УДК 611.127:612.396+613.735:616-092.4

ПРИМЕНЕНИЕ РИБОЗЫ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИНТЕНСИВНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

Корнякова В. В.[1], Конвай В. Д.[2]

[1]*ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», Омск, Россия (644043 , г. Омск, ул. Ленина, 12), e-mail: rector@omsk-osma.ru*
[2]*ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина», Омск, Россия (644008 , г. Омск, Институтская пл., 2), e-mail: adm@omgau.ru*

Изучено состояние антиоксидантной системы в кардиомиоцитах крыс при физических нагрузках различной интенсивности, которые моделировали методом вынужденного плавания с грузом, равным 10 % от массы тела. Установлено, что интенсивные физические нагрузки приводят к развитию лактоацидоза, усиливающего катаболизм пуринов до урата. Это явление сопряжено с чрезмерной продукцией ксантиноксидазой активных кислородных метаболитов, истощающих антиоксидантную систему, усиливающих липопероксидацию мембранных структур кардиомиоцитов с последующим нарушением их функции. Пероральное введение крысам D-рибозы в дозе 0,1 г/кг массы тела снижает катаболизм пуринов до урата, предотвращает истощение в кардиомицитах антиоксидантной системы и оказывает мембранопротекторное действие. Полученные данные могут быть положены в основу новых способов диагностики и коррекции нарушений функции сердечной мышцы при интенсивных физических нагрузках.

Ключевые слова: физические нагрузки, кардиомиоциты, D-рибоза.

RIBOSE APPLICATION FOR CORRECTION OF VIOLATION OF FUNCTION CARDIOMYOCYTES OF RATS IN THE CONDITIONS OF INTENSIVE PHYSICAL ACTIVITIES

Kornyakova V. V. [1], Conway V. D. [2]

[1]*Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia (644043, Omsk , avenue of Lenin, 12), e-mail: rector@omsk-osma.ru*
[2]*Omsk state agrarian university of P. A. Stolypin, Omsk, Russia (644008, Omsk, Institutskaya square, 2), e-mail: adm@omgau.ru*

The condition of antioxidant system cardiomyocytes in rat under intense physical activities, which are modeled by the method forced swimming with a load equal to 10% of body weight. It established that intense physical activity lead to the development of lactic acidosis, catabolism of purines to the reinforcing urate. This phenomenon is associated with excessive production of reactive oxygen metabolites, xanthine oxidase depletes antioxidant system, enhances lipid peroxidation of membrane structures of cardiomyocytes with subsequent violation of their functions. Oral administration of D-ribose to rats at a dose of 0.1 g/kg of body weight reduces the catabolism of purines down to urate, prevents the depletion of antioxidant systems of cardiomyocytes. The data obtained can be used as the basis for new methods of diagnosis and correction of functional disorders of the heart muscle under intense physical activities.

Keywords: physical activity, cardiomyocytes, D-ribose.

Введение

Интенсивные физические нагрузки, сопутствующие спортивной практике, военному делу и некоторым видам трудовой деятельности, нередко приводят к нарушению метаболизма кардиомиоцитов с последующим нарушением их функции [4,5]. Механизм этого явления до конца не выяснен, что лимитирует разработку новых эффективных профилактических и лечебных мероприятий. Оно может быть связано с острым нарушением метаболизма пуринов, описанном ранее на модели тяжелой гипоксии [2].

Цель исследования

В настоящей работе предпринята попытка объяснить метаболические и функциональные нарушения в кардиомиоцитах при чрезмерных физических нагрузках с позиций теории острого нарушения метаболизма пуринов и предпринять патогенетически обоснованную их коррекцию.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГОУ ВПО «Омской государственной медицинской академии» на 55 белых аутбредных крысах-самцах массой 240±20 г. Исследования проводились в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609 EEC). Исследуемые животные были разделены на 4 группы. Первую из них составляли интактные крысы (И, n = 10). Во вторую группу вошли животные с оптимальным режимом физической нагрузки (ОН, n = 15), подвергавшиеся принудительному плаванию с грузом, равным 10 % от массы тела, в течение пяти недель эксперимента через день. На крысах третьей группы (ИН, n = 15) моделировали интенсивные физические нагрузки принудительным плаванием с грузом, равным 10% от массы тела, в течение первых трех недель эксперимента через день, последние две недели – ежедневно. Крысы четвертой группы (ИН+Р, n = 15) подвергались плаванию по схеме ИН, но на последней неделе эксперимента они получали ежедневно перорально D-рибозу (Sci Fit, США) до и после принудительного плавания с грузом в дозе 0,1 г/кг массы тела. Критерием ограничения времени плавания у крыс второй, третьей и четвертой экспериментальных групп служило опускание животного на дно бассейна, после которого оно не могло самостоятельно подняться на поверхность.

