

СПОРТИВНА МЕДИЦИНА

© И. Ю. Магда, В. А. Темченко, С. Н. Колий., Ю. Г. Шкорбатов

УДК 57. 022:576. 3(08)

И. Ю. Магда, В. А. Темченко, С. Н. Колий., Ю. Г. Шкорбатов

КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА ФИЗИЧЕСКИЕ НАГРУЗКИ ВО ВРЕМЯ ВЫПОЛНЕНИЯ СПОРТИВНЫХ ТРЕНИРОВОК

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина

(г. Харьков)

Данная работа является фрагментом НИР «Дослідження особливостей адаптивної відповіді на електромагнітні поля та інші стресові навантаження на рівні клітини», № государственной регистрации 0112U008335.

Вступление. Состояние утомления имеет различные проявления и может быть определено разными методами. Современные методы, используемые в физиологии, используют большое количество параметров для анализа (частота дыхания, пульс и т. д.) [4,5]. Зачастую, подобные методы не подходят для анализа состояния отдельного человека и годятся для групповых исследований. В связи с этим важно определение одного обобщающего параметра, который позволил бы оценить состояние организма после воздействия различных факторов. В данной работе мы исследовали возможность применения цитологического показателя – состояния хроматина клеточного ядра при утомлении, вызванном физической нагрузкой. Исследовали влияние дозированной физической нагрузки – спортивной тренировки (волейбол), на показатель конденсированности хроматина в ядрах клеток буккального эпителия. Данная методика уже использовалась нами ранее. Влияние физической нагрузки в тренировочных походах на показатель состояния гетерохроматина в ядре клетки буккального эпителия было рассмотрено в работе [8], влияние на этот показатель дозированной физической нагрузки на велоэргометре рассматривали в работе [1].

Одна из целей физиологически обоснованного нормирования нагрузок во время физических упражнений заключается в том, что затраты энергии, число повторений упражнений и продолжительность выполнения серий упражнений были оптимальными. Если затраты энергии и число повторений упражнений малы, то эффект от упражнений будет понижен вследствие недостаточной мобилизации физиологических функций. Если же затраты энергии и число повторений и продолжительность упражнений чрезмерно велики, то

возможно возникновение патологических состояний [1].

Цель исследования – проанализировать изменение содержания гранул гетерохроматина в ядрах клеток буккального эпителия, для анализа чувствительности данного показателя к влиянию физических нагрузок на организм.

Объект и методы исследования. В качестве объекта исследований использовали клетки буккального эпителия человека. Использование этого объекта в данной работе обусловлено рядом причин. Клетки буккального эпителия удобны для цитологических исследований, они велики и обладают крупным ядром (порядка 10 мкм в диаметре). При окрашивании ядра клетки орсеином в нем можно четко определить количество гранул гетерохроматина, что позволило ввести новый показатель – СГГ (содержание гранул гетерохроматина). Этот показатель характеризует морфологический параметр клеточного ядра, связанный с его функциональным состоянием. Таким образом, клетки буккального эпителия являются исключительно удобным объектом для цитологических исследований, на них возможно параллельное исследование морфологических и биофизических параметров клеток, что позволяет получить новую уникальную информацию о реакциях клеток на факторы внешней среды и внутренние факторы организма. Кроме того, взятие клеток буккального эпителия совершенно бескровно и безболезненно, не связано с риском заражения, не требует сложной аппаратуры и может производиться в полевых условиях.

Клетки буккального эпителия соскребали с поверхности щеки доноров-добровольцев. Донорами служили студенты Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина (ХНУ), проинформированные о ходе и задачах эксперимента. Для оценки влияния физических нагрузок на функциональное состояние человека сравнивались результаты, полученные до, во время и после тренировки.

