

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ЧРЕЗМЕРНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ

Чигринский Е.А.¹, Конвай В.Д.², Ефременко Е.С.¹, Соснин М.И.¹

¹ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, Омск, Россия (644043, ул. Ленина, 12)

²ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», Омск, Россия (644008, г. Омск, пл. Институтская, 2), e-mail: chigrinski@list.ru

Исследование было проведено на 30 крысах-самцах, которых делили на две группы (n=15): контроль и крысы с чрезмерными физическими нагрузками. Физические нагрузки у животных моделировались при помощи их плавания с грузом в течение пяти недель. Контрольные крысы плавали без груза по усредненному времени (3–5 минут) в течение всего эксперимента, а животные второй группы плавали до полного утомления с грузом 10% от массы тела через день, в течение первых трех недель, а затем ежедневно в течение последних двух недель. После завершения эксперимента в почках крыс определяли содержание глутатиона, активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и гамма-глутамилтрансферазы. Установлено, что чрезмерные физические нагрузки приводят к снижению уровня глутатиона в тканях почек крыс. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в этих условиях снижена на фоне повышения активности гамма-глутамилтрансферазы. Уменьшение содержания глутатиона и изменение активности ферментов его обмена в почках крыс свидетельствуют о нарушении внутриклеточного редокс-потенциала при чрезмерных физических нагрузках.

Ключевые слова: глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, гамма-глутамилтрансфераза, почки, физические нагрузки.

THE ENZYME ACTIVITY OF GLUTATHIONE SYSTEM IN THE RATS' KIDNEYS DURING THE EXCESSIVE PHYSICAL EXERCISE

Chigrinski E.A.¹, Conway V.D.², Efremenko E.S.¹, Sosnin M.I.¹

¹Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia (Lenin's str., 12, 644043)

²Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia (Institutskaya sq., 2, 644008), e-mail: chigrinski@list.ru

The study was carried out on 30 male rats. Animals were divided into two groups (n=15): control and excessive exercise. The physical exercises of rats had been created with the aid of their swimming with the load for 5 weeks. Group 1 rats were controls swimming without the load during the mean period of 3-5 min every other day throughout the experiment. Group 2 rats were subjected to excessive exercise: 10% body weight-loaded forced swimming until complete exhausting every other day during the first 3 weeks and then daily during the next 2 weeks. After the experiment completion the glutathione content, activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and gamma-glutamyltransferase were defined in the kidneys of rats. It was ascertained that excessive exercises had reduced to the glutathione concentration in the kidneys of rats. Under these conditions activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase had reduced against the increasing activity of gamma-glutamyltransferase. The reduction of glutathione concentration and the alteration of the enzyme activity of its metabolism in the kidneys of rats during excessive physical exercises can testify to the development of oxidative stress in them.

Key words: glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, gamma-glutamyltransferase, kidney, excessive exercise.

Чрезмерные физические нагрузки часто встречаются в практике физической культуры, спорта, в военном деле и на тяжелом производстве [4; 5]. Доказано, что физические нагрузки, превышающие оптимальный порог, приводят к активации свободно-радикальных процессов [5; 8; 10]. Это выражается в изменении биохимических показателей, характеризующих степень повреждения органов и тканей свободными радикалами. Наиболее

вероятным источником свободных радикалов при чрезмерных физических нагрузках, на наш взгляд, может быть ксантиноксидазная реакция.

Образование в ксантиноксидазой реакции активированных кислородных метаболитов возможно в результате двухэлектронного восстановления FAD [7]. В зависимости от степени восстановления данного фермента, существует несколько десятков его промежуточных состояний. Это способствует усиленной продукции ксантиноксидазой активированных кислородных метаболитов при изменении функционального состояния клеток [7]. В частности, известно, что доля одноэлектронного восстановления данным ферментом кислорода увеличивается при сдвиге pH в кислую сторону [3]. Активация ксантиноксидазной реакции происходит после конверсии дегидрогеназной формы фермента в оксидазную [3; 7]. При избытке активированных кислородных метаболитов и недостатке антиоксидантов в организме развивается перекисное окисление липидов, углеводов, нуклеиновых кислот, белков, в том числе ферментов, что является причиной нарушения метаболизма во многих органах и тканях [7; 8; 10].

