

## СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ПРИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ И ИНТЕНСИВНОСТИ

Кантюков С.А.<sup>1</sup>, Ермолаева Е.Н.<sup>1</sup>, Кривохижина Л.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия (454092, Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail:ermen33@mail.ru

Физическая нагрузка моделировалась в эксперименте на 68 белых беспородных крысах. Модель острой физической нагрузки воспроизводилась плаванием в течение 4 мин с грузом массой 20% от веса тела. Забор крови производился через 25–30 мин после плавания. Хроническую физическую нагрузку субмаксимальной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 мин. Нагрузку увеличивали постепенно: первые 7 дней животные ежедневно плавали без груза, следующие 2 недели животные плавали с грузом 2% от массы тела. На 9-й, 15-й и 21-й день эксперимента животные подвергались дополнительно максимальной физической нагрузке: плавали в течение 4 мин с грузом массой 20% от веса тела. Хроническую физическую нагрузку умеренной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 мин. Забор крови производился на 9-й, 15-й и 21-й день эксперимента после физической нагрузки внутрисердечно. Интенсивность свободнорадикального окисления в цельной крови исследовали методом люминол-усиленной хемилюминесценции. Физическая нагрузка любой интенсивности приводит к изменению свободнорадикальных процессов в цельной крови: при острой физической нагрузке возрастает как базальное, так и индуцированное свечение; хроническая физическая нагрузка умеренной мощности сопровождается возрастанием базального свечения на 15–21-е сутки и снижением индуцируемого свечения крови на 9–21-е сутки; при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности базальное свечение не изменяется, индуцированное свечение снижается. Интенсивность свободнорадикальных процессов в цельной крови при физических нагрузках связана как с функциональным состоянием нейтрофильных лейкоцитов, так и с их количественными изменениями.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление, хемилюминесценция, нейтрофилы, физическая нагрузка

## FREE RADICAL OXIDATION IN BLOOD DURING PHYSICAL EXERCISE OF DIFFERENT DURATION AND INTENSITY

Kantyukov S.A.<sup>1</sup>, Ermolaeva E.N.<sup>1</sup>, Krivokhizhina L.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South Ural State Medical University (SUSMU), Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, Vorovskiy street, 64), e-mail:ermen33@mail.ru

Exercise simulated in an experiment on 68 white rats. Model acute exercise reproduced swimming for 4 minutes with a load weight of 20% of body weight. Blood sampling was carried out in 25–30 minutes after swimming. Chronic physical load submaximal power modeled daily swimming for 30 minutes. The load was increased gradually: the first seven days, the animals swam every day without a load, the next two weeks the animals swam with a load of 2% of body weight. On 9, 15 and 21 day of the experiment, the animals were subjected to an additional maximum exertion: swam for 4 minutes with a load weight of 20% of body weight. Chronic physical activity of moderate power modeled daily swimming for 30 minutes. Blood sampling was carried out on 9, 15 and 21 days after the experiment exercise intracardiac. The intensity of free radical oxidation in whole blood was investigated by luminol-enhanced chemiluminescence. Physical exercise of any intensity causes a change in free radical processes in whole blood: the acute exertion increases both basal and stimulated luminescence; chronic exercise of power is accompanied by a moderate increase in the basal glow at 15–21 hours and a decrease in blood induced luminescence for 9–21 hours; in chronic physical exercise submaximal power basal illumination does not change, induced luminescence decreases. The intensity of free radical processes in the whole blood during exercise is associated with both the functional state of neutrophils and their quantitative changes.

