

УДК 577(612.017)

## МЕДЬСОДЕРЖАЩАЯ ОКСИДАЗА И ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ $FE^{2+}$ ПРИ АУТОТРАНСФУЗИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВООБЛУЧЕННОЙ КРОВИ СПОРТСМЕНОВ

Елисеев Е.В.<sup>1</sup>, Дерябин В.М.<sup>2</sup>, Домбровский В.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, Россия, e-mail: salage@bk.ru

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Центральная медико-санитарная часть № 15 Федерального медико-биологического агентства», Снежинск, Челябинская область, Россия, e-mail: salage@bk.ru

Исследования экспериментально показали наличие существенных изменений активности супероксиддисмутазы и церулоплазмينا у обследуемых в ходе их курсового лечения методом аутоотрансфузии ультрафиолетовооблученной крови. Моделируемые при этом методе ультрафиолетовые лучи немедленно подавляют активность церулоплазмينا в плазме крови больных и здоровых спортсменов как по отношению к парафенилендиамину, так и к адреналину и норадреналину. Скорость реакции окисления адреналина облученных церулоплазмином ниже, чем у необлученных. Определяя механизмы положительного действия аутоотрансфузий крови, облученной ультрафиолетовыми лучами, авторы предлагают рассматривать увеличение активности церулоплазмينا как помехоустойчивую реакцию системы крови на возрастающее действие ультрафиолетового излучения.

Ключевые слова: церулоплазмин, супероксиддисмутазы, перекисное окисление липидов, антирадикальная защита системы крови, помехоустойчивость

## COPPERY OXIDASE AND RAPID OXIDATION $FE^{2+}$ AT AUTOTRANSFUSION BLOOD IS IRRADIATED WITH ULTRAVIOLET LIGHT AN ATHLETES

Eliseev E.V., Deryabin V.M., Dombrovskiy V.I.

<sup>1</sup>Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, Russia, e-mail: salage@bk.ru

<sup>2</sup>Central Health Part 15 of the Federal Medical-Biological Agency, Snezhinsk, Chelyabinsk region, Russia, e-mail: salage@bk.ru

Experimental studies have shown the presence of significant changes in the activity of superoxide dismutase and ceruloplasmin in subjects during their course of treatment by autotransfusion blood is irradiated with ultraviolet light. Ultraviolet rays inhibit ceruloplasmin activity in the plasma of patients and healthy athletes with respect to both PPD and adrenaline and noradrenaline. The rate of oxidation of adrenaline irradiated ceruloplasmin lower than that of non-irradiated. The authors propose to consider an increase in ceruloplasmin activity as an interference-reaction of the blood to the growing effects of ultraviolet radiation.

Keywords: ceruloplasmin, superoxide dismutase, lipid peroxidation oxidation, antiradical protection of the blood system, noise immunity

При действии ультрафиолетовых лучей (УФЛ) в биологических системах усиливается образование токсических интермедиатов одноэлектронного восстановления кислорода, обладающих способностью инициировать и поддерживать реакции неконтролируемого перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Ферментная система, инактивирующая свободные радикалы кислорода и тем самым ингибирующая ПОЛ, представлена в клетках (в том числе и в клетках крови) супероксиддисмутазой (СОД) (КФ.1.15.1.1). Фермент осуществляет дисмутацию супероксидных анионов кислорода в  $H_2O_2$  и триплетный кислород. В исследованиях [1] СОД-активность обнаружена и в плазме крови, где ее связывают, в частности, с

медьсодержащей оксидазой – церулоплазмином (ЦП) (КФ.1.16.3.1). Авторы этой работы предполагают участие этого фермента в детоксикации супероксиданионов во внеклеточных средах, что может существенно расширить положение теории помехоустойчивости организма [2]. Более того, гипотезы о функциях ЦП [3, 6], содержание которого в плазме крови здорового человека очень высоко (около 300 мкг/мл) и с которым связана практически вся медь плазмы (до 98%), позволяют рассматривать его как полифункциональный белок. Отсюда генеральной задачей данной работы явилось изучение влияния церулоплазмينا на интенсивность окисления  $Fe^{2+}$  и ряда биологически активных субстратов при аутотрансфузии ультрафиолетовооблученной крови (АУФОК) на активность и содержание ЦП, активность СОД и интенсивность процессов ПОЛ в крови здоровых спортсменов и бывших спортсменов, чья спортивная карьера остановилась после факта выявления врачами у них лимфопенозной недостаточности нижних конечностей.

