

Функциональное состояние эритроцитов в условиях стресса, вызванного предельно допустимой физической нагрузкой, на фоне приема рыбьего жира и озонированного рыбьего жира

А.В. Дерюгина¹, П.В. Ястребов¹, Г.А. Бояринов^{1, 2}, Ю.А. Старателева¹

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Предельно допустимые физические нагрузки у спортсменов являются мощным стрессирующим фактором для организма, который вызывает повышение уровня стресс-реализующих гормонов, сужение сосудов, приводя к развитию нарушений в системе микроциркуляции, на которую в значительной степени оказывают влияние эритроциты. В свою очередь, движение эритроцитов по микроциркуляторному руслу определяется состоянием физико-химических свойств их мембраны, зависящих от модификации жирных кислот липидной фазы. При этом показано, что у профессиональных спортсменов наблюдается дефицит омега-3-полиненасыщенных жирных кислот (n-3 ПНЖК). Содержание n-3 ПНЖК в рыбьем жире (РЖ) обуславливает его использование в практике спортивной медицины. При этом остается неясным эффективность влияния РЖ и его озонированной формы на состояние и функционирование эритроцитов в условиях временного нарушения гомеостаза при действии предельных физических нагрузок.

Ц е л ь р а б о т ы . Изучение действия РЖ и озонированного РЖ (ОРЖ) на функциональные показатели эритроцитов в условиях стресса, вызванного у крыс моделированием физической нагрузки «до отказа».

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . В работе исследовано влияние РЖ и ОРЖ на метаболические и окислительные показатели эритроцитов, электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) и их агрегацию при моделировании физической нагрузки у крыс. Физическую нагрузку моделировали путем плавания животных «до отказа» с грузом 10 % от массы тела. Нагрузочный тест проводили 4 раза, в период постнагрузочного восстановления крысы получали перорально РЖ, ОРЖ (с озонидным числом 3000 или 1500) в зависимости от группы. Тестирование животных проводили 6 раз: определяли исходный уровень показателей, после нагрузочного теста (4 раза) и после отмены препаратов (на 3-й день). Исследовали концентрацию малонового диальдегида (МДА), аденозинтрифосфата (АТФ), 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ), ЭФПЭ и агрегацию эритроцитов.

Р е з у л ь т а т ы . Физическая нагрузка «до отказа» (контрольная группа) вызвала рост концентрации МДА, снижение ЭФПЭ, концентрации АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах, что сопровождалось повышением агрегации эритроцитов. Введение РЖ на фоне физической нагрузки определило менее выраженную липопероксидацию, тогда как введение ОРЖ с озонидным числом 3000 – максимально выраженную липопероксидацию по сравнению с контролем. Наименьший окислительный эффект при физической нагрузке регистрировался при введении ОРЖ с озонидным числом 1500. Снижение липопероксидации сопровождалось повышением концентрации АТФ, снижением 2,3-ДФГ, ростом ЭФПЭ и снижением агрегации эритроцитов.

З а к л ю ч е н и е . Использование ОРЖ (с озонидным числом 1500) наиболее эффективно нивелировало процессы в эритроцитах, обусловленные развитием стресса, вызванного у крыс моделированием физической нагрузки «до отказа».

Ключевые слова: физическая нагрузка, эритроциты, рыбий жир, озонированный рыбий жир.

Образец цитирования: Дерюгина А.В., Ястребов П.В., Бояринов Г.А., Старателева Ю.А. Функциональное состояние эритроцитов в условиях стресса, вызванного предельно допустимой физической нагрузкой, на фоне приема рыбьего жира и озонированного рыбьего жира // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(4):76-89. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-4-76-89

Поступила в редакцию 05.05.2024
Прошла рецензирование 01.06.2024
Принята к публикации 17.06.2024

Автор, ответственный за переписку

Дерюгина Анна Вячеславовна: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского». 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.
E-mail: derugina69@yandex.ru

Received 05.05.2024
Revised 01.06.2024
Accepted 17.06.2024

Corresponding author

Anna V. Deryugina: Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23, Gagarina prosp., Nizhny Novgorod, 603022, Russia.
E-mail: derugina69@yandex.ru

Functional state of erythrocytes under the extreme physical exertion while supplemented fish oil and ozonated fish oil

A.V. Deryugina¹, P.V. Yastrebov¹, G.A. Boyarinov^{1, 2}, Yu.A. Starateleva¹

¹Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

²Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . The extreme physical exertion in athletes is a powerful stress factor for the organism and causes an increase in the level of stress hormones, vasoconstriction thus resulting in the microcirculation system disorders, which are largely influenced by erythrocytes. In turn, the movement of erythrocytes through the microcirculatory bed is determined by the state of the physicochemical properties of their membrane depending on the type of lipid phase fatty acids. At the same time, it has been shown that professional athletes have a deficiency of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs). The content of n-3 PUFAs in fish oil (FO) determines its use in practice of sports medicine. At the same time, the effectiveness of FO and its ozonated form on the state and functioning of erythrocytes under conditions of temporary homeostasis imbalance due to the extreme physical exertion remains unclear.

A i m . Study of the effect of FO and ozonated FO (OFO) on the functional indices of erythrocytes in rats under the extreme physical exertion.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The effect of FO and OFO on metabolic and oxidative indices of erythrocytes, erythrocyte electrophoretic mobility (EEM) and their aggregation during modeling of physical activity in rats was studied. Extreme physical exertion in animals was modeled with forced swimming with a load equal to 10% of their body weight. The weight-loaded forced swimming (stress) test was performed 4 times; during the post-exertion recovery, the rats received FO, OFO (with an ozonide number of 3000 or 1500 – OFO-3000 and OFO-1500, respectively) depending on the group. The animals were tested 6 times: parameters were determined at baseline, after the stress test (4 times) and after substance withdrawal (on the 3rd day). The concentration of malondialdehyde (MDA), adenosine triphosphate (ATP), 2,3-diphosphoglycerate (DPG), EEM and erythrocyte aggregation was measured.

R e s u l t s . The extreme physical exertion (control group) caused an increase in the MDA concentration, a decrease in EEM and the concentration of ATP and 2,3-DPG in erythrocytes, which was accompanied by an increase in erythrocyte aggregation. The administration of FO during physical exertion determined less pronounced lipid peroxidation, while the administration of OFO-3000 determined the most pronounced lipid peroxidation compared to the control group. The lowest oxidative effect during physical exertion was recorded with the administration of OFO-1500. A decrease in lipid peroxidation was accompanied by an increase in the ATP concentration, a decrease in 2,3-DPG, an increase in EEM and a decrease in erythrocyte aggregation.

C o n c l u s i o n . The use of OFO-1500 most effectively eliminated the processes in rat erythrocytes induced by stress caused by extreme physical exertion.

Keywords: physical exertion, erythrocytes, fish oil, ozonated fish oil.