Кроме того, большую роль исследователи уделяют изучению параметров антиоксидантной защиты организма при действии на него чрезмерных физических нагрузок. Одним из основных антиоксидантов организма является глутатион. В научной литературе недостаточно освещен вопрос о содержании этого трипептида в почках крыс, подверженных чрезмерным физическим нагрузкам. Также отсутствует информация об активности ферментов, участвующих в его метаболизме в этих условиях. В связи с этим актуальным является изучение активности ферментов, участвующих в реализации глутатионового редокс-цикла при чрезмерных физических нагрузках.

Цель работы: оценить уровень глутатиона и активность ферментов его обмена в почках крыс при действии на организм чрезмерных физических нагрузок.

Материал и методы исследования

Исследования проводились на кафедре биохимии Омской государственной медицинской академии в 2011–2013 гг. В качестве экспериментальных животных были использованы 30 белых аутбредных крыс-самцов массой 180–200 г. При проведении эксперимента соблюдались требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных, применяемых для экспериментальных и других научных целей 86/609 ЕЕС. Физические нагрузки у крыс моделировали по В.В. Корняковой с соавт., 2007 [4]. Методом случайной выборки крыс делили на 2 группы (n=15). 1-ю группу составляли контрольные животные, которые плавали без груза по усредненному времени (3–5 мин), через день, в течение всего эксперимента, длившегося пять недель. 2-ю – крысы с чрезмерным режимом физической нагрузки, они плавали с грузом 10% от массы тела до полного утомления.

Необходимо отметить, что на протяжении первых трех недель животные плавали через день, а последние две – ежедневно. Температура воздуха в виварии составляла 19–21 °С, воды при плавании – 28–30 °С.

После завершения эксперимента проводилось извлечение почек, которые позднее подвергались гомогенизации на 0,15 М растворе хлорида калия (KCl) в стеклянном гомогенизаторе Поттера при температуре 0–2 °С. В супернатанте гомогенатов определяли содержание общего белка при помощи биуретового реактива и глутатиона по Н.А. Костромитикову, Е.А. Суменкову (2005) [6]. Данный метод основан на реакции восстановленного глутатиона с реактивом Элмана, в результате которого образуется тионитрофенольный анион, и под его воздействием меняется цвет раствора, приобретая желтый оттенок.

Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) определяли по накоплению окисленного глутатиона [2]. В состав реакционной смеси входили: 1 мл фосфатного буфера (0,3 М рН 7,4); азид натрия 12 мМ глутатиона восстановленного, 0,2 мл гомогената, 0,5 мл 1,8 мМ перекиси водорода. Реакцию запускали добавлением перекиси водорода, останавливали через 2 мин добавлением 1 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования, при 3000 об/мин в течение 15 мин, определяли экстинкцию окисленного глутатиона при длине волны 260 нм. Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) определяли по скорости восстановления глутатиона в реакционной среде, содержащей 2 мл фосфатного буфера (0,05 М рН 8,0) 0,2 мл 1 мМ ЭДТА, 0,5 мл 7,5 мМ глутатион окисленный, 0,2 мл гомогената, 0,1 мл 1,2 мМ NADPH при 37 °С в течение 10 мин при длине волны 340 [2]. Активность гамма-глутамилтрансферазы (КФ 2.3.2.2.) определяли при помощи набора реактивов Chronolab (Швейцария).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 фирмы StatSoft Inc. (США). Экспериментальные данные обрабатывали при помощи непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как *Me* – медиана, *Q₁* – нижний квартиль, *Q₃* – верхний квартиль.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования представлены в табл. 1. Из нее видно, что влияние чрезмерных физических нагрузок на организм животных вызвало снижение концентрации глутатиона и изменение активности ферментов, участвующих в его метаболизме. Концентрация глутатиона в почках крыс второй группы снижена в 2,14 раза ($pU=0,0017$) относительно аналогичного показателя в контрольной группе. Данное снижение, на наш взгляд, является следствием усиленного катаболизма пуриновых мононуклеотидов до гипоксантина и дальнейшего его окисления до мочевой кислоты. Этот процесс сопряжен с

усиленной генерацией ксантиноксидазой активированных кислородных метаболитов, истощающих антиоксидантную систему и приводящих к чрезмерной липопероксидации мембранных структур клеток почек (рис. 1).