Под наблюдением находились две группы по 7 студентов ХНУ им. В. Н. Каразина – спортсменов

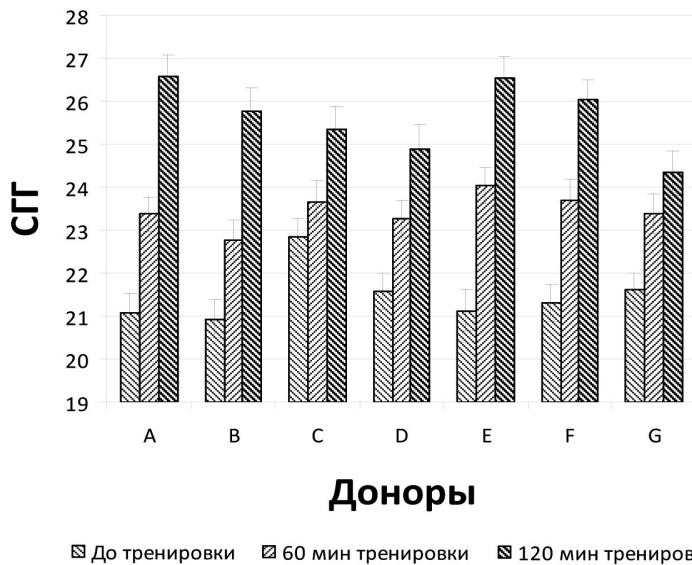


Рис 1. Изменение показателя СГГ в процессе тренировки 1 – до тренировки, 2 – через час тренировки, 3 – два часа после тренировки.

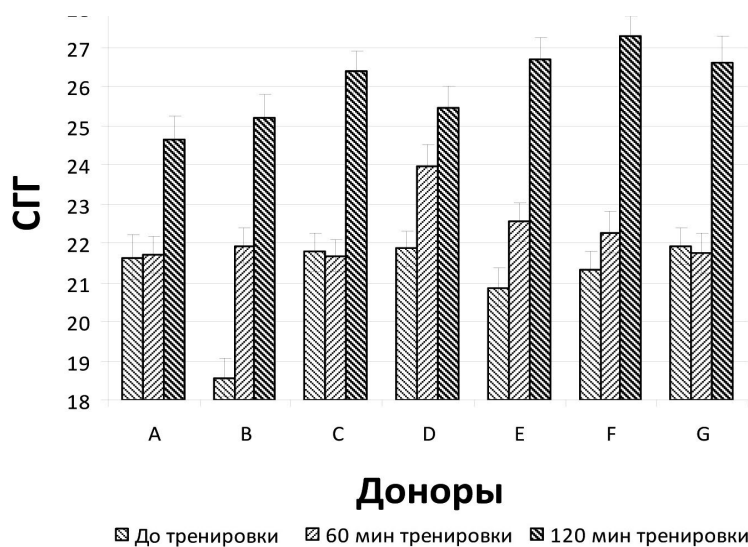


Рис 2. Изменение показателя СГГ в процессе тренировки 1 – до тренировки, 2 – через час тренировки, 3 – два часа после тренировки.

(кандидатов в мастера спорта) и нетренированных студентов в возрасте 21 ± 1.5 года, которые в течение 120 минут проводили тренировочную игру в волейбол.

Метод определения конденсации хроматина. Изменение степени конденсации хроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия по изменению содержания гранул гетерохроматина (СГГ). Клетки окрашивали в 2% растворе орсеина в 45% уксусной кислоте, в течение 30 мин, затем рассматривали при увеличении $\times 600$. Определяли среднее количество гранул гетерохроматина на

одно ядро, потом подсчитывали среднюю величину СГГ для 30 ядер и величину статистической ошибки. Повышение показателя СГГ свидетельствует о возрастании степени конденсации хроматина.

Статистический анализ проводился с помощью критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение.

Изменение состояния хроматина под влиянием спортивных тренировок. На рисунках 1 и 2 представлены средние данные СГГ для 30 яре и величина стандартной ошибки.

На **рисунке 1** представлены данные об изменении состояния хроматина в процессе тренировочной игры нетренированных студентов. Из представленных данных видно, что показатель СГГ повысился у всех испытуемых, при этом у 6 из 7 были отмечены достоверные изменения показателя. Согласно ранее полученным данным, повышение СГГ наблюдается в условиях физической нагрузки и после неё [9,8] что может свидетельствовать о развитии стрессовой реакции организма. Таким образом, мы можем интерпретировать наблюдаемое нами повышение СГГ как свидетельство стрессового ответа организма. Из данных рисунка 1 видно рост СГГ через час, а через два он ещё более выражен, что, вероятно, говорит о дальнейшем развитии утомления.