Citation example: Deryugina A.V., Yastrebov P.V., Boyarinov G.A., Starateleva Yu.A. Functional state of erythrocytes under the extreme physical exertion while supplemented fish oil and ozonated fish oil. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(4):76-89. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-4-76-89

ВВЕДЕНИЕ

Физические нагрузки в спорте высших достижений характеризуются постоянно возрастающей интенсивностью, что определяет напряжение функций организма с последующим повреждающим влиянием на различные органы и системы. Показано, что ежедневные интенсивные физические нагрузки повышают риск развития ишемической болезни сердца, цереброваскулярных заболеваний и венозных тромбоэмболических осложнений [1]. Физическая активность до состояния

INTRODUCTION

Physical activities in high-performance sports are characterized by ever-increasing intensity, which determines the stress in human body functions with subsequent disorders in different organs and systems. It has been shown that daily intense physical activity increases the risk of coronary artery disease, cerebrovascular diseases and venous thromboembolic complications [1]. Physical activity which leads to exhaustion is a powerful stress factor for the body [2]. Significant physical exertion causes an increase

утомления является мощным стрессирующим фактором для организма [2]. Значительная физическая нагрузка вызывает повышение уровня катехоламинов в крови, сужение сосудов, приводя к развитию нарушений в системе микроциркуляции, наблюдается нарушение реологических свойств крови и гемостаза [3]. На микроциркуляцию и реологию крови значительное влияние оказывают эритроциты, которые при повышенной физической нагрузке агрегируют, что определяется нарушением мембранных структур, вызванным развитием окислительного стресса и появлением активных форм кислорода [4]. В свою очередь, именно модификация жирных кислот в мембране эритроцитов предполагает изменение физико-химических свойств мембраны, ее проницаемости, лабильности и сложности прохождения эритроцита по микроциркулярному руслу [5]. При этом у профессиональных спортсменов наблюдается дефицит омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (n-3 ПНЖК) [6]. Улучшение жирнокислотного профиля фосфолипидов мембран эритроцитов наблюдается после перорального приема ПНЖК [7]. Использование добавок с рыбьим жиром (РЖ) основано в том числе и на содержании в нем n-3 ПНЖК [8]. В свою очередь, озонирование РЖ вызывает образование средне- и короткоцепочечных жирных кислот, которые по сравнению с длинноцепочечными ЖК, содержащимися в РЖ, быстрее метаболизируются в клетках, повышая их энергетический потенциал [9]. При этом роль озонированного рыбьего жира (ОРЖ) в спорте высших достижений не исследована, тогда как действие рыбьего жира, который применяется в спортивной медицине, на состояние эритроцитов также изучено крайне незначительно. Кроме того, большинство исследований проводится с использованием добавок n-3 ПНЖК и свидетельствуют о том, что все известные эффекты n-3 ПНЖК, такие как снижение выработки воспалительных эйкозаноидов, цитокинов и активных форм кислорода, иммуномодулирующее действие и ослабление воспалительных процессов, весьма противоречивы и зависят от состояния организма [10]. Исходя из отмеченного, остается неясной эффективность влияния РЖ и его озонированной формы на состояние и функционирование эритроцитов в условиях временного нарушения гемостаза при действии предельных физических нагрузок.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение действия РЖ и ОРЖ на функциональные показатели эритроцитов в условиях

in the blood level of catecholamines, vasoconstriction, leading to microcirculatory disorders, and imbalance in blood rheological properties and hemostasis [3]. Red blood cells being aggregated under increased physical activity, have a significant impact on microcirculation and blood rheology which is determined by alterations in the membrane structures caused by the developing oxidative stress and appearance of reactive oxygen species [4]. In turn, it is the modification of fatty acids in the erythrocyte membrane that suggests a change in the physicochemical properties of the membrane, its permeability, lability, and the complexity of erythrocyte passage through the microcirculatory bed [5]. At the same time, professional athletes have a deficiency of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) [6]. Improvement of the fatty acid profile of erythrocyte membrane phospholipids is observed after oral administration of PUFAs [7]. The use of fish oil (FO) supplements is based, among other things, on its n-3 PUFAs content [8]. In turn, the ozonation of FO causes formation of medium- and short-chain fatty acids which, compared to the long-chain fatty acids contained in FO, are metabolized in cells faster, increasing their energy potential [9]. Besides, the role of ozonated fish oil (OFO) in high-performance sports has not been studied, while the effect of fish oil, used in sports medicine, on the state of erythrocytes has also been studied a little. In addition, most studies are conducted using n-3 PUFA supplements and indicate that all known effects of n-3 PUFAs, such as reduced production of inflammatory eicosanoids, cytokines and reactive oxygen species, immunomodulatory effects and a decrease in inflammatory processes, are highly controversial, and depend on the condition of the body [10]. Based on the abovementioned, the favorable effect of the FO and its ozonated form on the state and functioning of erythrocytes under conditions of temporary homeostasis imbalance during the extreme physical exertion remains unclear.

AIM OF THE RESEARCH

To study the effect of FO and OFO on the functional parameters of rat erythrocytes under conditions of stress modeled with weight-loaded forced swimming.

MATERIALS AND METHODS

The experimental study was performed on Wistar albino male rats ($n = 48$) weighing 200 ± 20 g. The animals were kept in individual boxes with a natural 12-hour change of light and darkness, air humidity of 60% and its temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, and free access

стресса, вызванного у крыс моделированием физической нагрузки «до отказа».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проводилось на белых крысах самцах ($n = 48$) линии Wistar массой 200 ± 20 г. Животных содержали в индивидуальных боксах с естественной 12-часовой сменой света и темноты, влажностью воздуха 60 % и его температурой 22 ± 2 °C, со свободным доступом к воде и пище. Содержание животных и проводимые с ними манипуляции осуществляли в соответствии с нормативными документами – Guide for Care and Use of Laboratory Animals, приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Проведение исследования было одобрено Локальным этическим комитетом Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Животные были разделены на 4 группы по 12 крыс в каждой. Контрольным животным перорально вводили физраствор (1-я группа). Крыс 2-й группы кормили рыбьим жиром (доза 35 мг/кг), крыс 3-й группы – озонированным рыбьим жиром (доза 35 мг/кг, озонидное число 3000), крыс 4-й группы – озонированным рыбьим жиром (доза 35 мг/кг, озонидное число 1500).

Исследования РЖ и ОРЖ выполняли в ФБУ «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний» в Москве, протокол испытаний № 20423 от 01.02.2018. Механизм озонлиза включал окислительный разрыв двойных связей [11]. РЖ (исходный образец) и озонированный рыбий жир контролировали по пероксидному числу (ПЧ, мэкв/кг). Показатель оценивали в соответствии с фармакопеями. Следует отметить ПЧ, имеющее характер неопределенности при наличии следов озона и пероксидов в масле. Многие мировые фармакопеи вносят дополнительные рекомендации, включающие условия проведения анализа (температура, время, количество жиров и др.). В этой связи при определении ПЧ в образцах озонированного рыбьего жира мы дополнительно включали в условия проведения анализа температуру и количество жира. Обычно ПЧ, определяемые с такими дополнениями, называют озонидными числами. ПЧ возрастает в зависимости от количества активных форм кислорода: чем оно выше, тем больше в объекте активных форм кислорода [12].

to water and food. Animal care and manipulations were carried out in accordance with regulatory documents – the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated April 1, 2016 No. 199n “On approval of the Rules of Good Laboratory Practice”. The study was approved by the local Ethics Committee of the Institute of Biology and Biomedicine of the Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod.

The animals were divided into 4 groups of 12 rats each. The control animals were orally administered saline solution (group 1). The rats of group 2 received fish oil (35 mg/kg), the rats of group 3 – ozonated fish oil (35 mg/kg, ozonide number is 3000 – OFO-3000), and the rats of group 4 – ozonated fish oil (35 mg/kg, ozonide number is 1500 – OFO-1500).

The studies of FO and OFO were performed at the State Regional Center for Standardization, Metrology and Testing (Moscow), test protocol No. 20423 dated 01.02.2018. The mechanism of ozonolysis included oxidative cleavage of double bonds [11]. FO (initial sample) and ozonated fish oil were controlled by the peroxide value (PV, mEq/kg). The indicator was assessed in accordance with pharmacopoeias. It should be noted that PV has an uncertainty character in the presence of ozone and peroxide traces in oil. Many world pharmacopoeias make additional recommendations, including the conditions for the analysis (temperature, time, amount of fat, etc.). In this regard, when determining PV in ozonated fish oil samples, we additionally included the temperature and amount of fat in the conditions for conducting the analysis. Usually, PVs determined with such additions are called ozonide numbers. The PV increases depending on the number of reactive oxygen species: the higher it is, the more reactive oxygen species are present in the object [12].

