

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-230-10-150-154>

Влияние физической нагрузки на пролиферативный и ферментативный потенциал печени и в условиях коррекции милдронатом

Малышев И.И.¹, Альпидовская О.В.², Романова Л.П.²

¹ Марийский государственный университет, (пл. Ленина, д. 1, г. Йошкар-Ола, 424000, Россия)

² Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, (Московский пр., 45, г. Чебоксары, 428015, Россия)

Для цитирования: Малышев И.И., Альпидовская О.В., Романова Л.П. Влияние физической нагрузки на пролиферативный и ферментативный потенциал печени и в условиях коррекции милдронатом. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2024;(10): 150–154. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-230-10-150-154

✉ Для переписки:
Альпидовская
Ольга Васильевна
olya-vorobeva-2018
@mail.ru

Малышев Игорь Иванович, д.м.н., врач-патологоанатом, профессор кафедры физиологии и патологии
Альпидовская Ольга Васильевна, врач, к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины
Романова Любовь Петровна, к.б.н., доцент кафедры дерматовенерологии с курсом гигиены

Резюме

Цель исследования — влияние милдроната на пролиферацию гепатоцитов и на активность ферментов печени крыс при физической нагрузке различной интенсивности.

Материал и методы исследования. В качестве экспериментальных животных были использованы 84 белые самцы крыс весом 240 грамм. Животные были разделены на три группы. Эксперимент проводили в два этапа. В первом этапе крысам давали нагрузку разной интенсивности: первой группе крыс давали легкую физическую нагрузку, для чего их помещали в ванну с температурой воды 29–32°C в которой животные плавали 15 минут. Крысы второй группы проводили в ванне 30 минут; эту нагрузку расценивали средней тяжести. Для воспроизведения тяжелой физической нагрузки (третья группа) животные плавали в ванной до тех пор, пока они не начинали терять силы и тонуть. Обычно это наступало через 55–59 минут после нахождения животных в воде. После извлечения из ванны животные этой группы, в отличие от животных первых двух групп, были вялыми, некоторое время лежали, не принимали пищу. Животными всех групп было выполнено 10 сеансов водной нагрузки после чего их выводили из эксперимента сразу после последнего сеанса (7 животных на группу) и через 30 суток после окончания эксперимента (по 7 животных на группу) с применением золотилового наркоза из расчета 5 мг на 100 г в соответствии с Международными правилами проведения работ с экспериментальными животными. На втором этапе другая группа крыс, также разбитая на три группы, получали аналогичную нагрузку разной интенсивности, однако на протяжении всего эксперимента (10 дней) ежедневно отмечалось пероральное введение милдроната, 3-(2,2,2-триметилгидразин) пропионата в дозе 100 мг/ кг. Контрольными животными (n=7) были белые крысы весом 240 грамм. После извлечения печени из неё вырезали кусочки размером 1×1 см, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине и заключали в парафин; полученные серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по ван Гизон. Двухядерные гепатоциты подсчитывали на 7000 клеток. Гистохимически в гепатоцитах определяли СДГ, *NADH*, *NADPH*, кислую и щелочную фосфатазы. Статистический анализ проведен в программе «Statistica-6». Для анализа различий между выборками использовали t-критерий Стьюдента.

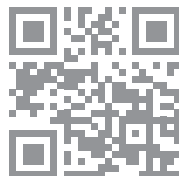
Результаты и их обсуждение. Выполненное исследование установило, что применение милдроната при выполнении крысами физической нагрузки существенным образом меняет ситуацию: увеличивается пролиферативная активность гепатоцитов при выполнении крысами легкой и средней тяжести нагрузки, протекающая на фоне повышения активности окислительно-восстановительных ферментов. При выполнении крысами тяжелой нагрузки использование милдроната поддерживает репродуктивные потенции гепатоцитов и нормальную ферментативную характеристику печени.

Заключение. Выполненное исследование показывает, что применение милдроната не только желательно при выполнении животными тяжелой физической нагрузки, но и, по-видимому, является необходимым по жизненным показаниям.

Ключевые слова: физическая нагрузка, печень, морфологические изменения, милдронат

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: GZYCBK





The effect of physical exercise on the proliferative and enzymatic potential of the liver and under conditions of correction with mildronate

I.I. Malyshev¹, O.V. Alpidovskaya², L.P. Romanova²

¹ Mari State University, (1, Lenina Sq., Yoshkar-Ola, 424000, Russia)

² Chuvash State University named after I.N. Ulyanova, (45, Moskovsky pr., Cheboksary, 428015, Russia)

For citation: Malyshev I.I., Alpidovskaya O.V., Romanova L.P. The effect of physical exercise on the proliferative and enzymatic potential of the liver and under conditions of correction with mildronate. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2024;(10): 150–154. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-230-10-150-154

✉ *Corresponding author:*

Olga V.