Keywords: free radical oxidation, chemiluminescence, neutrophils, exercise

Основами быстро развивающегося утомления при интенсивных физических нагрузках являются развитие гипоксии и активация процессов свободнорадикального окисления [10]. Следствие оксидативного стресса на клеточном уровне — повреждение липидов, белков,

ДНК, нарушение организации мембранных структур [8]. Однако повышение генерации активных форм кислорода, выполняющих роль вторичного мессенджера при передаче сигнала через клеточную мембрану, — основа адаптивных реакций организма к экстремальным условиям [9]. Это рассматривается в качестве пускового звена, определяющего направление переходных процессов при фазовых изменениях адаптации при регулярных физических нагрузках [4]. В определенной степени активность процессов свободнорадикального окисления (а, следовательно, адаптивные и дизадаптивные последствия окислительного напряжения) должны зависеть от интенсивности и продолжительности физических нагрузок.

### **Цель исследования**

Исследовать интенсивность свободнорадикального окисления в цельной крови при физических нагрузках различной интенсивности.

### **Материалы и методы**

Исследование проведено на 68 белых беспородных крысах. Все эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных. Контрольную группу составили интактные животные; в эксперименте участвовали животные, подвергавшиеся острой [2] и хронической физической нагрузке субмаксимальной и умеренной мощности [1]. Модель острой физической нагрузки воспроизводилась по методу А.Ф. Краснова, Г.И. Самодановой и др. Животные плавали в течение 4 мин с грузом массой 20% от веса тела. Температура воды 32<sup>0</sup>С. Забор крови производился через 25–30 мин после плавания. ХФН субмаксимальной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 мин. Нагрузку увеличивали постепенно: первые 7 дней животные ежедневно плавали без груза, следующие 2 недели животные плавали с грузом 2% от массы тела. На 9-й, 15-й и 21-й день эксперимента животные подвергались дополнительно максимальной физической нагрузке: плавали в течение 4 мин с грузом массой 20% от веса тела. ХФН умеренной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 мин. Забор крови производился на 9-й, 15-й и 21-й день эксперимента после физической нагрузки внутрисердечно согласно правилам для гематологических исследований.

Интенсивность свободнорадикального окисления (СРО) в цельной крови исследовали методом люминол-усиленной хемилюминесценции с помощью прибора «Хемилюминомер-003» с компьютерным обеспечением по программе «Кровь» [5]. Первоначально регистрировали базальную хемилюминесценцию (ХЛ) цельной крови — светосумму (СС, у.е.•мин) и максимальную светимость (МС, у.е.). Далее в этих же пробах после инкубации регистрировали ХЛ-индуцированную. С учетом того, что основным источником свободных радикалов в цельной крови являются нейтрофилы, их активации (за счет адгезии к

стеклянной поверхности) способствовала инкубация образцов крови (60 мин при 37<sup>0</sup>С). Параллельно в крови подсчитывали общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу. ХЛ крови выражали в абсолютных величинах и с пересчетом на количество нейтрофилов (10<sup>5</sup>/мл). Вычисляли функциональный резерв нейтрофилов по проценту прироста показателей индуцированного свечения по отношению к показателям базального свечения. Статистическая обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере с помощью пакета программ анализа данных Statistica 6.0. Используются: непараметрический критерий Манна—Уитни, коэффициент корреляции Спирмена.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

При любом виде физической нагрузки в крови изменяется интенсивность свободнорадикальных процессов (табл. 1).

ОФН привела к активации процессов СРО в крови. Светосумма базального свечения возросла на 73,8%, максимальная светимость — на 48,55%. Показатели индуцированного свечения возросли на 135,7% (СС) и 177,2% (МС) относительно контрольных значений. При ХФН умеренной мощности наблюдается постепенное повышение показателей базального свечения относительно контроля: СС увеличилась от 18,2% (9-е сутки) до 42% (21-е сутки); МС от 12% (9-е сутки) до 46% (21-е сутки). При этом индуцированное свечение цельной крови (СС и МС) стало достоверно ниже контрольных значений. ХФН субмаксимальной мощности не изменила значений показателей базального свечения крови, но индуцированное свечение (СС и МС) цельной крови относительно контроля стало достоверно ниже.