The forced swimming test with a load was carried out by simulating forced swimming with the extreme exertion using the principle of the presented swimming load until the occurrence of pronounced fatigue and the animals' refusal to perform further action.

The load was selected in accordance with the standard technique of animal swimming with a load of 10% of their body weight in water at a comfort temperature (28°C).

After weighing, 1 hour before the swimming test, the animals were orally administered a calculated dose of the studied substance via intragastric tube in the study groups, and an equivalent volume of saline solution – in the control group. 15–20 min before testing (for correction a possible stress reaction), a selected load was attached to the rats. At the beginning of the study, the animal was immersed in the

Тест «Вынужденное плавание с грузом» проводили путем моделирования вынужденного плавания «до отказа» и строили по принципу предъявляемой плавательной нагрузки до формирования выраженного утомления и отказа животных от дальнейшего выполнения действия.

Нагрузку выбирали в соответствии со стандартной методикой плавания животных с грузом – 10 % от массы тела в термокофортной воде (28 °С).

Лабораторным животным после взвешивания за 1 ч до нагрузки с помощью внутрижелудочного зонда перорально вводили в исследуемых группах расчетную дозу изучаемого препарата, а в контрольной группе – эквивалентное количество физиологического раствора. За 15–20 мин до начала тестирования (для сглаживания возможной стресс-реакции) к крысам фиксировали подобранный груз. В начале исследования животное без резких движений погружали в воду бассейна. Критерием прекращения исследования в тесте предельного плавания являлось погружение животного на дно бассейна. В этот момент животное извлекали из воды, проводили забор крови из подъязычной вены в количестве 1.0 мл и затем обсушивали сухим полотенцем.

Этапы исследования:

1-й этап – этап покоя (исходный): проводили все исследования до физической нагрузки.

2-й этап – тест «До отказа» (1-й нагрузочный тест) – 4-й день эксперимента. В первые три дня до выполнения теста «До отказа» крысы получали перорально в исследуемых группах расчетную дозу изучаемого препарата, а в контрольной группе – эквивалентное количество физраствора. Накануне исследования животных на ночь оставляли без корма при свободном доступе к воде. В день проведения исследования (4-й день) животным за 1 ч до нагрузки перорально вводили в исследуемых группах расчетную дозу изучаемого препарата, а в контрольной группе – эквивалентное количество физраствора.

3-й этап – период постнагрузочного восстановления (5 дней). В этот период крысы получали перорально в исследуемых группах расчетную дозу изучаемого препарата, а в контрольной группе – эквивалентное количество физраствора.

4-й этап – тест «До отказа» (2-й нагрузочный тест).

5-й этап – период постнагрузочного восстановления (5 дней).

6-й этап – тест «До отказа» (3-й нагрузочный тест).

7-й этап – период постнагрузочного восстановления (5 дней).

water of the pool without sudden movements. The criterion for stopping the study in the forced swimming test was the animal's immersion on the bottom of the pool. At this point, the animal was removed from the water; blood was collected from the sublingual vein in the amount of 1.0 ml, and then the animal was dried with a dry towel weight-loaded.

Study stages:

Stage 1 – resting stage (initial): all manipulations were performed before the stress test.

Stage 2 – weight-loaded forced swimming test (1st stress test) – the 4th day of the experiment. In the first three days before the forced swimming test, the rats in the study groups received orally the calculated dose of the studied substance, and in the control group – an equivalent volume of saline solution. The day before the testing, the animals were left without food overnight with free access to water. On the day of the testing (4th day), 1 hour before the stress test, the animals in the study groups were orally administered the calculated dose of the studied substance, and in the control group – an equivalent volume of saline solution.

Stage 3 – post-stress recovery (5 days). During this period, the rats in the study groups received orally the calculated dose of the studied substance, and in the control group – an equivalent volume of saline solution.

Stage 4 – weight-loaded forced swimming test (2nd stress test).

Stage 5 – post-stress recovery (5 days).

Stage 6 – weight-loaded forced swimming test (3rd load test).

Stage 7 – post-stress recovery (5 days).

Stage 8 – weight-loaded forced swimming test (4th load test).

Stage 9 – period of residual effect of the studied drugs on physical activity (after substance withdrawal for 3 days after the 4th stress test).

The duration of the experiment was 25 days. Since the blood loss in rats with a single blood draw was less than 7% of the circulating blood volume, the contribution of this parameter was not taken into account.

Methods for studying the functional state of erythrocytes:

Erythrocyte electrophoretic mobility (EEM) was measured using our modified microelectrophoresis method. A suspension of washed erythrocytes was diluted with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), and EEM was measured by recording the time of erythrocyte passing a distance of 100 µm in Tris-HCl buffer pH 7.4 at a current of 12 mA. The EEM value was determined by the formula:

8-й этап – тест «До отказа» (4-й нагрузочный тест).

9-й этап – период остаточного влияния препаратов на физическую нагрузку (после отмены препаратов в течение 3 дней после 4-го нагрузочного теста).

Продолжительность эксперимента составила 25 дней. Поскольку при однократном заборе крови кровопотеря у крыс составляла менее 7 % объема циркулирующей крови, вклад данного параметра не учитывался.

Методы исследования функционального состояния эритроцитов:

Измерение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) производили методом микроэлектрофореза в собственной модификации. Суспензию отмытых эритроцитов разводили 10 мМ трис-НСl буфера (pH 7.4) и измеряли ЭФПЭ, регистрируя время прохождения эритроцитами расстояния 100 мкм в трис-НСl буфере pH 7.4 при силе тока 12 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле

$$U = S/TH,$$

где S – расстояние, на которое перемещались клетки;

T – время перемещения;

H – градиент потенциала.

Величину градиента потенциала определяли по формуле

$$H = I/g\chi,$$

где I – сила тока;

g – поперечное сечение камеры;

χ – удельная электропроводимость среды [13].

Агрегацию эритроцитов изучали методом оптической микроскопии путем подсчета одиночных эритроцитов и их агрегатов. В качестве стимулятора агрегации использовали раствор голубого декстрана Т-2000, 20 мг/мл (GE Healthcare) в трис-НСl буфере (pH 7.4). Отмытые эритроциты разводили раствором декстрана (в соотношении 1:10 по объему), и в камере Горяева подсчитывали число неагрегированных эритроцитов. Общее число эритроцитов в пробе считали в изотоническом растворе NaCl. Уровень агрегации A рассчитывали по формуле [14]

$$A = 100 \% - (\text{Число свободных (неагрегированных) эритроцитов} \times \text{Общее число эритроцитов}^{-1} \times 100 \%).$$

Измерение концентрации аденозинтрифосфата (АТФ), 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) проводили неэнзиматическим методом [15]. Кон-

$$U = S/TH,$$

where S is the distance that cells passed;

T is the time of passing;

H is the potential gradient.

The potential gradient value was determined by the formula

$$H = I/g\chi,$$

where I is current strength;

g is the cross section of the chamber;

χ is the specific electrical conductivity of the medium [13].