### **Объем, материалы и методы исследования**

В исследовании приняли участие 67 респондентов. Группу здоровых спортсменов ( $n=36$ ) составляли кандидаты в мастера и мастера спорта по гандболу и волейболу в возрасте от 19 до 21 года. Данную группу (1-ю группу) мы рассматривали в качестве доноров. В группу бывших спортсменов (2-ю группу) вошли лица ( $n=31$ ) в возрасте от 25 до 45 лет, спортивная карьера которых остановилась в разное время после факта выявления врачами у них лимфопенозной недостаточности нижних конечностей. По заключению медицинских работников лимфостаз нижних конечностей у респондентов данной группы мог быть спровоцирован целым рядом причин, которые нами не определялись и не анализировались далее в исследованиях. Квалификационный состав данной группы соответствовал реестру спортивной квалификации и видам спорта группы доноров, что позволяло нам в исследованиях сравнивать результаты 1-й и 2-й групп с учетом их относительной и все же максимально возможной (в условиях настоящего исследования) однородности.

Респондентам 2-й группы лечащими врачами были назначены и проводились курсы АУФОК. Использовался аппарат для АУФОК «Изольда» МД-73. Объем облучаемой крови определялся из расчета 2 мл на 1 кг массы тела. Доза облучения соответствовала стандартной дозе, рекомендуемой инструкцией к аппарату. Курс АУФОК состоял из 4 сеансов с интервалом 2 суток. Для исследования кровь забиралась из вены до ультрафиолетового облучения (УФО); из аппарата – сразу после УФО и из вены — через 5–10 мин после АУФОК.

Парафенилендиаминоксидазную активность ЦП в плазме крови определяли спектрофотометрическим способом [1]. О содержании ЦП в плазме судили по количеству в ней меди [5]. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по содержанию в плазме диеновых

конъюгатов (ДК) липидов, которые определяли спектрофотометрически [1]. СОД-активность измеряли в хлороформ-этанольных (ХЭ) экстрактах плазмы и гемолизированных эритроцитов (Эр) после их трехкратной отмывки физиологическим раствором [4].

Для изучения возможных механизмов влияния УФИ на активность ЦП и СОД использовали кровь респондентов 1-й группы — доноров — и в опытах *in vitro* проводили облучение цельной крови, плазмы, гемолизированных Эр, ХЭ-экстрактов плазмы и Эр в аппарате «Изольда» МД-73 в течение 1–3 мин, после чего во всех образцах изучали активность ферментов. Кроме того, выделяли ЦП с высокой степенью очистки из плацентарной крови человека [6] и облучали его растворы (25,2 мкмоль/л) в спектрофотометрических кюветах. Через 1, 2, 3 мин измеряли поглощение ЦП в области его характеристических максимумов (при 610 и 330 нм). Одновременно измеряли оксидазную активность ЦП, используя в качестве субстрата окисления раствор парафенилендиамина (0,187 ммоль в 1 л 0,4М Na-ацетатного буфера, рН 5,5), растворы адреналина и норадреналина (0,038–0,38 ммоль в 1 л 0,05 М Na-ацетатного буфера, рН 6,0).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Активность ЦП в крови сразу после I сеанса УФО (в аппарате) достоверно снижалась на 10% и на 15–24% — после II–IV (см. табл.).

**Таблица 1**

Динамика активности ЦП и СОД, содержание меди и диеновых конъюгатов в крови спортсменов 2 группы во время лечения методом АУФОК ( $\bar{x} \pm S_x$ )

Сеанс	Срок наблюдений	Церулоплазмин, мкмоль/(л · мин)	Медь плазмы, мкмоль/л	Супероксиддисмутаза, усл. ед.		ДК плазмы, мкмоль/л
				плазмы	эритроцитов	
I	1	3,78±0,15	14,4±0,4	1,9±0,25	3,6±0,50	10,6 ± 1,1
	2	3,44±0,21*	13,2±1,2	1,4±0,24	3,0±0,50	* 11,3±1,2
	3	3,61±0,17	13,0±0,5	1,5±0,20	3,7±0,28	10,2±1,2
II	1	4,12±0,20	15,0±0,8	1,8±0,20	5,5±1,0	11,0±1,2
	2	3,12±0,19*	13,3±1,0	1,7±0,25	5,8±1,0**	9,9±0,9
	3	3,90±0,28	14,1 ± 1,2	1,5±0,19	4,2±0,57	9,9±1,3
III	1	4,34±0,17	15,6±0,25	1,9±0,25	6,0±1,0**	11,0±0,9
	2	3,77±0,19*	13,0±1,1	2,1±0,30	6,7±1,50**	10,7±0,8
	3	3,86±0,33	14,7±1,9	2,5±0,10**	5,5±1,60	10,7±1,4
IV	1	4,70±0,21**	16,4±0,8**	-	7,0±1,70**	8,4±1,2
	2	4,06±0,39	14,2±1,8	-	6,7±1,80**	7,8±1,3**
	3	4,31±0,22	15,2±0,9	-	6,1±1,80**	6,9±1,6 **