На **рисунке 2** представлены данные об изменении состояния хроматина в процессе тренировки спортсменов. Было показано, что при одной и той же времени нагрузки повышение СГГ в группе спортсменов менее выражено,

чем в группе не тренированных студентов, то есть, ответная реакция организма у спортсменов иная, чем у нетренированных игроков. Как правило, явление конденсации хроматина связано со снижением активности биосинтетических процессов в ядре [7]. Подобная реакция является неспецифическим ответом клетки на действие повреждающих факторов. В данном случае конденсация хроматина может быть связана с действием на клетки стрессовых гормонов, которые вырабатываются в ответ на интенсивную физическую нагрузку, поскольку установлено,

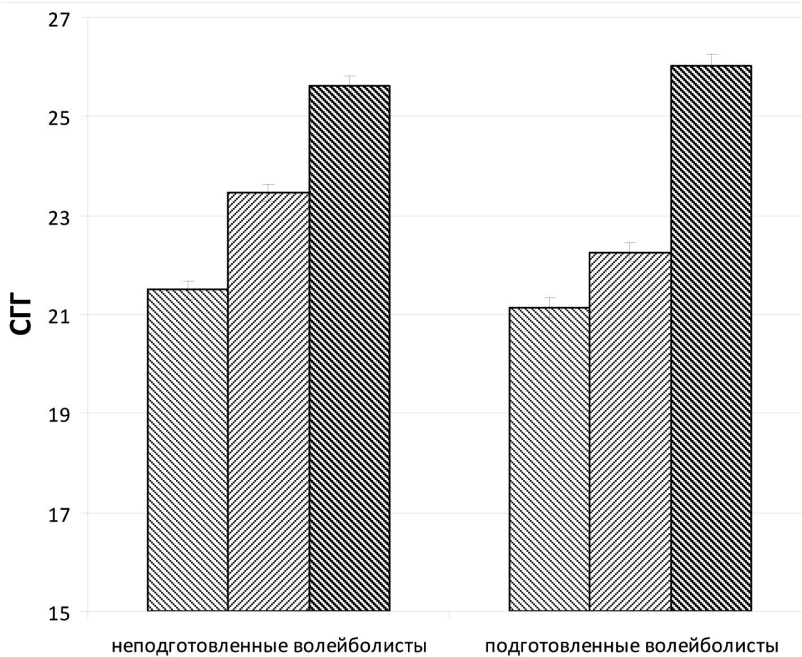


Рис 3. Средний показатель СГГ для двух испытуемых групп.

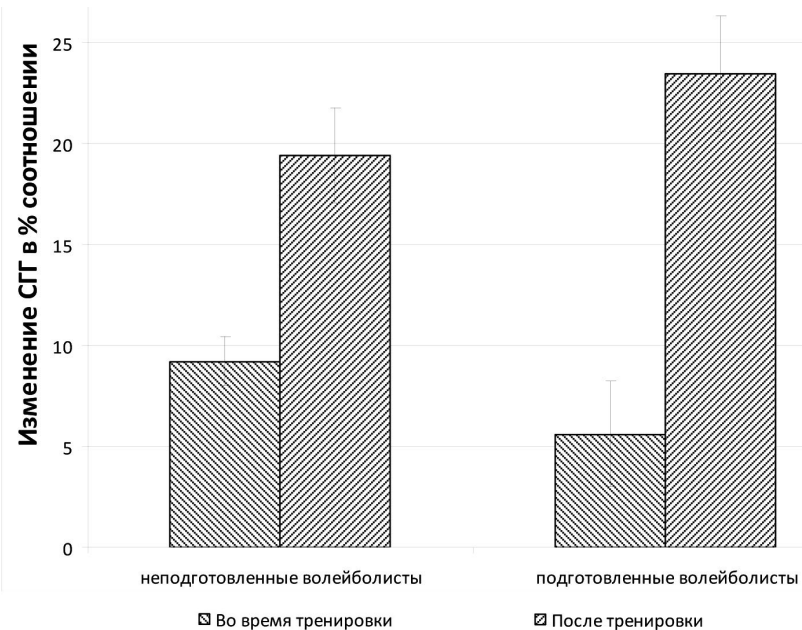


Рис. 4. Изменение показателя СГГ в процентном соотношении во время и после тренировки.