Плавание крыс проводили в бассейне диаметром 45 см, глубиной 60 см, с температурой воды 28-30 ºС, а окружающего воздуха – 19-21 ºС. По окончании эксперимента у них забирали кровь, в плазме которой определяли концентрацию лактата, пирувата и урата унифицированными методами исследования. Из сердца крыс готовили 20 % гомогенаты на 0,15 *М* растворе хлорида калия в стеклянном гомогенизаторе Поттера при температуре 0–2 ˚С. В кардиомиоцитах определяли содержание малонового диальдегида (МДА) – по реакции с тиобарбитуровой кислотой, глутатиона (G-SH) – реакцией с 5.5 – дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой, активность супероксиддисмутазы (СОД) – по Т. В. Сирота [6], каталазы (КАТ) – по М. А. Королюк с соавт. [3], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) – по Д. В. Черданцеву [7], глутатионредуктазы (ГлР) и глутатионпероксидазы (ГлПО) – по С. Н. Власовой с соавт. [1].

Для биохимических исследований использовали реактивы фирм «Ольвекс» (Россия), «Hospitex» (Швейцария), «Randox» (Великобритания). Результаты исследования обработаны статистически с помощью программы "SPSS 13.0". Статистическая обработка

осуществлялась с использованием t-критерия и непараметрического критерия Манна – Уитни. Достаточным считался уровень значимости $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что уже при оптимальных физических нагрузках усиливается анаэробный гликолиз, что подтверждается нарастанием лакцидемии. У крыс группы ОН она превышает соответствующий показатель у интактных крыс на 40,0 % (P=0,002). При этом резкое закисление тканей не происходит, так как лактат успешно реутилизируется в печени в углеводы в реакциях глюконеогенеза. Эти процессы сопровождаются лишь умеренной уремией. У крыс группы ОН концентрация мочевой кислоты на 38,1 % (P=0,06) выше по сравнению с аналогичным показателем у животных группы И.

Умеренное усиление катаболизма пуринов, оцениваемое нами по тенденции к увеличению в крови крыс группы ОН концентрации мочевой кислоты, не приводит к чрезмерной выработке активных кислородных метаболитов и липопероксидации мембранных структур в кардиомиоцитах. Содержание МДА в этом органе на 29,5 % (P=0,08) превышает аналогичный параметр у интактных крыс. При этом ОН приводят лишь к незначительному снижению в кардиомиоцитах содержания глутатиона (на 16,0 %; P=0,06) и активности ферментов антиоксидантной защиты: СОД (на 12,8 %; P=0,21), ГлПО (на 14,2 %; P=0,10), ГлР (6,1 %; P=0,41), Г-6-ФДГ (на 18,6 %; P=0,08) по отношению к аналогичным показателям у интактных крыс (таблица 1).

Таблица 1

Показатели антиоксидантной системы и состояния перекисного окисления липидов в кардиомиоцитах крыс интактных (И), подвергнутых оптимальным нагрузкам (ОН), интенсивным нагрузкам (ИН) и введению D-рибозы (ИН+Р), M±m, n = 10-15

Показатели	И	ОН	ИН	ИН+Р
Супероксиддисмутаза, Ед/мг белка	19,5±1,9	17,0±1,2	13,3±1,1 и, он	15,3±0,7
Каталаза, мкЕД/г белка	1,16±0,06	1,38±0,46	0,93±0,12	1,33±0,24
Малоновый диальдегид, мкмоль/мг белка	7,21±0,96	9,34±0,26	10,18±0,42 и	8,09±0,57 ин
Глутатионпероксидаза, МЕ/мг белка	954±54	819±62	649±39 и, он	813±52 ин
Глутатион, ммоль/г белка	39,9±2,0	33,5±1,7	26,4±2,4 и, он	36,0±1,8 ин

Глутатионредуктаза, МЕ/мг белка	54,4±2,9	51,1±2,2	44,1±0,5 и, он	53,6±2,4 ин
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, МЕ/г белка	3,54±0,22	2,88±0,26	1,94±0,33 и, он	3,56±0,52 ин

Примечание: и – различия статистически значимы по сравнению с крысами интактными, он – с подвергнутыми ОН, ин – с подвергнутыми ИН.

Интенсивные физические нагрузки сопровождаются более выраженной интенсификацией реакций анаэробного гликолиза, о чем свидетельствует резкое возрастание в плазме крови крыс группы ИН концентрации лактата [на 83,5% (P=0,0001) и 31,1 % (P=0,003) по сравнению с аналогичными параметрами у животных групп И и ОН соответственно]. Развившийся в организме крыс группы ИН лактоацидоз приводит к интенсивному катаболизму пуриновых мононуклеотидов до гипоксантина и ксантина.