Alpidovskaya

olya-vorobeva-2018

@mail.ru

Igor I. Malyshev, Dr. sc. med. pathologist, professor of the Department of Physiology and Pathology

Olga V. Alpidovskaya, Ph.D., Cand. sc. med., associate professor of the Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine

Lyubov P. Romanova, PhD, associate professor of the Department of Dermatovenereology with a course in Hygiene

Summary

The purpose of the study is the effect of mildronate on the proliferation of hepatocytes and on the activity of liver enzymes in rats during physical activity of varying intensity.

Material and methods. 84 white male rats weighing 240 grams were used as experimental animals. The animals were divided into three groups. The experiment was carried out in two stages. In the first stage, the rats were given loads of varying intensity: the first group of rats was given a light physical load, for which they were placed in a bath with a water temperature of 29–32°C in which the animals swam for 15 minutes. The rats of the second group spent 30 minutes in the bath; this load was considered to be of moderate severity. To simulate heavy physical activity (third group), the animals swam in the bath until they began to lose strength and drown. This usually occurred 55–59 minutes after the animals were in the water. After being removed from the bath, the animals of this group, unlike the animals of the first two groups, were lethargic, lay down for some time, and did not eat. Animals of all groups underwent 10 sessions of water loading, after which they were taken out of the experiment immediately after the last session (7 animals per group) and 30 days after the end of the experiment (7 animals per group) using zoletil anesthesia at the rate of 5 mg per 100 g in accordance with the International Rules for Work with Experimental Animals. At the second stage, another group of rats, also divided into three groups, received a similar load of varying intensity, however, throughout the entire experiment (10 days), oral administration of mildronate, 3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate at a dose of 100 mg was observed daily. / kg. Control animals (n=7) were white rats weighing 240 grams. After removing the liver, pieces measuring 1x1 cm were cut out from it, which were fixed in 10% neutral formaldehyde and embedded in paraffin; The resulting serial sections were stained with hematoxylin and eosin and van Gieson. Binucleate hepatocytes were counted per 7000 cells. SDH, NADH, NADPH, acid and alkaline phosphatases were determined histochemically in hepatocytes. Statistical analysis was carried out using the Statistica-6 program. Student's t-test was used to analyze differences between samples.

Research results. The study found that the use of mildronate when rats performed physical activity significantly changes the situation: the proliferative activity of hepatocytes increases when rats perform light and moderate exercise, occurring against the background of increased activity of redox enzymes. When rats perform heavy workloads, the use of mildronate supports the reproductive potency of hepatocytes and the normal enzymatic characteristics of the liver.

Conclusion. The study shows that the use of mildronate is not only desirable when animals perform heavy physical activity, but also, apparently, is necessary for health reasons.

Keywords: physical activity, liver, morphological changes, mildronate

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Физические упражнения – необходимый компонент в самосовершенствовании, как средство сохранения здоровья и работоспособности.

Воздействие комплекса физических упражнений на организм улучшает его физическое состояние, деятельность сердечно-сосудистой системы

и опорно-двигательного аппарата [1, 2, 3]. Постоянная и адекватная физическая активность улучшает когнитивные функции, снижает риск преждевременной смерти от хронических заболеваний и, соответственно, улучшает качество жизни. Профессиональные спортсмены зачастую доводят интенсивность тренировок до предела с целью улучшения своих показателей. Несоблюдение баланса между нагрузкой и реабилитацией приводит к дезадаптации, что увеличивает риск возникновения различных болезней [4, 5, 6]. В ранее проведенном исследовании было установлено, что физическая нагрузка различной интенсивности различно влияет на пролиферацию гепатоцитов и функциональное состояние печеночных

клеток [6]. Показано, что наиболее благоприятно на пролиферативные и функциональные показатели печени крыс оказывает физическая нагрузка средней интенсивности; физическая нагрузка высокой интенсивности в значительной степени и надолго их подавляет.

В этой связи вызывает интерес возможность положительно влиять на пролиферацию гепатоцитов и на их ферментативную активность в условиях физической нагрузки с помощью различных факторов. Возможно, полученные результаты помогут оценить изменения, возникающие и у людей при тяжелой физической нагрузке, например, у профессиональных спортсменов [2, 8] и наметить пути снижения неблагоприятных последствий для печени.