Таблица 1

Содержание глутатиона и активность ферментов его обмена в почках крыс при действии на организм чрезмерных физических нагрузок, ($Me (Q_1-Q_3)$), $n=15$

Показатель	Группа	
	Контроль	Чрезмерные физические нагрузки
Глутатион, <i>нмоль/мг белка</i>	15,7 (11,9–18,4)	7,34* (4,73–10,7) <i>pU=0,0017</i>
Глутатионпероксидаза, <i>МЕ/мг белка</i>	395 (339–431)	149* (110–187) <i>pU =0,0014</i>
Глутатионредуктаза, <i>МЕ/мг белка</i>	258 (231–324)	93,8* (82,6–115) <i>pU =0,0136</i>
Гамма-глутамилтрансфераза, <i>МЕ/мг белка</i>	439 (374–508)	953* (861–1041) <i>pU =0,0011</i>

Примечание: * – различия статистически значимы с контролем; Me – медиана; Q_1 – нижний квартиль; Q_3 – верхний квартиль; n – количество крыс в группе; pU – уровень статистической значимости различий.

Усиление катаболизма пуринов при чрезмерных физических нагрузках связано с активацией анаэробного гликолиза, развивающегося под влиянием гипоксии в этих условиях [3]. Усиление анаэробного пути катаболизма глюкозы, с одной стороны, приводит к ее дефициту, а с другой - к накоплению лактата. Увеличение уровня молочной кислоты активирует ферменты, катализирующие распад пуринов, а развившийся дефицит глюкозы в этих условиях тормозит работу гексозомонофосфатного пути ее превращения, что ведет к снижению выработки рибозо-5-фосфата, необходимого для реутилизации пуриновых мононуклеотидов [3]. Необходимо отметить, что угнетение работы пентозного цикла в условиях гипоксии ведет к снижению регенерации NADPH, необходимого для продуктивной работы глутатионредуктазы.