Таблица 1

Показатели хемилюминесценции цельной крови крыс при физической нагрузке различной интенсивности ( $M \pm m$ )

Группы сравнения/ показатели		Контроль (n=9)	ОФН (n=9)	ХФН умеренной мощности			ХФН субмаксимальной мощности		
				9-е сутки (n=8)	15-е сутки (n=8)	21-е сутки (n=9)	9-е сутки (n=8)	15-е сутки (n=8)	21-е сутки (n=9)
Базальное свечение	СС, у.е.•мин	0,677±0,02	1,17±0,17 *0,00035	0,80±0,05	0,95±0,04 *0,0008	0,97±0,05 *0,0017	0,75±0,03	0,775±0,04	0,81±0,05
	МС, у.е.	0,276±0,014	0,41±0,04 *0,0006	0,31±0,02	0,37±0,013 *0,0007	0,404±0,02 *0,015	0,29±0,012	0,31±0,015	0,34±0,02
Индукцированное свечение	СС, у.е.•мин	2,66±0,21	6,27±0,065 *0,0004	1,23±0,14 *0,009	1,32±0,16 *0,0005	1,77±0,17 *0,0007	1,07±0,15 *0,001	1,11±0,036 *0,0017	1,31±0,11 *0,009
	МС, у.е.	0,79±0,14	2,19±0,37 *0,008	0,475±0,04 *0,0023	0,49±0,037 *0,0007	0,576±0,06 *0,0011	0,41±0,04 *0,009	0,39±0,015 *0,015	0,43±0,02

\* — достоверность по критерию Манна—Уитни по сравнению с контролем

Таблица 2

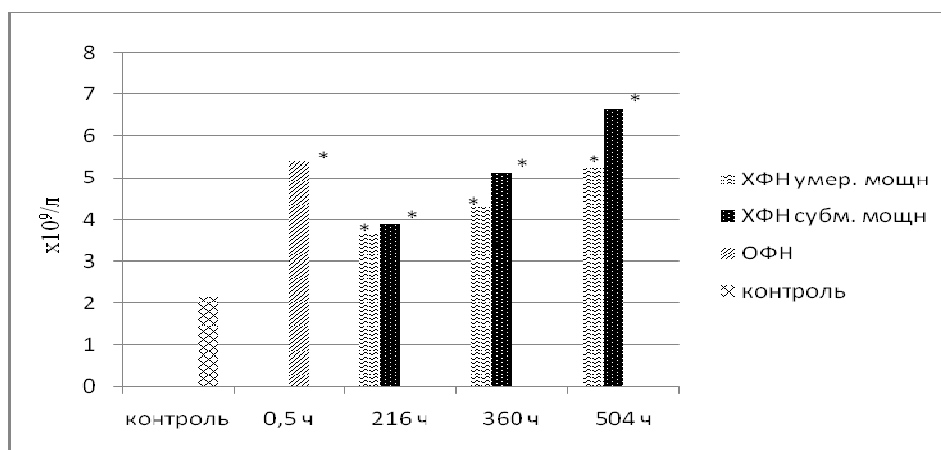
Показатели хемилюминесценции цельной крови крыс при физической нагрузке различной интенсивности в пересчете на нейтрофилы  $\times 10^5$  ( $M \pm m$ )

