуемое в настоящее время взаимодействие между тромбоцитами и клетками иммунной системы. Так отмечается, что физическая нагрузка стимулирует образование лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов [4] и, в частности, тромбоцитарно-нейтрофильных комплексов, ведущих к активации последних [5]. Высказывается мнение, что

тромбоциты являются провоспалительными клетками и принимают участие в иммунных реакциях, модулируя функции лимфоцитов, моноцитов, антигенпрезентирующих клеток [12, 13]. Взаимодействие нейтрофилов с активированными тромбоцитами является необходимой фазой развития как воспалительного процесса, так и непосредственно «дыхательного взрыва» [6]. Таким образом, изменения функциональной активности тромбоцитов оказывают значимое влияние на работу иммунной системы, что модулирует течение процессов адаптации к спортивной деятельности в целом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—6, 8—13
см. REFERENCES)

7. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 159(5): 656—60.

REFERENCES

- Chen Y.W., Apostolakis S., Lip G.Y. Exercise-induced changes in inflammatory processes: Implications for thrombogenesis in cardiovascular disease. *Ann. Med.* 2014; 46(7): 439—55.
- Posthuma J.J., van der Meijden, Ten Cate H., Spronk H.M. Short- and Long-term exercise induced alterations in haemostasis: a review of the literature. *Blood Rev.* 2015; 29(3): 171—8.
- Karlic H., Lohninger A. Supplementation of L-carnitine in athletes: does it make sense? *Nutrition.* 2004; 20(7—8): 709—15.
- Heber S., Volf I. Effects of Physical (In)activity on Platelet Function. *BioMed Research International.* 2015; Article ID 165078.
- Sreeramkumar V., Jose M., Adrover L., Ballesteros I. et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science.* 2014; 346(6214): 1234—8.
- Jin R., Yu S., Song Z., Zhu X., Wang C. Soluble CD40 Ligand Stimulates CD40-Dependent Activation of the b2 Integrin Mac-1 and Protein Kinase C Zeta (PKC ζ) in Neutrophils: Implications for Neutrophil-Platelet Interactions and Neutrophil Oxidative Burst. *PLoS ONE;* 2013; 8(6).
- Savchenko A.A. Determination of the activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases in neutrophil granulocytes by a bioluminescence method. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny.* 2015; 159(5): 656—60. (in Russian)
- Lombardi G., Lanteri P., Colombini A., Lippi G., Banfi G. Stability of haematological parameters and its relevance on the athlete's biological passport model. *J. Sports Med.* 2011; 41(12): 1033—42.
- Benedini S., Longo S., Caumo A., Luzi L., Invernizzi P.L. Metabolic and hormonal responses to a single session of kumite (free non-contact fight) and kata (highly ritualized fight) in karate athletes. *Sport Sci. Health.* 2012; (8): 81—5.
- Janikowska G., Kochanska-Dziurawicz A., Zebrowska A., Bijak A., Kimsa M.J. Adrenergic response to maximum exercise of trained road cyclists. *Hum. Kinet.* 2014; 9(40): 103—11.
- Lippi G., Montagnana M., Salvagno G.L., Franchini M., Guidi G.C. Comparison of platelet function between sedentary individuals and competitive athletes at rest. *Thrombosis Journal.* 2006; (4): 10.
- Middleton E.A., Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases. *J. Physiol Rev.* 2016; 96(4): 1211—59.
- Shih L., Kaplan D., Kraiss L.W., Casper T.C., Pendleton R.C., Peters C.L. et al. Platelet-Monocyte Aggregates and C-Reactive Protein are Associated with VTE in Older Surgical Patients. *Sci. Rep.* 2016;(7).

Поступила 20.06.17

Принята к печати 03.07.17