Известно, что в условиях гипоксии усиливается катаболизм АТФ до АМФ в результате реакции, катализируемой аденилаткиназой, что приводит к увеличению уровня АМФ. Дальнейшему катаболизму последнего, наряду с увеличением его уровня, способствует то, что в условиях закисления среды лактатом активируются ферменты катаболизма АМФ: АМФ-аминогидролаза и аденозиндезаминаза [8]. Вследствие этого АМФ расщепляется до инозина, который после отщепления рибозы превращается в гипоксантин. Это вещество способно метаболизироваться двумя путями. При взаимодействии его с фосфорибозилдифосфатом в результате реакции, катализируемой гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазой, образуется инозинмонофосфат, превращающийся в дальнейшем последовательно в аденилосукцинат и АМФ. Этот путь называется реутилизацией гипоксантина. Для него необходим фосфорибозилдифосфат, вырабатываемый из рибозо-5-фосфата, синтезируемого в пентозном цикле. При интенсивных физических нагрузках последний тормозится вследствие недостаточной обеспеченности кардиомиоцитов глюкозой и торможением активности Г-6-ФДГ. Это приводит к торможению выработки фосфорибозилдифосфата, а вслед за этим – реутилизации гипоксантина. Последний накапливается в тканях и начинает превращаться по второму пути – окислению ксантиноксидазой до мочевой кислоты, сопряженному с продукцией активных кислородных метаболитов. Уровень урата в крови крыс группы ИН превышает аналогичный показатель у животных группы И и ОН соответственно на 97,9 % (P= 0,0001) и 43,3 % (P= 0,011).

Развившийся катаболизм гипоксантина и ксантина до урата сопряжен с усиленной генерацией ксантиноксидазой активных кислородных метаболитов, усиливающих липопероксидацию ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран кардиомиоцитов. Содержание МДА в клетках сердца крыс группы ИН превышает аналогичный показатель у

интактных крыс на 41,2 % (P=0,034), а у животных группы оптимальных физических нагрузок – 9 % (P=0,16). В развитии этого явления важную роль играет торможение функции ферментов антиперекисной защиты.

Активность СОД и КАТ в кардиомиоцитах крыс группы ИН снижена по сравнению с аналогичными показателями у животных групп И соответственно на 31,8 % (P=0,019) и 19,8 % (P=0,14), а по сравнению с крысами, подвергнутыми ОН – на 21,8 % (P=0,03) и 32,6 % (P=0,75). Это приводит к недостаточно эффективной инактивации перекиси водорода, способствуя, таким образом, чрезмерной липопероксидации мембранных структур кардиомиоцитов. Об усилении ее свидетельствует отмеченное выше увеличение в кардиомиоцитах содержания МДА.

Усилению перекисного окисления липидов способствует также снижение в кардиомиоцитах крыс группы ИН активности ГлПО [на 32,0 % (P=0,001) по сравнению с животными группы И и на 20,8 % (P=0,036) по сравнению с группой ОН]. Тем не менее, in vivo активность данного энзима не только не тормозится, но даже усиливается. Это приводит к чрезмерному расходованию ее второго субстрата – G-SH. Содержание его в кардиомиоцитах крыс группы ИН снижено на 33,8 % по сравнению с уровнем этого показателя у интактных животных (P=0,007) и на 21,2 % – по сравнению с крысами, повергнутыми ОН (P=0,028).

Определенный вклад в снижение содержания G-SH в кардиомиоцитах крыс группы ИН вносит и недостаточно эффективное восстановление образующегося в глутатионпероксидазной реакции глутатиондисульфида. Активность ГлР, катализирующей эту реакцию, снижена в кардиомиоцитах крыс группы ИН на 18,9 % (P=0,001) и 13,7 % (P=0,023) по сравнению с аналогичными показателями у животных групп И и ОН соответственно. К торможению ГлР in vivo может привести и недостаточная обеспеченность миокарда НАДФ·H_2. Торможение генерации последнего в реакциях пентозного цикла способно вызвать угнетение активности Г-6-ФДГ, ключевого фермента окислительной ветви этого метаболического пути. В кардиомиоцитах крыс группы ИН она снижена на 45,2 % (P=0,003) и 32,6 % (P=0,046) по сравнению с аналогичными показателями в группах И и ОН соответственно. Эти изменения приводят к развитию у животных группы ИН утомления, о чем свидетельствует статистически значимое снижение к окончанию эксперимента времени активного плавания (на 65,8 % по сравнению с крысами группы ОН; P=0,0001).