Erythrocyte aggregation was studied by optical microscopy by counting single erythrocytes and their aggregates. A solution of blue dextran T-2000, 20 mg/ml (GE Healthcare) in Tris-HCl buffer (pH 7.4) was used as an aggregation stimulator. The washed erythrocytes were diluted with a dextran solution (in a ratio of 1:10 by volume), and the number of non-aggregated erythrocytes was counted in the Gorjaev's chamber. The total count of erythrocytes in the sample was calculated in an isotonic NaCl solution. The level of aggregation A was calculated using the formula [14]

$$A = 100\% - (\text{Number of free (non-aggregated) erythrocytes} \times \text{Total count of erythrocytes}^{-1} \times 100\%).$$

The concentration of adenosine triphosphate (ATP) and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) was measured using a non-enzymatic method [15]. The concentration of ATP and 2,3-DPG was determined in a supernatant after incubation of hemolyzed erythrocytes with trichloroacetic acid (TCA). To determine ATP, equal volumes of TCA filtrate, 2N HCl and 2N NaOH were mixed. Inorganic phosphorus (Pi), which included Pi split off from ATP after hydrolysis and Pi before hydrolysis, was determined. To determine 2,3-DPG, nucleotides (ATP, adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP)) were removed from the TCA filtrate of hemolyzed erythrocytes by activated carbon adsorption followed by centrifugation. In the supernatant, Pi was determined (test tube 1). Another part of the TCA filtrate underwent ashing by adding 5% magnesium nitrate solution and 0.36N H₂SO₄. Pi was measured in the supernatant (test tube 2). Then, Pi was measured in each test tube by recording the color density with a KFK-3 photoelectric photometer ($\lambda = 660 \text{ nm}$). The concentration of Pi was determined according to the calibration curve using a standard solution of KH₂PO₄. The concentration of 2,3-DPG was calculated using the formula [16]

$$(\text{Pi (test tube 1)} \cdot 100 - \text{Pi (test tube 2)} \cdot 10) / 2.$$

центрацию АТФ и 2,3-ДФГ определяли в супернатанте после инкубации гемолизированных эритроцитов с трихлоруксусной (ТХУ) кислотой. При определении АТФ смешивали равные объемы ТХУ фильтрата с 2Н НСl и 2Н NaOH. Определяли неорганический фосфор (Рн), в состав которого входил Рн, отщепившийся от АТФ после гидролиза, и Рн до гидролиза. Для определения 2,3-ДФГ из ТХУ фильтрата гемолизированных эритроцитов удаляли нуклеотиды (АТФ, аденозиндифосфат (АДФ), аденозинмонофосфат (АМФ)) путем адсорбции на активированном угле с последующим центрифугированием. В супернатанте определяли Рн (пробирка 1). Другую часть ТХУ фильтрата подвергали озолению, добавляя 5% раствор нитрата магния и 0.36N H₂SO₄. В супернатанте измеряли Рн (пробирка 2). Определяли Рн в каждой пробирке, регистрируя плотность окраски на фотометре фотоэлектрическом КФК-3 ($\lambda = 660$ нм). Концентрацию Рн определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор КН₂РО₄. Расчет концентрации 2,3-ДФГ проводили по формуле [16]

$$(\text{Рн (пробирка 1)} \cdot 100 - \text{Рн (пробирка 2)} \cdot 10) / 2.$$

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по образованию окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при 530 нм при реакции с тиобарбитуровой кислотой. Для расчета концентрации МДА использовали коэффициент молярной экстинкции $E = 1.56 \cdot 10^{-5} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [17].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel. Рассчитывали такие параметры, как среднее арифметическое выборочной совокупности и стандартное отклонение по критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ концентрации АТФ в эритроцитах показал следующую динамику: при физической активности концентрация АТФ снижалась со 2-го этапа исследования и до конца эксперимента, не восстанавливаясь до исходных значений (табл. 1). РЖ и ОРЖ способствовали повышению концентрации АТФ на всех этапах исследования. При сравнении эффективности исследуемых веществ наиболее значимые результаты показало действие ОРЖ-1500. Его использование позволило после 2 и 3-го нагрузочного теста сохранить концентрацию АТФ на уровне исходных значений при снижении данного показателя в контроль-

The concentration of malondialdehyde (MDA) was determined by the formation of a colored trimethine complex with an absorption maximum at 530 nm during the reaction with thiobarbituric acid. The molar extinction coefficient $E = 1.56 \cdot 10^{-5} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ was used to calculate the concentration of MDA [17].

Statistical processing of experimental data was performed using Microsoft Excel. Parameters such as the arithmetic mean of the set sample and standard deviation according to the Student' test were calculated. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

An analysis of the ATP concentration in erythrocytes showed the following dynamics: during physical activity, the ATP concentration decreased from the 2nd stage of the study until the end of the experiment, not reaching to the baseline values (Table 1). FO and OFO contributed to an increase in the ATP concentration at all stages of the study. When comparing the effectiveness of the studied substances, the most significant results were achieved with OFO-1500. The use of OFO-1500 made it possible to maintain the ATP concentration at the baseline level after the 2nd and 3rd stress tests with a decrease in this indicator in the control group, and while after the 4th stress test and after the discontinuation of the substance administration, to increase the ATP values above the baseline level.

The dynamics of the 2,3-DPG concentration in erythrocytes demonstrated an increase in this indicator after the 2nd and 3rd stress tests in the control group with a subsequent decrease relative to the baseline level (Table 1). The use of FO and OFO-3000 determined maintaining the 2,3-DPG concentration at the baseline level after the 2nd and 3rd stress tests, comparable to the effect in the control group – after the 4th stress test, and more significant decrease in the metabolite compared to the controls after substance withdrawal. The effect of OFO-1500 determined a decrease in the concentration of 2,3-DPG after the 3rd stress test and further until the end of the experiment compared to the baseline values. At the same time, an inverse relationship was recorded between the dynamics of changes in the 2,3-DPG concentration and the ATP concentration in erythrocytes for all stages of the experiment. Probably, the decrease in the concentration of 2,3-DPG occurred because of increased ATP synthesis in the direct glycolysis pathway.

An analysis of the EEM dynamics revealed its increase in the experimental groups compared to the

Таблица 1. Динамика изменения концентрации АТФ (мкмоль Рн/мл клеток) и 2,3-ДФГ (мкмоль Рн/мл клеток) в эритроцитах в исследуемых группах**Table 1.** Dynamics of changes in the concentration of ATP ($\mu\text{mol Pi/ml cells}$) and 2,3-DPG ($\mu\text{mol Pi/ml cells}$) in erythrocytes in the study groups

Этап Stage	Контроль Control group	РЖ FO	ОРЖ-3000 OFO-3000	ОРЖ-1500 OFO-1500
АТФ / ATP				
Исходный уровень / At baseline	2.19 \pm 0.19	2.17 \pm 0.18	2.12 \pm 0.18	2.14 \pm 0.22
После нагрузочного теста After the stress test				
1	2.30 \pm 0.21	2.69 \pm 0.16 [#]	2.36 \pm 0.19	2.78 \pm 0.12 ^{**}
2	1.21 \pm 0.18 [#]	1.61 \pm 0.15 [#]	2.05 \pm 0.14 [*]	2.12 \pm 0.19
3	1.46 \pm 0.15 [#]	1.64 \pm 0.11 [#]	1.86 \pm 0.17 ^{**}	2.17 \pm 0.16 [*]
4	1.83 \pm 0.20 [#]	1.95 \pm 0.26	2.10 \pm 0.37	2.78 \pm 0.13 ^{**}
После отмены веществ After withdrawal of substances	1.71 \pm 0.31	2.73 \pm 0.13 ^{**}	2.88 \pm 0.17 ^{**}	3.06 \pm 0.16 ^{**}
2,3-ДФГ / 2,3-DPG				
Исходный уровень / At baseline	11.71 \pm 1.98	11.15 \pm 1.87	11.27 \pm 1.61	11.18 \pm 1.64
После нагрузочного теста After the stress test				
1	9.95 \pm 1.14	8.46 \pm 2.03	6.28 \pm 1.27 [#]	7.60 \pm 1.81 [#]
2	13.51 \pm 1.27	11.68 \pm 1.42	13.52 \pm 0.72 [#]	10.73 \pm 0.97
3	14.87 \pm 0.37 [#]	10.91 \pm 0.8 [*]	11.52 \pm 1.19 [*]	8.49 \pm 1.03 ^{**}
4	7.37 \pm 1.57 [#]	6.31 \pm 1.86 [#]	9.92 \pm 0.91 [#]	5.36 \pm 0.91 [#]
После отмены веществ After withdrawal of substances	6.32 \pm 1.32 [#]	2.56 \pm 0.34 [#]	4.16 \pm 0.29 [#]	2.91 \pm 0.48 [#]

Примечания: АТФ – аденозинтрифосфат; ДФГ – дифосфоглицерат; Рн – фосфор неорганический; РЖ – рыбий жир; ОРЖ-3000 – озонированный рыбий жир, озонидное число – 3000; ОРЖ-1500 – озонированный рыбий жир, озонидное число – 1500.

*Статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) по сравнению с контрольной группой; # статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) по сравнению с интактными животными (исходный уровень).

Note: ATP – adenosine triphosphate; DPG – diphosphoglycerate; Pi – inorganic phosphorus; FO – fish oil; OFO-3000 – ozonated fish oil, ozonide value is 3000; OFO-1500 – ozonated fish oil, ozonide value is 1500.

*Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with the control group; # statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared with intact animals (at baseline).

ной группе, а после 4-го нагрузочного теста и после отмены препаратов повысить значения АТФ выше исходного уровня.

Динамика концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах продемонстрировала увеличение данного показателя после 2 и 3-го нагрузочного теста в контрольной группе с последующим снижением относительно исходного уровня (см. табл. 1). Использование РЖ и ОРЖ-3000 определило сохранение концентрации 2,3-ДФГ на уровне исходных значений после 2 и 3-го нагрузочного теста, сопоставимое с действием в контрольной группе – после 4-го нагрузочного теста и более выраженное снижение метаболита по сравнению с контролем после отмены препаратов. Влияние ОРЖ-1500 определило снижение концентрации 2,3-ДФГ после 3-го нагрузочного теста и далее до конца эксперимента по отношению к исходным значениям. При этом регистрировалась обратная зависимость динамики изменения содержания 2,3-ДФГ от динамики изменения концентрации

control one, which was accompanied by a decrease in erythrocyte aggregation (Table 2). Marked changes in EEM were found in the groups of animals receiving FO and OFO-3000 from the 2nd stress test and during further stages; in the OFO-1500 group – from the 1st stress test. A decrease in aggregation was recorded in the FO and OFO groups from the 2nd stress test, while in the control group, an increase in aggregation was observed after the 1st–3rd stress tests.

Measuring the MDA concentration in erythrocytes revealed an increase in the parameter in all the study groups with a maximal rise during the 2nd and 3rd stress tests followed by a subsequent decrease in the index (Table 3). The use of OFO-1500 led to a less significant increase in MDA compared to the other study groups, both control and experimental. After substance withdrawal, a decrease in the concentration of MDA below the baseline values was registered in this group.

Таблица 2. Динамика ЭФПЭ ($\mu\text{м} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) и агрегации эритроцитов (%) в исследуемых группах
Table 2. Dynamics of EEM ($\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and erythrocyte aggregation (%) in the study groups

Этап Stage	Контроль Control group	РЖ FO	ОРЖ-3000 OFO-3000	ОРЖ-1500 OFO-1500
ЭФПЭ / EEM				
Исходный уровень / At baseline	0.90 ± 0.15	0.89 ± 0.10	0.85 ± 0.10	0.87 ± 0.05
После нагрузочного теста After the stress test				
1	0.87 ± 0.10	1.02 ± 0.20	0.98 ± 0.05	1.03 ± 0.07*
2	0.88 ± 0.20	1.23 ± 0.04**	1.12 ± 0.09*	1.25 ± 0.05**
3	0.83 ± 0.10	1.32 ± 0.10**	1.22 ± 0.10*	1.37 ± 0.12**
4	0.93 ± 0.20	1.38 ± 0.11#	1.32 ± 0.10**	1.42 ± 0.14**
После отмены препаратов After withdrawal of substances	0.86 ± 0.19	1.38 ± 0.12**	1.37 ± 0.11**	1.37 ± 0.06**
Агрегация эритроцитов / Erythrocyte aggregation				
Исходный уровень / At baseline	45 ± 0.04	42 ± 0.06	43 ± 0.08	44 ± 0.12
Период после нагрузочного теста After the stress test				
1	47 ± 0.05*	44 ± 0.08#	43 ± 0.09#	42 ± 0.11#
2	46 ± 0.02*	40 ± 0.03**	37 ± 0.05**	36 ± 0.08**
3	48 ± 0.09*	37 ± 0.11**	32 ± 0.13**	30 ± 0.07**
4	44 ± 0.08	35 ± 0.13**	29 ± 0.09**	26 ± 0.13**
После отмены препаратов After withdrawal of substances	46 ± 0.17	35 ± 0.12**	33 ± 0.04**	30 ± 0.06**

П р и м е ч а н и я : ЭФПЭ – электрофоретическая подвижность эритроцитов; РЖ – рыбий жир; ОРЖ-3000 – озонированный рыбий жир, озонидное число – 3000; ОРЖ-1500 – озонированный рыбий жир, озонидное число – 1500.

*Статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) по сравнению с контрольной группой; # статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) по сравнению с интактными животными (исходный уровень).

N o t e : EEM – erythrocyte electrophoretic mobility; FO – fish oil; OFO-3000 – ozonated fish oil, ozonide value is 3000; OFO-1500 – ozonated fish oil, ozonide value is 1500.

*Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared to the control group; # statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared to intact animals (at baseline).

АТФ в эритроцитах при всех видах воздействия. Вероятно, уменьшение концентрации 2,3-ДФГ произошло на фоне повышенного синтеза АТФ в прямом пути гликолиза.

Регистрация динамики ЭФПЭ выявила ее повышение в опытных группах по сравнению с группой контроля, что сопровождалось снижением степени агрегации эритроцитов (табл. 2). Выраженные изменения ЭФПЭ были получены в группах при использовании РЖ и ОРЖ-3000 начиная со 2-го нагрузочного теста и на последующих этапах; в группе ОРЖ-1500 – с 1-го нагрузочного теста. Уменьшение агрегации регистрировалось в группе РЖ и ОРЖ со 2-го нагрузочного теста, тогда как в контрольной группе наблюдалось увеличение агрегации после 1–3-го нагрузочного теста.

Измерение концентрации МДА в эритроцитах выявило рост показателя во всех исследуемых группах с максимальным увеличением в ходе 2 и 3-го нагрузочных тестов с последующим снижением показателя (табл. 3). Использование ОРЖ-1500 привело к менее выраженному росту МДА

DISCUSSION

The data obtained demonstrate an increase in lipid peroxidation (LPO) during intense physical activity, which causes hyperoxia of muscle tissue and overproduction of reactive oxygen species. Activation of LPO disrupts the lipid bilayer of erythrocytes [18]. LPO enhancement occurs due to the influence of adrenaline [19], which causes the activation of phospholipase A_2 and, accordingly, an increase in the content of lysoforms. In addition, the decrease in the ATP concentration revealed in the study can induce a decrease in the activity of protein kinases. Alteration of protein phosphorylation-dephosphorylation cycles leads to derangement of the lipid matrix. Accumulation of Ca^{2+} , activation of Ca-dependent phospholipase A_2 and accumulation of lysosomal fractions of phospholipids and free fatty acids take place [18]. An increase in the intracellular content of free calcium ions activates calpain-cysteine endopeptidase and caspase-3, which leads to the transfer of phosphatidylserine to the outer layer of the erythrocyte membrane [20], and lysoforms, having high affinity for