Группы сравнения/ показатели		Контроль (n=9)	ОФН (n=9)	ХФН умеренной мощности			ХФН субмаксимальной мощности		
				9-е сутки (n=8)	15-е сутки (n=8)	21-е сутки (n=9)	9-е сутки (n=8)	15-е сутки (n=8)	21-е сутки (n=9)
Базальное свечение	СС, у.е.•мин	0,33±0,026	0,23±0,05 *0,012	0,24±0,03 *0,004	0,235±0,02 *0,0011	0,185±0,01 *0,0003	0,203±0,02 *0,034	0,16±0,02 *0,038 ^0,024	0,124±0,01 *0,0001 ^0,0054
	МС, у.е.	0,13±0,01	0,08±0,01 *0,0031	0,13±0,04	0,09±0,01 *0,0011	0,08±0,004 *0,0003	0,08±0,006 *0,0013	0,063±0,006 *0,019 ^0,024	0,052±0,005 *0,0007 ^0,0027
Индукцированное свечение	СС, у.е.•мин	1,29±0,13	1,19±0,13	0,35±0,02 *0,0005	0,34±0,07 *0,0015	0,31±0,003 *0,0003	0,30±0,06 *0,0005	0,33±0,12 *0,0007	0,204±0,02 *0,0003 ^0,019
	МС, у.е.	0,39±0,08	0,41±0,07	0,13±0,01 *0,0041	0,135±0,025 *0,0011	0,11±0,01 *0,003	0,13±0,03 *0,001	0,1±0,025 *0,0017	0,066±0,006 *0,0006 ^0,003
Функциональный резерв нейтрофилов, %		201,11±64,74	443,8±105,4 220,8	65,45±32,2 *0,0036	37,85±11,63 *0,0015	44,93±15,5 *0,001	37,87±13,3 *0,012	27,3±9,6 *0,003	27,5±8,3 *0,004

• — достоверность по критерию Манна—Уитни по сравнению с контролем; ^ — достоверность с аналогичным сроком ХФН умеренной мощности

Основными источниками свободных радикалов в крови являются нейтрофилы, количество и активность которых изменяются при физической нагрузке [7]. Кроме того, само мышечное сокращение активирует нейтрофильную НАДФН-оксидазу, генерирующую активные радикалы кислорода [6].

Все виды нагрузки приводят к достоверному увеличению нейтрофилов в абсолютных числах в 1,5 и более раз (рис. 1).



\* — достоверность по критерию Манна—Уитни по сравнению с контролем

Рис. 1. Изменение количества лейкоцитов и абсолютного числа нейтрофилов в крови крыс при физической нагрузке различной интенсивности  $\times 10^9$  ( $M \pm m$ )

При пересчете интенсивности базальной ХЛ крови на  $\times 10^5$  нейтрофилов СС и МС практически при всех видах нагрузки и во все сроки исследования достоверно снижаются (табл. 2). Индуцированное свечение и функциональный резерв нейтрофилов относительно контроля не изменяются при ОФН, но значительно снижаются при ХФН умеренной и максимальной мощности.

Возрастание базальной и индуцированной ХЛ в цельной крови при ОФН связано с увеличением количества нейтрофилов и сохранением их способности к продукции кислородных радикалов, что подтверждается достоверными положительными корреляционными связями между абсолютным количеством нейтрофилов и СС базальной и индуцированной ХЛ цельной крови и сохранением функционального резерва (табл. 2, 3). При ХФН умеренной мощности тенденция к возрастанию СС базальной ХЛ на 9-е сутки связана с количеством лейкоцитов, но не с ростом их функциональной активности. На 15-е, 21-е сутки достоверные связи между базальной ХЛ крови и количеством нейтрофилов отсутствуют, появляются отрицательные связи, хотя и недостоверные, между количеством нейтрофилов и СС индуцированной ХЛ, что согласуется со снижением показателей их функционального резерва. При ХФН субмаксимальной мощности интенсивность свободнорадикальных процессов в крови не связана с количеством нейтрофилов, что

доказывается появлением достоверной отрицательной связи между базальной ХЛ и количеством нейтрофилов на 21-е сутки нагрузки при достоверном снижении их функционального резерва во все сроки наблюдения.

**Таблица 3**

Корреляционный анализ между абсолютным количеством нейтрофилов и показателями светосуммы базальной и индуцированной хемилюминесценцией цельной крови крыс при физической нагрузке различной интенсивности  $\times 10^9$  ( $M \pm m$ )

Кол-во нейтрофилов $\times 10^9/\text{л}$ ХЛ цельной крови	ОФН	ХФН умеренной мощности			ХФН субмаксимальной мощности		
		9-е сутки	15-е сутки	21-е сутки	9-е сутки	15-е сутки	21-е сутки
СС базального свечения цельной крови у.е.·мин	0,82 $p \leq 0,05$	0,72 $p \leq 0,05$	0,463	0,459	-0,246	-0,32	-0,61 $p \leq 0,05$
СС индуцированного свечения цельной крови у.е.·мин	0,63 $p \leq 0,05$	-0,23	-0,603	-0,42	-0,56	-0,53	-0,496