**Примечание:** \* — отличие от исходных показателей при данном сеансе достоверно;

\*\* — отличие от исходных показателей перед I сеансом достоверно (оценка по критерию Вилкоксона—Манна—Уитни,  $p < 0,05$ ); остальные различия недостоверны, где: 1 – до УФО; 2 – сразу после УФО в аппарате «Изольда» МД-73; 3 – через 5–10 мин после АУФОК

Одновременно в плазме снижалось на 11–17% и содержание меди, однако эти изменения не были достоверны из-за большого разброса индивидуальных значений. Через 10 мин после реинфузии облученной крови исследуемые показатели обнаруживали тенденцию к увеличению до исходных значений. В ходе курсового лечения методом АУФОК активность ЦП и содержание меди возрастали и составили ко времени IV сеанса соответственно 125% и 114% от исходных показателей.

Снижение СОД-активности плазмы крови больных во время I и II сеансов АУФОК совпало с динамикой изменения активности ЦП, но носило недостоверный характер (см. табл.). После III сеанса СОД-активность плазмы достоверно увеличивалась на 33% по сравнению с данными до лечения. Активность СОД в Эр перед II сеансом увеличивалась на 53%, а к концу лечения — на 70–94%.

Содержание ДК липидов в плазме крови в ходе каждого сеанса (кроме I) имело тенденцию к снижению по сравнению с их количеством до лечения, а после IV сеанса оно достоверно уменьшилось на 29%.

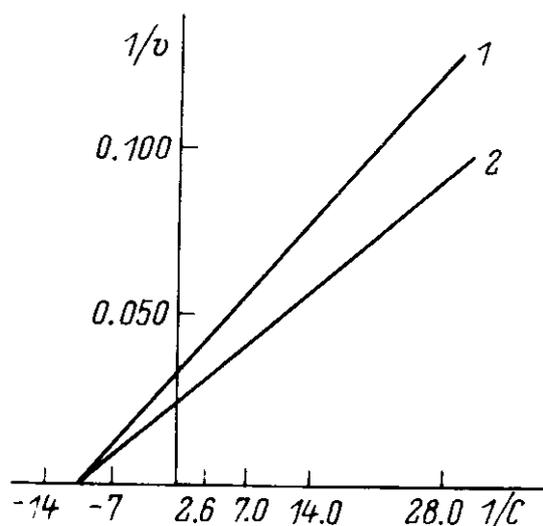


Рис. 1. Влияние УФО растворов очищенного ЦП на скорость реакции окисления адреналина  
 Примечание: по оси абсцисс – концентрация (С) адреналина, моль/л; по оси ординат – скорость (v) реакции, усл. ед. (график в координатах двойных обратных величин). Растворы ЦП: 1 – необлученные, 2 – облученные

Как показали модельные эксперименты, проведенные на донорской крови, ее облучение приводило к немедленному снижению оксидазной активности ЦП на 10–14%, облучение плазмы — к снижению на 20–23%. После УФО растворов очищенного ЦП оксидазная активность фермента ингибировалась на 50% при использовании в качестве субстрата парафенилендиамина или адреналина, и на 20% — при использовании норадrenalина, что, видимо, обусловлено различным сродством фермента к этим

субстратам. Изучение кинетики окисления адреналина показало (рис. 1), что УФО ЦП приводит к снижению скорости ферментативной реакции почти в 1,5 раза при неизменной константе Михаэлиса ( $K_m$ ), равной 0,106 ммоль/л адреналина.

### **Обсуждение результатов исследования**

Проведенные исследования экспериментально показали наличие существенных изменений активности СОД и ЦП у обследуемых 2-й группы в ходе их курсового лечения методом АУФОК. Более того, моделируемые при этом методе УФЛ немедленно подавляют активность ЦП в плазме крови больных и здоровых спортсменов как по отношению к парафенилендиамину, так и к адреналину и норадреналину. Скорость реакции окисления адреналина облученным ЦП почти в 1,5 раза ниже, чем необлученным при неизменной  $K_m$ . Это обусловлено, по-видимому, тем, что под влиянием УФЛ молекулы ЦП частично переходят в восстановленное состояние вследствие конформационных перестроек активного центра. Как известно [3], процесс УФ-инактивации белков начинается с поглощения энергии УФЛ основными хромофорами — триптофаном и цистином, что приводит в итоге к изменению конформации активного центра. В молекуле ЦП обнаружено более высокое содержание триптофана по сравнению с другими белками, и, кроме того, в ней насчитывается до 15 цистиновых групп [6]. Вероятно, эти особенности структуры ЦП и объясняют значительную УФ-чувствительность его молекул.