Таблица 3. Динамика концентрации малонового диальдегида эритроцитов в исследуемых группах, нмоль/мл
Table 3. Dynamics of the malondialdehyde concentration in erythrocytes in the study groups, nmol/ml

Этап Stage	Контроль Control groups	РЖ FO	ОРЖ-3000 OFO 3000	ОРЖ-1500 OFO 1500
Исходный уровень / At baseline	1.938 ± 0.143	1.946 ± 0.385	1.951 ± 0.124	1.943 ± 0.160
После нагрузочного теста After the stress test				
1	2.100 ± 0.051	2.225 ± 0.084*	2.388 ± 0.231*	2.101 ± 0.201
2	3.268 ± 0.1378*	2.880 ± 0.536*	3.393 ± 0.050*	2.180 ± 0.091**
3	2.859 ± 0.072*	2.427 ± 0.064**	3.247 ± 0.032**	2.467 ± 0.028**
4	2.382 ± 0.130*	2.361 ± 0.133*	2.585 ± 0.080*	2.241 ± 0.050*
После отмены препаратов After withdrawal of substances	2.322 ± 0.066*	2.110 ± 0.062*	2.489 ± 0.068	1.796 ± 0.150**

Примечания: РЖ – рыбий жир; ОРЖ-3000 – озонированный рыбий жир, озонидное число – 3000; ОРЖ-1500 – озонированный рыбий жир, озонидное число – 1500.

**Статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) по сравнению с контрольной группой; * статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) по сравнению с интактными животными (исходный уровень).

Note: FO – fish oil; OFO-3000 – ozonated fish oil, ozonide value is 3000; OFO-1500 – ozonated fish oil, ozonide value is 1500.

* Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared to the control group; * statistically significant differences ($p \leq 0.05$) compared to intact animals (baseline).

по сравнению другими исследуемыми группами как контроля, так и опытными. После отмены препарата в данной группе регистрировалось понижение концентрации МДА ниже исходных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные демонстрируют усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при интенсивной физической нагрузке, что вызывает гипероксию мышечных тканей и избыточное образование активных форм кислорода. Активация процессов ПОЛ нарушает липидный бислой эритроцитов [18]. Усиление процессов ПОЛ происходит под действием адреналина [19], который вызывает активацию фосфолипазы A_2 и, соответственно, рост содержания лизоформ. Кроме того, отмеченное в исследовании снижение концентрации АТФ может индуцировать уменьшение активности протеинкиназ. Нарушение процессов фосфорилирования-дефосфорилирования белков приводит к дезорганизации липидного матрикса. Происходит накопление Ca^{2+} , активация Са-зависимой фосфолипазы A_2 и аккумуляция лизофракций фосфолипидов и свободных жирных кислот [18]. Повышение внутриклеточного содержания свободных ионов кальция активирует калпаинцистеиновую эндопептидазу и каспазу 3, что приводит к переносу фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны эритроцита [20], а лизоформы, обладая высоким сродством к интегральным белкам, вытесняют другие липиды из белкового окружения, вызывая пере-

essential proteins, displace other lipids from the protein environment, causing redistribution of membrane proteins, which ultimately changes the erythrocyte membrane surface charge and, consequently, EEM.

Changes in EEM affect the rheological properties of blood. A decrease in EEM during physical exertion leads to an increase in erythrocyte aggregation, which affects microcirculation, and blood viscosity, that plays a significant role in the manifestation of tissue hypoxia [21]. Under these conditions, 2,3-DPG, an allosteric regulator of hemoglobin affinity for oxygen can make a certain contribution to the alleviation of tissue hypoxia. In our experiments, an increase in the concentration of 2,3-DPG was noted after the 2nd–3rd stress test, which determines a decrease in Hb- O_2 affinity and promotes the release of O_2 from the Hb molecule in tissues.

When discussing the mechanisms of FO, OFO action during intense physical activity, it is necessary to focus on several results obtained in the study.

The use of FO and, to a greater extent, OFO-1500, during physical activity caused a statistically significant decrease in MDA in erythrocytes compared to the control group. PUFAs are structural and functional components of cell membranes [22], which can promote the erythrocyte membrane recovery and modulate lipid peroxidation during physical activity. It has been shown that oral administration of n-3 PUFAs leads to the integration of PUFAs in the composition of phospholipids of erythrocyte membranes [23], changing the charac-

распределение мембранных белков, в итоге меняется заряд мембраны эритроцитов и, следовательно, ЭФПЭ.

Изменение ЭФПЭ влияет на реологические свойства крови. Отмеченное при физической нагрузке снижение ЭФПЭ ведет к повышению агрегации эритроцитов, которая оказывает влияние на микроциркуляцию, увеличивает вязкость крови, что играет существенную роль в проявлениях тканевой гипоксии [21]. В этих условиях определенный вклад в нивелирование возникающей гипоксии тканей может вносить 2,3-ДФГ, аллостерический регулятор средства гемоглобина к кислороду. В наших экспериментах отмечено увеличение концентрации 2,3-ДФГ после 2–3-го нагрузочного теста, что определяет снижение Hb-O₂ афинности и способствует высвобождению O₂ из молекулы Hb в тканях.

Обсуждая механизмы действия РЖ, ОРЖ при повышенной физической активности, следует остановиться на нескольких полученных в ходе работы результатах.

Использование при физических нагрузках РЖ и, в большей степени, ОРЖ-1500 вызывало статистически значимое снижение МДА в эритроцитах по сравнению с контрольной группой. ПНЖК являются структурными и функциональными компонентами клеточных мембран [22], что может способствовать восстановлению мембраны эритроцитов и нивелировать ПОЛ при физической активности. Показано, что пероральный прием n-3 ПНЖК приводит к включению ПНЖК в состав фосфолипидов мембран эритроцитов [23], изменяя характеристики мембран эритроцитов, что вызывает снижение их агрегации [24]. По всей видимости, сходным образом действуют и средне- и короткоцепочечные ЖК, которые образуются в результате озонлиза. При этом действие ОЖР-1500 определяет наименьшее окислительное действие на фоне физической нагрузки по сравнению со всеми исследуемыми группами, тогда как использование ОРЖ-3000 приводит к наибольшему процессу липопероксидации эритроцитов. Вероятно, полученный эффект зависит от концентрации озонидов: малые концентрации озонидов стимулируют процесс антиоксидантной защиты, а большие концентрации – усугубляют окисление клеток [16].

При использовании РЖ и, в большей степени, ОРЖ было отмечено увеличение концентрации АТФ по сравнению с контрольной группой. Озону присущ гипогликемический эффект, обуслов-

teristics of the latter, which causes a decrease in their aggregation [24]. Apparently, medium- and short-chain fatty acids, which are formed as a result of ozonolysis, operate in a similar way. At the same time, the effect of OFO-1500 determines the minimal oxidative effect during physical activity compared to all the studied groups, while the use of OFO-3000 leads to the maximal lipid peroxidation in erythrocytes. Probably, the obtained effect depends on the concentration of ozonides: low concentrations of ozonides stimulate antioxidant defence, and high concentrations aggravate oxidation in cells [16].

When using FO and, to a greater extent, OFO, an increase in the ATP concentration was noted compared to the control group. Ozone has a hypoglycemic effect due to the activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Thus, glucose absorption from blood plasma by erythrocytes increases [25], which, apparently, contributes to a growth of the intensity of glycolysis in erythrocytes. It is known that an increase in the ATP concentration in erythrocytes leads to phosphorylation of spectrin, ankyrin and protein 4.1R (erythrocyte membrane protein band 4.1), weakening protein-protein interactions. Phosphorylation of cytoskeletal proteins increases membrane deformability [26]. Probably, in the use of preparations of FO, the deformability of erythrocyte membranes increases. High deformability of erythrocytes facilitates blood flow, which contributes to better microcirculation and tissue oxygenation. In addition, it is known that deformities occur at the level of the microcirculatory bed; erythrocytes release ATP and cause an NO-dependent enhancement of blood flow [27]. The increase in EEM and the decrease in erythrocyte aggregation amid the FO and OFO administration also contribute to the recovery of microcirculation.