Материал и методы исследования

В качестве экспериментальных животных были использованы 84 белые половозрелые беспородные самцы крыс весом 240 грамм. Животные были разделены на три группы (серии). Эксперимент проводили в два этапа. В первом этапе крысам давали нагрузку разной интенсивности. 1-й серии крыс давали легкую физическую нагрузку, для чего их помещали в ванну с температурой воды 29–32 градуса Цельсия в которой животные плавали 15 минут. Крысы 2-й серии проводили в ванне 30 минут; эту нагрузку расценивали средней тяжести. Для воспроизведения тяжелой физической нагрузки (3-я серия) животные плавали в ванной до тех пор, пока они не начинали терять силы и тонуть. Обычно это наступало через 55–59 минут после нахождения животных в воде. После извлечения из ванны животные этой группы, в отличие от животных первых двух групп, были вялыми, некоторое время лежали, не принимали пищу. Животными всех серий было выполнено 10 сеансов водной нагрузки после чего их выводили их эксперимента сразу после последнего сеанса (7 животных на серию) и через 30 суток после окончания эксперимента (по 7 животных на серию) с применением золотилового наркоза из расчета 5 мг на 100 г в соответствии с Международными правилами проведения работ с экспериментальными животными.

На втором этапе другая группа крыс, также разбитая на три группы, получали аналогичную нагрузку разной интенсивности, однако на протяжении всего эксперимента (10 дней) ежедневно

отмечалось пероральное введение милдроната, 3-(2,2,2-триметилгидразин) пропионата в дозе 100 мг/кг. Контрольными животными ($n=7$) были белые крысы весом 240 грамм.

Эксперименты основывали на принципах гуманности, изложенных в Директиве Совета Европейского Союза (86/609/ЕЭС), а также в ГОСТ Р 53434–2009 от 1 марта 2010 г. «Принципы надлежащей лабораторной практики» (идентичен *GLP OECD*). Проведение эксперимента одобрено этическим комитетом Марийского государственного университета (протокол № 1 от 28.04.2023 г).

После извлечения печени из неё вырезали кусочки размером 1×1 см, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине и заключали в парафин; полученные серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по ван Гизон. Двухядерные гепатоциты подсчитывали на 7000 клеток. Гистохимически в гепатоцитах определяли СДГ, *NADH*, *NADPH*, кислотную и щелочную фосфатазы [3]. Количественную оценку ферментативной активности осуществляли с использованием фотометрирования и выражали в условных единицах оптической плотности (у.е.). Оценка гистологических препаратов производилась с применением программы *SigmaScan Pro5* (США) и микроскопа *Carl Zeiss Axio Scope A1* (Германия), Ч400. Статистический анализ проведен в программе «*Statistica*». Для анализа различий между выборками использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Микроскопически в печени всех животных наблюдались дву- (и много-) ядерные гепатоциты. Митозы гепатоцитов зафиксированы не были. У крыс 1-й и 2-й серии, участвующих в экспериментах без привлечения милдроната, морфологические изменения отсутствовали: печень имела нормальное строение. В печени животных 3-й серии наряду с отмечаемыми дистрофическими изменениями (по типу белковой дистрофии) и мелкими кровоизлияниями, отмечались мелкие немногочисленные очаги некрозов гепатоцитов без клеточной

реакции; некрозы локализовались преимущественно в периферических отделах дольки. Печень крыс всех серий, у которых был использован милдронат имела практически нормальное строение.

В табл. 1 представлены результаты подсчета двухядерных гепатоцитов у крыс сразу после окончания эксперимента при различной интенсивности нагрузки без применения милдроната и с применением милдроната.

Результаты исследования подтверждают полученные ранее сведения о том, что наиболее

Таблица 1.	Число двуядерных гепатоцитов сразу после окончания опыта у крыс по сериям ($M \pm m$) без применения милдроната/с применением милдроната	Серия	Опытные животные	Контрольные животные
		1	13,5 \pm 2,6/18,0 \pm 1,9*	12,7 \pm 2,8
		2	17,1 \pm 3,4/24,6 \pm 1,5**	12,7 \pm 2,8
Примечание:	* – $p < 0,001$ ** – $p < 0,01$	3	6,3 \pm 1,6**/15,2 \pm 3,0*	12,7 \pm 2,8

Таблица 2.	Число двуядерных гепатоцитов по сериям через 30 суток после окончания опыта у крыс ($M \pm m$) без применения милдроната / с применением милдроната	Серия	Опытные животные	Контрольные животные
		1	11,9 \pm 3,5/14,3 \pm 3,6	12,7 \pm 2,8
		2	15,2 \pm 2,6/16,3 \pm 2,7*	12,7 \pm 2,8
Примечание:	* – $p < 0,01$	3	8,1 \pm 4,5*/13,4 \pm 3,5	12,7 \pm 2,8