Исходя из ключевой роли повышения уровня гипоксантина в развитии метаболических нарушений в кардиомиоцитах нами предпринята попытка предотвращения повышения его уровня и дальнейшего усиления окисления ксантиноксидазой путем введения экзогенной D-рибозы. Это вещество способно фосфорилироваться рибокиназой в рибозо-5-

фосфат, который в дальнейшем может превращаться в фосфорибозилдифосфат, необходимый для реутилизации гипоксантина в инозинмонофосфат. О более эффективной реутилизации гипоксантина свидетельствует снижение концентрации урата в крови крыс, получавших D-рибозу (на 31,1 % по сравнению с животными группы ИН; P=0,02).

При этом снижается интенсивность генерации ксантиноксидазой активных кислородных метаболитов и сопряженная с нею липопероксидация мембранных структур кардиомиоцитов. Об этом свидетельствует снижение содержания МДА в сердце крыс группы ИН+Р (на 20,5 % по сравнению с аналогичным показателем у крыс группы ИН; P=0,049). Торможение генерации активных кислородных метаболитов под влиянием рибозы способствует сохранности активности ферментов антиперекисной защиты СОД и КАТ. Активность этих энзимов в кардиомиоцитах крыс группы ИН+Р превышает аналогичные показатели у животных группы ИН на 15,0 % (P=0,45) и 43,0% (P=0,34) соответственно.

Снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов в миокарде крыс, получавших D-рибозу, способствует сохранность активности ГлПО. В кардиомиоцитах крыс группы ИН+Р она на 25,3 % (P=0,019) выше по сравнению с животными группы ИН. Это способствует восполнению уровня G-SH, который у крыс группы ИН+Р на 36,4 % (P=0,019) выше, по сравнению с животными группы ИН. Отсутствие снижения уровня этого трипептида может быть связано с более эффективным восстановлением глутатиондисульфида за счет сохранности активности ГлР. У крыс группы ИН+Р последняя на 21,5% (P=0,002) выше по сравнению с животными группы ИН. Это является одним из факторов, способствующих лучшей обеспеченности клеток сердца НАДФ·H_2. Другим таким фактором является повышение активности Г-6-ФДГ в кардиомиоцитах крыс группы ИН+Р (на 83,5 % по сравнению с аналогичным показателем у животных группы ИН, P=0,032).

Поступление D-рибозы в организм крыс, подвергшихся интенсивным физическим нагрузкам, предотвращая метаболические нарушения, описанные выше, снижает и степень гипоксии. Об этом свидетельствует снижение концентрации молочной кислоты в крови крыс группы ИН+Р [на 34,7 % по сравнению с аналогичным параметром у крыс группы ИН (P=0,0001)]. Все это в конечном итоге способствует снижению утомления и повышению физической работоспособности животных. Оно выражается в увеличении времени активного плавания на 160,7 % (P=0,0001) относительно группы крыс, подвергнутых ИН.

Заключение

Таким образом, интенсивные физические нагрузки приводят к интенсификации анаэробного гликолиза, развитию лактоацидоза, с последующим усилением катаболизма пуринов до гипоксантина и окислением его до урата. Следствием этого является чрезмерная

генерация ксантиноксидазой активных кислородных метаболитов, повреждающих мембраны кардиомиоцитов, приводящая к развитию утомления. Введение крысам, подвергшимся интенсивным физическим нагрузкам, D-рибозы предотвращает нарушение окислительных процессов, чрезмерную генерацию ксантиноксидазой активных кислородных метаболитов, торможение активности ферментов антиоксидантной защиты, повреждающее воздействие на мембраны кардиомиоцитов продуктов перекисного окисления липидов, способствуя, таким образом, повышению физической работоспособности подопытных животных. Полученные результаты исследования свидетельствуют о кардиопротекторном действии D-рибозы в условиях интенсивных физических нагрузок.

Список литературы

1. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Переслегина И. А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19-21.

2. Конвай В. Д. Золин П. П. Роль острого нарушения метаболизма пуринов в развитии постреанимационной патологии печени // Омский научный вестник. – 2003. – №3 (№24), сентябрь. – С.168-171.

3. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16-19.

4. Нечаева Г. И. Коррекция морфофункциональных показателей сердца и кардиогемодинамики спортсменов под действием нейроэндокринного адаптогена «Милайф» // Теория и практика физической культуры. – 2003. – № 6. – С.41-44.

5. Роженцов В. В., Полевщиков М. М. Утомление при занятиях физической культурой и спортом: проблемы, методы исследования. – М.: Советский спорт, 2006. – 280 с.

6. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопр. мед. химии. – 1999. – Т. 45, № 3. – С. 263-272.

7. Черданцев Д. В. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите. – Красноярск: АРТЭ, 2002. – 148 с.

8. Arch J. R. S., Newsholme E. A. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and`adenosine deaminase in tissue from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine // Biochem. J. – 1978. – Vol. 174, № 3. – P. 965-977.

Рецензенты:

Ширинский Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры гигиены с курсом питания человека, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», г. Омск.

Зуева Ольга Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО Омского государственного технического университета, г. Омск.