что стрессовые гормоны вызывают повышение СГГ в концентрациях, близких к физиологическим [2].

На рисунках 3 и 4 представлены обобщенные данные для групп испытуемых. Исходя из данных рисунка 3, показатель СГГ до тренировки был приблизительно на одном уровне для двух групп.

В процессе тренировки мы наблюдаем равномерный прирост этого показателя в течение тренировки и после тренировки для группы неподготовленных студентов, а у спортсменов во время тренировки прирост СГГ был незначительным, по

сравнению с группой недостаточно подготовленных студентов, но после тренировки резко возрос. Прирост СГГ для нетренированных студентов во время тренировки составил 9%, а для подготовленных спортсменов 6%. Различия между среднегрупповыми значениями СГГ на этом этапе тренировки достоверны (коэффициент t Стьюдента составил 4.69, что соответствует $p < 0.001$). Данная динамика изменения показателя СГГ в разных группах говорит о том, что организм спортсменов реагирует на тренировочные нагрузки медленнее, чем у неподготовленных студентов. В конце тренировки показатель СГГ имеет одинаковый средний уровень в обеих группах при равной продолжительности тренировки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о повышении степени гетерохроматинизации хроматина в ядрах клеток буккального эпителия. Изменения более выражены у нетренированных студентов.

Как правило, явление конденсации хроматина связано с понижением активности биосинтетических процессов в ядре [7]. Эта реакция является также неспецифическим клеточным ответом на действие повреждающих факторов [9]. Известно, что содержание стрессовых гормонов в крови возрастает в ответ на физическую нагрузку [6]. Было установлено, что гормоны стресса вызывают увеличение СГГ в концентрациях, близких к физиологическим [2], поэтому в случае утомления, вызванного физическими нагрузками конденсация хроматина может быть связана с воздействием гормонов стресса.

По нашему мнению, конденсация хроматина при физической нагрузке связана с процессами регуляции генной активности. Ранее генная регуляция в клетках буккального эпителия при физической нагрузке не исследовалась, хотя в мышцах исследовались изменения в экспрессии генов, связанные с мышечным утомлением. Так, установлено, что в мышцах крысы физическая нагрузка (утомление) вызывает изменения в экспрессии 10 белков, причем у 8 белков наблюдалось снижение экспрессии, у 2-х – повышение [10].

Полученные нами данные свидетельствуют, что физическая нагрузка на организм человека вызывает повышение степени конденсации хроматина в клетках букального эпителия. Данный показатель отражает неспецифическую реакцию организма на нагрузку, связанную с выполнением физических упражнений. Мы предполагаем, что метод определения степени конденсации хроматина будет полезен при анализе состояния организма человека при воздействии различных стрессовых факторов.

Выводы.

1. Физическая нагрузка, связанная со спортивной тренировкой, приводит к увеличению степени гетерохроматизации в ядрах клеток букального эпителия.

2. В группе нетренированных доноров повышение степени гетерохроматизации было более вы-

ражено, чем в группе спортсменов – кандидатов в мастера спорта.

3. Показатель содержания гранул гетерохроматина в ядре клетки является чувствительным индикатором функционального состояния человека динамике труда и достоверно увеличивается при развитии утомления.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем планируется исследование влияния не только физической нагрузки на организм, но и иных факторов окружающей среды, а также и различных веществ на изменение состояния хроматина в клетках человека. Таким образом, в дальнейшем это позволит использовать данный показатель для экспресс-анализа состояния организма при стрессовых воздействиях.