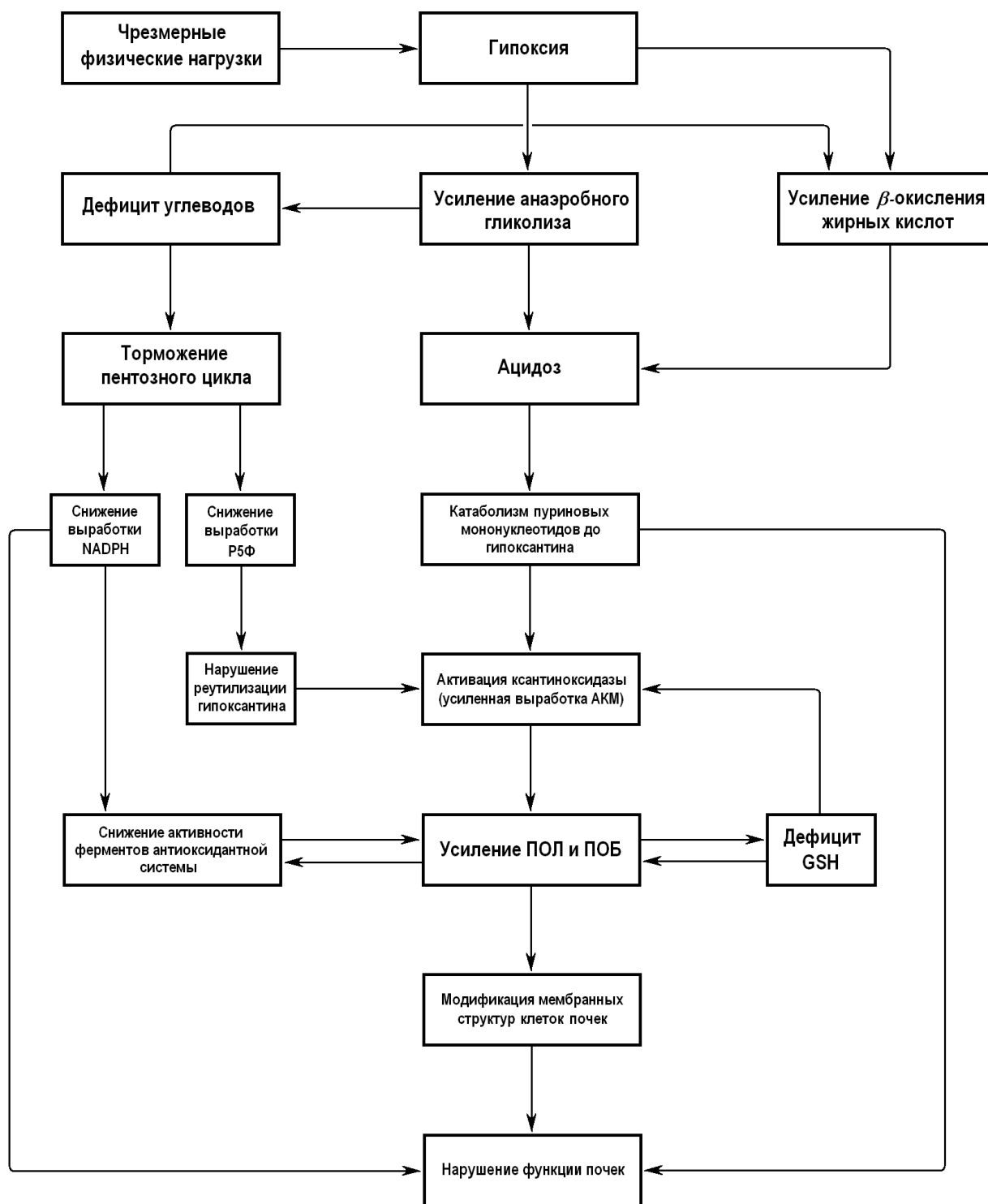


Рис. 1. Схема метаболических нарушений в почках крыс при чрезмерных физических нагрузках

Примечание: *GSH* – глутатион восстановленный; *NADPH* – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; *AKM* – активированные кислородные метаболиты; *ПОБ* – перекисное окисление белков; *ПОЛ* – перекисное окисление липидов; *P5Ф* – рибозо-5-фосфат.

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в почках крыс, подвергшихся чрезмерным физическим нагрузкам, снизилась в 2,65 ($pU=0,0014$) и 2,75 ($pU=0,0136$) раза относительно аналогичных показателей в контрольной группе соответственно. Глутатионпероксидаза катализирует реакции обезвреживания пероксида водорода (H_2O_2) и гидроперекисей липидов, образующихся в биологических мембранах под действием активированных кислородных метаболитов [7]. На первом этапе глутатионпероксидазной реакции происходит восстановление гидропероксида ненасыщенной жирной кислоты протоном до ее гидроокиси. Селенол при этом окисляется в селененовую кислоту ГПО-SeOH. «Окисленный» фермент в дальнейшем образует с глутатионом комплекс ГПО-SeG, реагирующий в дальнейшем со второй молекулой глутатиона с образованием глутатиондисульфида и исходной формы селенола в активном центре глутатионпероксидазы. Окислительно-восстановительные превращения атомов селена сочетаются с конформационными изменениями белковой части молекулы фермента. Образовавшиеся в результате реакции гидроокиси жирных кислот представляют для клеток меньшую опасность и способны катаболизироваться [7]. Глутатионредуктаза регенерирует глутатиондисульфид, образующийся в глутатионпероксидазной реакции, до глутатиона с использованием NADPH.