Одной из причин снижения функционального резерва нейтрофилов относительно продукции кислородных радикалов может быть ограничение «респираторного взрыва» в нейтрофилах при абсолютном или относительном дефиците кислорода вследствие физической нагрузки и/или кислородного долга. Показано, что при тяжелой гипоксии, вызванной массивной острой кровопотерей, СРО в крови снижается [3]. Наше исследование в определенной мере объясняет механизм снижения функциональной активности нейтрофилов у спортсменов в спорте высших достижений [7].

#### **Выводы:**

1. Физическая нагрузка любой интенсивности приводит к изменению свободнорадикальных процессов в цельной крови: при ОФН возрастает как базальное, так и индуцированное свечение; ХФН умеренной мощности сопровождается возрастанием базального свечения (СС, МС) на 15–21-е сутки и снижением индуцируемого свечения (СС, МС) на 9–21-е сутки; при ХФН субмаксимальной мощности базальное свечение (СС, МС) не изменяется, индуцированное свечение снижается.
2. Интенсивность свободнорадикальных процессов в цельной крови при физических нагрузках связана как с функциональным состоянием нейтрофильных лейкоцитов, так и с их количественными изменениями.

#### **Список литературы**

1. Ермолаева Е.Н., Кривохижина Л.В. Дислипидемия при хронических физических нагрузках различной интенсивности // Фундаментальные исследования. – 2015. — № 1-6. – С. 1147–1151.

2. Краснов А.Ф., Самоданова Г.И., Усик С.В., Яковлев Н.Н. Уровень молочной кислоты в крови как показатель реакции на физические нагрузки // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. – 1978. – Т. 64, № 4. – С. 538–542.
3. Кривожижина Л.В., Нестеров М.И., Кантюков С.А., Ермолаева Е.Н. Свободнорадикальное окисление в крови при кровопотере различной степени тяжести // Научное обозрение, 2014. – № 6. – С. 121–124.
4. Сазонова Т.Г., Глазачев О.С., Болотова А.В. и др. Адаптация к гипоксии и гипероксии повышает физическую выносливость: роль активных форм кислорода и редокс сигнализации // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2012. — Т. 98, № 6. — С. 793–807.
5. Фархутдинов Р.Р., Клебанов. Г.И. Антиоксиданты. Антиоксидантная активность. Методы исследования // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 2. – С. 108–117.
6. Babior В.М. The neutrophil NADPH oxidase/ В.М. Babior, J.D. Lambeth, W. Nauseef // Archives of Biochemistry and Biophysics — 2002. Vol. 397, № 2. – P. 342–344.
7. Natale V.M. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise / V.M. Natale, I.K. Brenner, A.I. Moldoveanu et all.// Sao Paulo Med. J. — 2003. Vol. 121, № 1. — P. 9–14.
8. Powers S.K. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle / S.K. Powers, E.E. Talbert, P.J. Adhihetty // J. Physiol. — 2011. Vol. 589, № 9. — P. 2129–2138.
9. Sen C. K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction // Medicine and Science in Sports and Exercise – 2001. Vol. 33, №. 3. – P. 368–370.
9. Vasilaki A. Genetic modification of the manganese superoxide dismutase/glutathione peroxidase 1 pathway influences intracellular ROS generation in quiescent, but not contracting, skeletal muscle cells /A. Vasilaki, M. Csete, D. Pye et all. // Free Radic. Biol. Med. — 2006. Vol. 41. — P. 1719–1725.

**Рецензенты:**

Цейликман В.Э, д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «ЮУГМУ», г. Челябинск;

Колесников О.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии ГБОУ ВПО «ЮУГМУ», г. Челябинск.