Таблица 3.	Активность ферментов гепатоцитов крыс без применения милдроната / с применением милдроната сразу после нагрузки ($M \pm m$) в у.е.	Серии	Щелочная фосфатаза	Кислая фосфатаза	СДГ	NADH	NADPH
		1	0,36 \pm 0,04/ 0,30 \pm 0,04	0,29 \pm 0,02/ 0,33 \pm 0,03	0,36 \pm 0,02/ 0,40 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03/ 0,41 \pm 0,05	0,27 \pm 0,01/ 0,31 \pm 0,04
		2	0,38 \pm 0,02/ 0,38 \pm 0,02	0,34 \pm 0,04/ 0,38 \pm 0,02	0,39 \pm 0,05/ 0,45 \pm 0,04	0,30 \pm 0,03/ 0,36 \pm 0,03	0,35 \pm 0,03/ 0,39 \pm 0,02
Примечание:	* – $p < 0,001$	3	0,60 \pm 0,09*/ 0,38 \pm 0,05	0,70 \pm 0,05*/ 0,41 \pm 0,05	0,19 \pm 0,04*/ 0,36 \pm 0,03	0,15 \pm 0,04/ 0,33 \pm 0,03	0,19 \pm 0,06*/ 0,36 \pm 0,08
		Контроль	0,36 \pm 0,002	0,39 \pm 0,04	0,34 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01

Таблица 4.	Активность ферментов гепатоцитов у крыс без применения милдроната / с применением милдроната через 30 суток после нагрузки ($M \pm m$) в у.е.	Серии	Щелочная Фосфатаза	Кислая фосфатаза	СДГ	NADH	NADPH
		1	0,30 \pm 0,03/ 0,30 \pm 0,05	0,36 \pm 0,04/ 0,32 \pm 0,04	0,34 \pm 0,02/ 0,34 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03/ 0,30 \pm 0,05	0,28 \pm 0,04/ 0,36 \pm 0,05
		2	0,27 \pm 0,04/ 0,29 \pm 0,02	0,35 \pm 0,05/ 0,30 \pm 0,03	0,36 \pm 0,06/ 0,35 \pm 0,02	0,28 \pm 0,02/ 0,31 \pm 0,4	0,36 \pm 0,03/ 0,36 \pm 0,04
Примечание:	$p < 0,001$	3	0,62 \pm 0,04*/ 0,32 \pm 0,04	0,71 \pm 0,07*/ 0,40,7 \pm 0,04	0,21 \pm 0,03*/ 0,34 \pm 0,06	0,19 \pm 0,04*/ 0,29 \pm 0,04	0,20 \pm 0,06*/ 0,30 \pm 0,03
		Контроль	0,36 \pm 0,002	0,39 \pm 0,04	0,34 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01

благоприятные условия для пролиферации гепатоцитов возникают при физической нагрузке средней интенсивности; тяжёлая физическая нагрузка сопровождается значительным снижением количества двуядерных гепатоцитов [3]. Ведение милдроната существенно меняет картину: количество двуядерных гепатоцитов возрастает и при слабой, и при умеренной физической нагрузках (табл. 2).

Но наиболее благоприятно это сказывается на пролиферативной активности гепатоцитов при тяжёлой физической нагрузке, когда количество двуядерных гепатоцитов в конце эксперимента возрастает и превышает контрольные цифры. Причём, эта тенденция сохраняется и через 30 суток после окончания опыта (табл. 2).

Из табл. 3 следует, что активность ферментов печени через 30 суток после окончания опыта практически не изменились у животных первой серии и незначительно отклонились от нормальных цифр у крыс второй серии в условиях, когда опыт проводился без милдроната.

У животных третьей серии при этом отмечается увеличение лизосомальных ферментов и также статистически достоверное снижение активности окислительно-восстановительных ферментов.

В табл. 4 представлены результаты исследования активности ферментов через 30 суток после окончания испытания физической нагрузкой с применением милдроната. Можно видеть, что у крыс всех серий и лизосомальные, и окислительно-восстановительные ферменты приблизились к контрольным цифрам, хотя иногда и несколько превышают их (кислая фосфатаза, NADH).