Литература

1. Шкорбатов Ю. Г. Структура хроматина и состояние человеческого организма / Ю. Г. Шкорбатов, Л. А. Журавлева, В. В. Навроцкая, Е. В. Мирошниченко, П. Ю. Монтвид, В. Г. Шахбазов, Т. А. Сутушев // Cell. Biol. Internat. – 2005. – С. 29, 77-81.
2. Шкорбатов Ю. Г. Изменение состояния ядра и хроматина человеческих клеток под влиянием гормональных факторов *in vitro* / Ю. Г. Шкорбатов, В. Г. Шахбазов, О. В. Горенская [и др.] // Цитология и генетика. – 1999. – С. 33, 64-71.
3. Allen D. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms / D. G. Allen, G. D. Lamb, H. Westerblad, // Physiol Rev. – 2008. – Vol. 88. – P. 287–332.
4. Beneke R. Blood lactate diagnostics in exercise testing and training. Centre for Sport and Exercise Science / R. Beneke, R. M. Leithduser, O. Ochental // J. Sports Physiol Perform. – 2011. – Vol. 6. – P. 8-24.
5. Fletcher G. F. Exercise Standards for Testing and Training: A Statement for Healthcare Professionals / G. F. Fletcher, G. J. Balady, E. A. Amsterdam [et al.] // Circulation. – 2001. – Vol. 104. – P. 1694-1740.
6. Kraemer W. J. Hormonal Responses and Adaptations to Resistance Exercise and Training Sports / W. J. Kraemer, N. A. Ratamess // Med. – 2005. – Vol. 35 (4). – P. 339-361
7. Lewin B. Genes – 8-th ed. / B. Lewin. – New York : Pearson Prentice Hall, 2004. – 909 p.
8. Shckorbatov Y. Changes in chromatin state in donors subjected to physical stress / Y. Shckorbatov, V. Samokhvalov, D. Beviuk, [et al.] // ArXiv:0902. 0089. – 2009.
9. Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress. In New Developments in Chromatin Research. / Y. Shckorbatov. – New York : Editors: Neil M. Simpson and Valerie J. Stewart, Nova Publishers, 2012.
10. Zhao L. Proteomic investigation of changes in rat skeletal muscle after exercise-induced fatigue / L. Zhao, W. Yan, H. Xiang, [et al.] // Biol Res. – 2012. – Vol. 45(1), – P. 75-80.

УДК 57. 022:576. 3(08)

КЛІТИННА ВІДПОВІДЬ НА ФІЗИЧНІ НАВАНТАЖЕННЯ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ СПОРТИВНИХ ТРЕНУВАНЬ

Магда І. Ю., Темченко В. А., Колій С. Н., Шкорбатов Ю. Г.

Резюме. Мета даної роботи – проаналізувати зміну вмісту гранул гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію людини при впливі фізичних навантажень на організм. Для оцінки впливу фізичних навантажень на даний показник порівнювалися результати, отримані до, під час і після тренування з волейболу. Про зміну ступеня конденсації хроматину в інтерфазних ядрах клітин букального епітелію судили по зміні вмісту гранул гетерохроматину (ВГГ). Клітини забарвлювали в 2% розчині орсеїна в 45% оцтової кислоти, протягом 30 хв, потім визначали середню кількість гранул гетерохроматину на одне ядро і помилку середнього. В результаті однаковою тривалості навантаження було встановлено, що збільшення вмісту гранул гетерохроматину після навантаження для нетренованих спортсменів вище, ніж у тренуваних. Отримані дані свідчать, що показник ВГГ відображає неспецифічну клітинну реакцію організму на навантаження, пов'язану з виконанням фізичних вправ.

Ключові слова: стомлення, клітинне ядро, букальний епітелій, орсеїн, гетерохроматин, конденсація хроматину, стрес.

УДК 57. 022:576. 3(08)

КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА ФИЗИЧЕСКИЕ НАГРУЗКИ ВО ВРЕМЯ ВЫПОЛНЕНИЯ СПОРТИВНЫХ ТРЕНИРОВОК

Магда И. Ю., Темченко В. А., Колий С. Н., Шкорбатов Ю. Г.