CONCLUSION

It was found that the use of FO and OFO effectively modulated processes in erythrocytes caused by the extreme physical exertion. Comparison of preparations of FO showed that the effect of OFO-1500 caused the most pronounced decrease in lipid peroxidation, increased glycolysis and decreased aggregation of erythrocytes during in the weight-loaded forced swimming test compared to FO and OFO-3000.

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

ленный активацией глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. При этом усиливается поглощение эритроцитами глюкозы из плазмы крови [25], что, по всей видимости, способствует повышению интенсивности гликолиза в эритроцитах. Известно, что повышение содержания АТФ в эритроцитах ведет к фосфорилированию спектрина, анкирина и белка полосы 4.1, ослабляя белок-белковые взаимодействия. Фосфорилирование белков цитоскелета увеличивает деформабельность мембран [26]. Вероятно, на фоне применения препаратов РЖ повышается деформируемость мембран эритроцитов. Высокая деформируемость эритроцитов облегчает кровоток, что способствует лучшей микроциркуляции и оксигенации тканей. Кроме того, известно, что при деформации на уровне микроциркуляторного русла эритроциты высвобождают АТФ и вызывают NO-зависимое увеличение кровотока [27].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Armstrong M.E.G., Green J., Reeves G.K. et al. Frequent physical activity may not reduce vascular disease risk as much as moderate: Large prospective study of women in the United Kingdom // *Circulation*. 2015;131(8):721-729. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010296.
2. Гостюхина А.А., Замощина Т.А., Светлик М.В. и др. Поведенческая активность крыс в «открытом поле» после световой или темновой деприваций и физического переутомления // *Бюллетень сибирской медицины*. 2016;15(3):16-23. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-16-23.
3. Григорьева М.Е., Сороколетов С.М., Коробовский А.В., Ляпина Л.А. Текучесть крови при физических нагрузках разного вида // *Спортивная медицина: наука и практика*. 2022;12(4):45-58. DOI: 10.47529/2223-2524.2022.4.3.
4. Medeiros-Lima D.J., Mendes-Ribeiro A.C., Brunini T.M.C. et al. Erythrocyte nitric oxide availability and oxidative stress following exercise // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2017;65(3):219-228. DOI: 10.3233/CH-16162.
5. Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А., Момот Т.В. и др. Оценка изменений липидного состава плазмы крови и мембран эритроцитов студентов в условиях учебной нагрузки и их профилактика // *Гигиена и санитария*. 2020;99(2):187-192. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-2-187-192.
6. Круглова И.В., Давидян О.В. Оценка эффективности применения Омега-3-полиненасыщенных жирных кислот у спортсменов в комплексе восстановительных мероприятий // *Вопросы диетологии*. 2017;7(3):20-27. DOI: 10.20953/2224-5448-2017-3-20-27.
7. Siener R., Altheld B., Terjung B. et al. Change in the fatty acid pattern of erythrocyte membrane phospholipids after oral supplementation of specific fatty acids in patients with gastrointestinal diseases // *Eur.*

Восстановлению микроциркуляции также способствует выявленное при действии РЖ и ОРЖ повышение ЭФПЭ и снижение агрегации эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что использование РЖ и ОРЖ эффективно нивелировало процессы в эритроцитах, обусловленные развитием стресса, вызванного у крыс моделированием физической нагрузки «до отказа». Сравнение препаратов РЖ показало, что действие ОРЖ-1500 вызывало наиболее выраженное снижение липопероксидации, усиление гликолиза и снижение агрегации эритроцитов при физической нагрузке «до отказа» по сравнению с РЖ и ОРЖ-3000.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

1. Armstrong M.E.G., Green J., Reeves G.K. et al. Frequent physical activity may not reduce vascular disease risk as much as moderate: Large prospective study of women in the United Kingdom. *Circulation*. 2015;131(8):721-729. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010296.
2. Gostyukhina A.A., Zamoshchina T.A., Svetlik M.V. et al. Behavioral activity of rats in the «open field» after the light and dark deprivation and physical exhaustion. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016;15(3):16-23. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-16-23. (In Russ.)
3. Grigorjeva M.E., Sorokoletov S.M., Korobovskiy A.V., Lyapina L.A. Blood fluidity during physical exertion of various types. *Sports medicine: research and practice*. 2022;12(4):45-58. DOI: 10.47529/2223-2524.2022.4.3. (In Russ.)
4. Medeiros-Lima D.J., Mendes-Ribeiro A.C., Brunini T.M. et al. Erythrocyte nitric oxide availability and oxidative stress following exercise. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2017;65(3):219-228. DOI: 10.3233/CH-16162.
5. Kushnerova N.F., Rakhmanin Yu.A., Momot T.V. et al. Assessment of changes in the lipid composition of blood plasma and erythrocyte membranes in students under study load and their prevention. *Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2020;99(2):187-192. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-2-187-192. (In Russ.)
6. Kruglova I.V., Davidyan O.V. Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids in a complex of recovery measures for athletes. *Vopr. Dietol. (Nutrition)*. 2017;7(3):20-27. DOI: 10.20953/2224-5448-2017-3-20-27. (In Russ.)
7. Siener R., Altheld B., Terjung B. et al. Change in the fatty acid pattern of erythrocyte membrane phospholipids after oral supplementation of specific fatty acids in patients with gastrointestinal diseases. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2010;64(4):410-418. DOI: 10.1038/ejcn.2009.151.