Возникновение конформационных перестроек в активном центре ЦП при действии УФЛ подтверждается и результатами анализа спектральных характеристик облученного ЦП. Поглощение фермента при 610 нм снижается. Это подтверждается и данными [4], согласно которым выявленная нами интенсивность поглощения обусловлена ионами  $Cu^{2+}$  типа I («голубая» медь), связанными в активном центре с атомами серы цистеина. Более того, согласно нашим предположениям снижение поглощения происходит как в результате разрыва связи иона меди с серой, так и вследствие восстановления меди. Поглощение облученного ЦП уменьшается и при 330 нм, что также свидетельствует о структурных перестройках активного центра данного фермента. Наличие этого поглощения обусловлено ионами диамагнитной меди типа III активного центра ЦП, где они образуют лиганды с тиоловыми группами цистеина и метионина по типу диамагнитных димеров.

Согласно результатам, полученным нами, очевидно, что восстановление меди в молекуле ЦП после УФО *имеет большое функциональное значение*, поскольку только в восстановленном виде ЦП отдает свою медь клеткам и тканям и только связанная с молекулами ЦП медь используется для синтеза медьсодержащих ферментов и белков. О том, что АУФОК активизирует эти процессы, свидетельствует следующая группа фактов: 1) одновременное снижение активности ЦП и содержания меди в плазме крови; 2) увеличение

активности СОД в Эр к началу II и последующих сеансов УФО; 3) увеличение активности СОД в Эр после УФО цельной донорской крови при отсутствии эффекта после УФО гемолизированных, предварительно отмытых от плазмы Эр (в условиях отсутствия ЦП). Активирование СОД, по всей вероятности, обусловлено включением элиминированной из ЦП меди в синтез этого фермента. Не исключено, что дополнительный вклад в активирование СОД в Эр цельной крови вносит и индуцирующий ее синтез кислород, уровень которого в крови заметно увеличивается после АУФОК [1].

### **Выводы**

1. Наблюдаемое в ходе лечения курсом АУФОК активирование ЦП в плазме и СОД в Эр можно считать одним из положительных эффектов приспособления системы крови к УФО.
2. Предложенное и экспериментально обоснованное определение ряда описанных выше реакций может служить примером помехоустойчивой реакцией системы крови к УФО и дополнительно расширить объяснение положительного терапевтического эффекта метода АУФОК.
3. Это позволяет и сам метод АУФОК рассматривать как компенсаторно-приспособительный способ воздействия, направленный на защиту клеток (как извне, так и изнутри) от разрушительного действия супероксиданионных радикалов кислорода и пероксидов липидов, возникновение которых возможно при УФО.

### **Список литературы**

- 1 Елисеев Е.В. Динамика физико-химических свойств белков плазмы и сыворотки крови спортсменов под влиянием разных доз ультрафиолетового облучения / Е.В. Елисеев, А.В. Белоедов, М.П. Поповских // Теория и практика физической культуры, 2006. – № 8. С. 23–27.
- 2 Елисеев Е.В. Определение активности и содержания ферментов антирадикальной защиты системы крови спортсменов / Е.В. Елисеев, А.В. Чукичев, В.М. Дерябин // Теория и практика физической культуры, 2009. – № 1. – С. 6–11.
- 3 Гаврилов Б.В. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов к плазме крови / Б.В. Гаврилов, М.И. Мишкорудная. – Лаб. дело, 2007. – № 3. – С. 33–35.
- 4 Мишин В.М. Дисмутаза O<sub>2</sub>: физико-химические свойства, каталитический механизм и биологическое значение / В.М. Мишин., В.В. Ляхович // Успехи современной биологии, 2009. – Т. 82. – № 3. – С. 338–355.

- 5 Кокорева Е.Г. Возрастные особенности регуляции сердечного ритма у детей дошкольного и младшего школьного возраста с нарушением зрения: дисс. ... канд. биол. наук / Е.Г. Кокорева. – Челябинск: ЧГПУ, 2002. – 137 с.
- 6 Rosner R., Mihok I. Egyszerii serum-rez meghatarozas oxalil-dihidraziddal. — Kiserl. orvostud., 2009, vol. 23, № 1, P. 92–97.
- 7 Stokes R.. A rapid method for the isolation of caeruloplasmin. – Clin. chim. Acta, 2007, vol. 15, P. 517–523.

**Рецензенты:**

Байгужин П.А., д.б.н., доцент, профессор кафедры анатомии, физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный педагогический университет», г. Челябинск;

Сабирьянова Е.С., д.м.н., доцент, профессор кафедры «Спортивная медицина и физическая реабилитация» ФГБОУ ВПО «Уральский государственный университет физической культуры», г. Челябинск.