Резюме. Цель данной работы – проанализировать изменение содержания гранул гетерохроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека при влиянии физических нагрузок на организм. Для оценки влияния физических нагрузок на данный показатель сравнивались результаты, полученные до, во время и после тренировки по волейболу. Об изменении степени конденсации хроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия судили по изменению содержания гранул гетерохроматина (СГГ). Клетки окрашивали в 2% растворе орсеина в 45% уксусной кислоте, в течение 30 мин, затем определяли среднее количество гранул гетерохроматина на одно ядро и ошибку среднего. В результате одинаковой длительности нагрузки было установлено, что увеличение содержания гранул гетерохроматина после нагрузки для нетренированных спортсменов выше, чем у тренированных. Полученные данные свидетельствуют, что показатель СГГ отражает неспецифическую клеточную реакцию организма на нагрузку, связанную с выполнением физических упражнений.

Ключевые слова: утомление, клеточное ядро, буккальный эпителий, орсеин, гетерохроматин, конденсация хроматина, стресс.

UDC 57. 022:576. 3(08)

Cellular Response to Physical Loading during the Sports Training

Magda I. Y., Temchenko V. A., Koliy S. N., Shckorbatov Y. G.

Abstract. The problem of correct determination of the state of human fatigue is of great practical significance. The state of fatigue has various manifestations and can be determined by different methods. Exercise training in apparently healthy person impacts on several areas, including maximal oxygen uptake, central hemodynamic function, autonomic nervous system function, peripheral vascular and muscular function, and submaximal exercise capacity. Many muscle properties change during fatigue including the action potential, extracellular and intracellular ions, and many intracellular metabolites. A range of mechanisms have been identified that contribute to the decline of performance, including the action potential, extracellular and intracellular ions, and many intracellular metabolites and, in principle, characteristics of main factors involved in these mechanisms may be used for fatigue assessment. The modern methods of fatigue assessment imply usage of complex technical devices and biochemical methods which often are connected with collecting of blood samples and therefore traumatic. In this connection, it is important to determine the one general parameter, which would help to assess the changes in the state of the organism after exposure to various factors. In this paper we investigated the possibility of application of cytological indicator – the state of chromatin in cell nucleus due to fatigue. The condensation of chromatin in the nuclei of buccal in epithelium was used as a general indicator of stress. Previously the state of chromatin in nuclei of buccal cells was applied in research on the influence of physical stress (training walks, physical charges on the cycle ergometer). The state of condensation of chromatin in human buccal epithelium nuclei was investigated in connection to sport loads. Cells were stained with 2% orcein for 30 minutes, and then examined at magnification x 600. The average number of the heterochromatin granules for 30 nuclei was calculated. Students of Kharkiv University of age approximately 21 years old were goodwill donors of cells. There were two groups of students – trained and untrained. Group of students got the physical loadings – volleyball training session. Sportive training caused growth of the degree chromatin condensation, especially in group of untrained students. In the group of untrained donors at the first stage of the training session the increasing of the level of chromatin condensation was more pronounced than in the group of athletes – candidates for degree Master of Sports.

From the data obtained among untrained students it's evident that the growth of number of the heterochromatin granules after two hours it is even more pronounced than after one hour, indicating the process of development of fatigue. We can interpret the observed increase in number of the heterochromatin granules as an evidence of the stress response of the organism to sport training charges. The response of the organism in trained athletes is less pronounced than in untrained students. As a rule, the phenomenon of condensation of chromatin is associated with decreased activity of biosynthetic processes in the nucleus. This reaction is also a nonspecific cell response to the action of damaging factors. In this case, condensation of chromatin may be due to effects on stress hormones, such as, adrenalin, noradrenalin and hydrocortisone that are produced in response to intense physical activity. Our data suggest that physical stress induces an increase of the degree of chromatin condensation in buccal cells thus reflecting the nonspecific reaction of human organism to stress. Physical activity associated with sports training leads to an increase in the degree of chromatin condensation in the nuclei of buccal epithelium.

Key words: fatigue, cell nucleus, buccal epithelium, orcein, heterochromatin, chromatin condensation, stress.

Рецензент – проф. Олійник С. А.

Стаття надійшла 27. 01. 2014 р.