Таким образом, сравнительный анализ динамики состояния ферментов и пролиферативная активность гепатоцитов подтверждает, что прослеживается прямая связь между активностью ферментов и интенсивностью пролиферации гепатоцитов. Физическая нагрузка небольшой интенсивности, проводимая без милдроната, практически не влияет на изменение ферментной активности гепатоцитов. Физическая нагрузка

средней интенсивности незначительно повышает активность лизосомальных ферментов и одновременно способствует активации окислительно-восстановительных ферментов; при этом стимулируется пролиферация гепатоцитов. Через 30 суток ферменты печени возвращаются к цифрам контрольных животных. Тяжелая физическая нагрузка отрицательно влияет на оба показателя: повышается активность лизосомальных ферментов и одновременно снижается активность окислительно-восстановительных ферментов с понижением содержания и двуядерных гепатоцитов. Восстановления этих показателей через 30 суток у этих животных не происходит. Таким образом, можно констатировать, что тяжелая физическая нагрузка пагубно влияет на структуру и функцию печени крыс.

Привлечение милдроната при выполнении крысами физической нагрузки существенным образом меняет ситуацию. Увеличивается пролиферативная активность гепатоцитов при выполнении крысами легкой и средней тяжести нагрузки, протекающая на фоне повышения активности

окислительно-восстановительных ферментов. Но наиболее значимые изменения возникают при выполнении крысами тяжелой нагрузки. Милдронат не только поддерживает репродуктивные потенции гепатоцитов на хорошем уровне, но и поддерживает нормальную ферментативную характеристику печени.

Милдронат является средством, с уникальным механизмом действия, которое оказывает влияние на восстановительный процесс (активируется производство энергии из глюкозы, запускается экспрессия белков, увеличивается число центров, катализирующих окисление жирных кислот, т.е. происходит активация механизмов адаптации на генном уровне). Активным веществом в милдронате является мeldonий – это метаболическое средство, приводящее в норму энергетический метаболизм клеток [4, 7].

Таким образом, выполненное исследование показывает, что применение милдроната не только желательно при выполнении животными тяжелой физической нагрузки, но и, по-видимому, является необходимым по жизненным показаниям.

Литература | References

1. Ishtuganova A., Krylov V.M. The influence of physical activity on the human body. *Bulletin of Science*. 2018;8(8-4):45–49. (in Russ.)
Иштуганова А.А., Крылов В.М. Влияние физических нагрузок на организм человека // Вестник науки. 2018. № 8 (8-4):45–49.
2. Kogan O.S. Occupational and industrial medicine ecology. *The health status of elite athletes in various sports*. 2006; (5):40–44. (in Russ.)
Коган О.С. Медицина труда и пром. Экология // Состояние здоровья высококлассных спортсменов в различных видах спорта. 2006, № 5. С. 40–44.
3. Lloyd Z., Gossrau R., Schibler T.M. Histochemistry of enzymes. Laboratory methods. Moscow. Mir, 1982. 272 p. (in Russ.)
Ллойд З., Госсрау Р., Шиблер Т.М. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. – М.: Мир, 1982. – 272 с.
4. Romanenko A.A. The effect of meldonium mildronate on the recovery process after physical activity. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016. 11–4:763–765. (in Russ.)
Романенко А.А. Влияние милдроната «мельдония» на восстановительный процесс после физической нагрузки // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 11–4. – С. 763–765.
5. Smirnova A.D., Novitsky A.V., Shmoylova A.S., Shvarts Yu.G. The risk of sudden cardiac death in those involved in power loads. *Russian journal of cardiology*. 2021;26(4S):4394. (In Russ.) doi: 10.15829/1560–4071–2021–4394.
Смирнова А.Д., Новицкий А.В., Шмойлова А.С., Шварц Ю.Г. Риск внезапной сердечной смерти у занимающихся силовыми нагрузками // Российский кардиологический журнал. 2021. Т. 26(4S). С. 4394. doi: 10.15829/1560–4071–2021–4394.
6. Malishev I.I., Romanova L.P., Vorobeva O.V. The effect of physical load of varying intensity on the activity of liver enzymes and hepatocytes proliferation. *Open J. Hepatol*. 2022;4(1): 008–10. doi: 10.17352/ojh.00008.
7. Simkhovich B.Z., Briede Ia.L., Ozola R.A. The effect of mildronate on disorders of the cardiac contractile function in rats caused by an excess of free fatty acids and ischemia. *Farmakol Toksikol*. 1990;53(5):27–9.
8. Soligard T., Schwellnus M., Alonso J.M. et al. How much is too much? (Part 1) International Olympic Committee consensus statement on load in sport and risk of injury. *Br J Sports Med*. 2016;50(17):1030–1041. doi: 10.1136/bjsports-2016–096581.