- J. Clin. Nutr. 2010;64(4):410-418. DOI: 10.1038/ejcn.2009.151.
8. Zaloga G.P. Narrative review of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation upon immune functions, resolution molecules and lipid peroxidation // *Nutrients*. 2021;13(2):662. DOI: 10.3390/nu13020662.
 9. Joumard-Cubizolles L., Lee J.C., Vigor C. et al. Insight into the contribution of isoprostanooids to the health effects of omega 3 PUFAs // *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2017;133:111-122. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2017.05.005.
 10. Stupin M., Kibel A., Stupin A. et al. The physiological effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) intake and exercise on hemorheology, microvascular function, and physical performance in health and cardiovascular diseases; is there an interaction of exercise and dietary n-3 PUFA intake? // *Front. Physiol*. 2019;10:1129. DOI: 10.3389/fphys.2019.01129.
 11. Criegee R. Mechanism of ozonolysis // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 1975;14(11):745-752.
 12. Перетягин С.П., Гордеев А.С., Соловьева А.Г. и др. Влияние низкочастотного электроимпульсного воздействия на физико-химические показатели и биологическую активность крема, содержащего активные формы кислорода // *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2017;4(4):57-64.
 13. Дерюгина А.В., Ошевенский Л.В., Таламанова М.Н. и др. Изменение электрокинетических и биохимических характеристик эритроцитов при действии электромагнитных волн терагерцевого диапазона // *Биофизика*. 2017;62(6):1108-1113.
 14. Дерюгина А.В., Грачева Е.А. Эффективность цитофлавина при экспериментальной артериальной гипертензии // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020;83(2):8-11. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-8-11.
 15. Виноградова И.Л., Багрянцева С.Ю., Дервиз Г.В. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах // *Лабораторное дело*. 1980;7:424-426.
 16. Дерюгина А.В., Бояринов Г.А., Симутис И.С. и др. Коррекция озонированной эритроцитарной массой метаболических показателей эритроцитов и структуры миокарда после острой кровопотери // *Цитология*. 2018;60(2):89-95. DOI: 10.31116/tsitol.2018.02.03.
 17. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Медицинские лабораторные анализы: справочник. Изд. 3-е, испр. и доп. М.: Триада-Х, 2007. 298 с.
 18. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы // *Бюллетень сибирской медицины*. 2006;5(2):62-69. DOI: 10.20538/1682-0363-2006-2-62-69.
 19. Тапберген С.О., Советов Б.С., Тапберген А.Т., Ганн Э. Метаболические эффекты сочетанного введения комплекса аденозин и аденозинмонофосфат при гиперadreналинемии // *Наука и здравоохранение*. 2017;2:92-104.
 20. Arashiki N., Takakuwa Y. Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: implications for erythrocyte functions // *Curr. Opin. Hematol*. 2017;24(3):167-172 DOI: 10.1097/MOH.0000000000000326.
 8. Zaloga G.P. Narrative review of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation upon immune functions, resolution molecules and lipid peroxidation. *Nutrients*. 2021;13(2):662. DOI: 10.3390/nu13020662.
 9. Joumard-Cubizolles L., Lee J.C., Vigor C. et al. Insight into the contribution of isoprostanooids to the health effects of omega 3 PUFAs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2017;133:111-122. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2017.05.005.
 10. Stupin M., Kibel A., Stupin A. et al. The physiological effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) intake and exercise on hemorheology, microvascular function, and physical performance in health and cardiovascular diseases; is there an interaction of exercise and dietary n-3 PUFAs intake? *Front. Physiol*. 2019;10:1129. DOI: 10.3389/fphys.2019.01129.
 11. Criegee R. Mechanism of ozonolysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 1975;14(11):745-752.
 12. Peretyagin S.P., Gordetsov A.S., Soloveva A.G. et al. The influence of low-frequency electropulse exposition on the physicochemical parameters and biological activity of a cream containing reactive oxygen species. *Bioradicals and Antioxidants*. 2017;4(4):57-64. (In Russ.)
 13. Deryugina A.V., Oshevskiy L.V., Talamanova M.N. et al. Changes in electrokinetic and biochemical characteristics in erythrocytes under the action of terahertz electromagnetic waves. *Biophysics*. 2017;62(6):1108-1113. (In Russ.)
 14. Deryugina A.V., Gracheva E.A. Efficacy of cytoflavin administration in rats with experimental arterial hypertension. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2020;83(2):8-11. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-8-11. (In Russ.)
 15. Vinogradova I.L., Bagryantseva S.Yu., Derviz G.V. Method for the simultaneous determination of 2,3-DPG and ATP in erythrocytes. *Lab Science*. 1980;7:424-426. (In Russ.)
 16. Deryugina A.V., Boyarinov G.A., Simutis I.S. et al. Correction by ozonated erythrocyte mass of erythrocyte metabolic parameters and myocardial structure after acute blood loss. *Tsitologiya*. 2018;60(2):89-95. DOI: 10.31116/tsitol.2018.02.03. (In Russ.)
 17. Lifshitz V.M., Sidelnikova V.I. (2007). *Medical Laboratory Tests: reference book*. 3rd ed., revis. and enlarg. Moscow: Triada-X. 298 p.
 18. Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A. et al. Molecular disturbances of erythrocytes membrane during pathology of different genesis are the typical reaction of the organism: contours of the problem. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2006;5(2):62-69. DOI: 10.20538/1682-0363-2006-2-62-69. (In Russ.)
 19. Tapbergenov S.O., Sovetov B.S., Tapbergenov A.T., Hann E. Metabolic effects of combined integration of adenosine and adenosine monophosphate in hyperadenolemia. *Science and Healthcare*. 2017;2:92-104. (In Russ.)
 20. Arashiki N., Takakuwa Y. Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: implications for erythrocyte functions. *Curr. Opin. Hematol*. 2017;24(3):167-172 DOI: 10.1097/MOH.0000000000000326.
 21. Muravev A.V., Maymistova A.A., Tikhomirova I.A. et al. Role of protein kinases of human red cell membrane in

21. Муравьев А.В., Маймистова А.А., Тихомирова И.А. и др. Роль протеинкиназ мембраны эритроцитов человека в изменениях их деформируемости и агрегации // Физиология человека. 2012;38(2):94-100.
22. Колупаева Е.А., Беляева Л.М. Современный взгляд на рыбий жир // Медицинские новости. 2013;10:40-42.
23. Barceló-Coblijn G., Murphy E.J., Othman R. et al. Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acid // Am. J. Clin. Nutr. 2008;88(3):801-809. DOI: 10.1093/ajcn/88.3.801.
24. Ho M., Maple C., Bancroft A. et al. The beneficial effects of omega-3 and omega-6 essential fatty acid supplementation on red blood cell rheology // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 1999;61:13-17. DOI: 10.1054/plef.1999.0066.
25. Исхакова Р.Р., Сайфуллина Ф.Р. Озонотерапия в офтальмологии // Казанский медицинский журнал. 2013;94(4):510-516.
26. Yamaguchi T., Fukuzaki S. ATP effects on response of human erythrocyte membrane to high pressure // Biophys. Physicobiol. 2019;16:158-166. DOI: 10.2142/biophysico.16.0_158.
27. Gonzalez-Alonso J., Olsen D. B., Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP // Circ. Res. 2002;91(11):1046-1055. DOI: 10.1161/01.RES.0000044939.73286.E2.
- deformability and aggregation changes. *Human Physiology*. 2012;38(2):94-100. (In Russ.)
22. Kolupaeva E.A., Belyaeva L.M. Modern view of fish oil. *Meditinskije novosti*. 2013;10:40-42. (In Russ.)
23. Barceló-Coblijn G., Murphy E.J., Othman R. et al. Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;88(3):801-809. DOI: 10.1093/ajcn/88.3.801.
24. Ho M., Maple C., Bancroft A. et al. The beneficial effects of omega-3 and omega-6 essential fatty acid supplementation on red blood cell rheology. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 1999;61:13-17. DOI: 10.1054/plef.1999.0066.
25. Iskhakova R.R., Sayfullina F.R. Ozone therapy in ophthalmology. *Kazan Medical Journal*. 2013;94(4):510-516. (In Russ.)
26. Yamaguchi T., Fukuzaki S. ATP effects on response of human erythrocyte membrane to high pressure. *Biophys. Physicobiol.* 2019;16:158-166. DOI: 10.2142/biophysico.16.0_158.
27. Gonzalez-Alonso J., Olsen D. B., Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ. Res.* 2002;91(11):1046-1055. DOI: 10.1161/01.RES.0000044939.73286.E2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дерюгина Анна Вячеславовна – д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия. ORCID: 0000-0001-8812-8559.

Ястребов Павел Викторович – младший научный сотрудник кафедры физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия. ORCID: 0009-0008-0443-9527.

Бояринов Геннадий Андреевич – д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; профессор кафедры анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», Нижний Новгород, Россия. ORCID: 0000-0002-7557-0564.

Старателева Юлия Андреевна – канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия. ORCID: 0009-0006-5234-5985.

ABOUT THE AUTHORS

Anna V. Deryugina – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head, Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia. ORCID: 0000-0001-8812-8559.

Pavel V. Yastrebov – Junior Researcher, Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia. ORCID: 0009-0008-0443-9527.

Gennady A. Boyarinov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; Professor, Department of Anesthesiology, Resuscitation and Transfusiology, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia. ORCID: 0000-0002-7557-0564.

Julia A. Starateleva – Cand. Sci. (Biol.), Senior Lecturer, Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia. ORCID: 0009-0006-5234-5985.