Значительное снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в почках при действии на организм чрезмерных физических нагрузок может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, для функционирования глутатионзависимых ферментов необходимо достаточное количество восстановленного NADPH. Во-вторых, молекулы ферментов, в частности их активные центры, могут быть «атакованы» свободными радикалами, образующимися в процессе усиленного катаболизма пуринов. Выше нами были описаны механизмы, способствующие угнетению процесса восстановления $NADP^+$ до NADPH и способствующие нарушению обмена пуриновых мононуклеотидов. В-третьих, поскольку глутатионпероксидаза является селенопротеином, то может быть нарушена экспрессия ее генов вследствие дефицита селена, развившегося в условиях чрезмерных физических нагрузок. Данные о том, что во время интенсивных физических нагрузок организм теряет большое количество микроэлементов, в том числе и селена, приведены в работе [1].

Активность гамма-глутамилтрансферазы в почках крыс второй группы увеличилась в 2,17 ($pU=0,0011$) раза в сравнении с аналогичным показателем в контроле. Активация гамма-глутамилтрансферазы может быть связана с отрывом этого фермента от мембраны, на которой он находится, и накоплением его в цитоплазме. Многие авторы считают такое явление прямым следствием окислительного стресса [9]. Мы полагаем, что активация гамма-

глутамилтрансферазы в данных условиях может усугубить нарушение глутатионового редокс-цикла в тканях почек.

Выводы

1. Чрезмерные физические нагрузки, моделируемые у экспериментальных животных, приводят к снижению уровня восстановленного глутатиона в тканях почек.
2. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в почках крыс при действии на организм чрезмерных физических нагрузок снижена на фоне повышения активности гамма-глутамилтрансферазы.
3. Уменьшение содержания глутатиона и изменение активности ферментов его обмена в почках крыс свидетельствуют о нарушении внутриклеточного редокс-потенциала при чрезмерных физических нагрузках.

Список литературы

1. Вировец О.А. О повышенных потерях макро- и микроэлементов при занятиях спортом и целесообразности их компенсации биологически активными добавками // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78, № 2. – С. 67–71.
2. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лабораторное дело. – 1990. – № 8. – С. 19–21.
3. Конвай В.Д., Чигринский Е.А., Корнякова В.В., Рейс Б.А. Активность антиоксидантных ферментов эритроцитов при интенсивных физических нагрузках на фоне приема D-рибозы // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80, № 3. – С.75–79.
4. Корнякова В.В., Конвай В.Д., Величко Г.Н. Роль нарушения метаболизма пуринов в развитии повреждений эритроцитов, вызванных чрезмерными физическими нагрузками // Проблема сохранения здоровья в Сибири и в условиях Крайнего Севера : сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции (Омск, 16–19 октября 2007 г.). – Омск : СибГУФК, 2007. – С. 315 – 320.
5. Корнякова В.В., Конвай В.Д., Рейс Б.А., Дятлова А.Ю. Утомление после чрезмерных физических нагрузок: механизмы развития, коррекция // Теория и практика физической культуры. – 2009. – № 3. – С. 23–25.
6. Костромитиков Н.А., Суменков Е.А. Определение глутатиона фотоколориметрическим методом исследования // Вестник РАСХН. – 2005. – № 5. – С. 69–70.
7. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М. : Слово, 2006. – 556 с.

8. Bloomer R.J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers // *Adv. Clin. Chem.* – 2008. – Vol. 46. – P. 1–50.
9. Lee D.-H., Jacobs D.R. Jr., Gross M. et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49. – P. 1358–1366.
10. Nikolaidis M.G., Jamurtas A.Z., Paschalis V. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations // *Sports Med.* – 2008. – Vol. 38, № 7. – P. 579–606.

Рецензенты:

Патюков А.Г., д.м.н., профессор, проректор по учебной работе, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «ОмГМА» Минздрава РФ, г. Омск.

Аглетдинов Э.Ф., д.м.н., профессор кафедры биологической и биоорганической химии ГБОУ ВПО «БГМУ» Минздрава РФ, г. Уфа.