

АНТИОКСИДАНТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ УМЕРЕННОЙ МОЩНОСТИ

Кривохижина Л.В., Ермолаева Е.Н., Кантюков С.А.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: ermen33@mail.ru

Хроническую физическую нагрузку умеренной мощности моделировали на крысах ежедневным плаванием в течение 30 минут – 21 день. На 9, 15 и 21 день эксперимента животные подвергались дополнительно физической нагрузке: плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20 % от веса тела. Церулоплазмин вводился на 1, 4 и 7 сутки физической нагрузки, в суммарной дозе 60 мг/кг массы тела. Забор крови производили на 9, 15, 21 сутки через 15–20 минут после нагрузки. При нагрузке активируются свободнорадикальные процессы в цельной крови и сыворотке; увеличивается содержание общих, первичных и промежуточных продуктов перекисного окисления липидов; возрастает общая антиокислительная активность. Введение церулоплазмина приводило к снижению хемилюминесценции цельной крови и продукции свободных радикалов нейтрофильными лейкоцитами. Церулоплазмин способствовал снижению железоиндуцированной хемилюминесценции сыворотки крови и нормализации содержания общих, первичных, промежуточных продуктов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: физическая нагрузка, церулоплазмин, свободнорадикальное окисление, хемилюминесценция.

ANTIOXIDANT EFFECTIVENESS OF CERULOPLASMIN IN CHRONIC PHYSICAL EXERTION OF MODERATE POWER

Krivokhizhina L.V., Ermolaeva E.N., Kantyukov S.A.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: ermen33@mail.ru

Chronic physical activity of moderate power was modeled in rats by swimming daily for 30 minutes for 21 days. 9, 15 and 21 day of experiment, animals were subjected to further physical exertion: floated for 4 minutes with a load weighing 20% of body weight. Ceruloplasmin was administered at 1, 4 and 7 day physical activity, total dose 60 mg/kg of body weight. The blood tests were carried out on 9, 15, 21 days after 15 to 20 minutes after exercise. When the load is activated free radical processes in whole blood and serum; increases the content of total, primary and intermediate lipid peroxidation products; increasing total antioxidant activity. Introduction ceruloplasmin resulted in a decrease in chemiluminescence of whole blood and the production of free radicals by neutrophilic leukocytes. Ceruloplasmin contributed to the decline iron - induced chemiluminescence of blood serum and normalize the content of total, primary, intermediate products of lipid peroxidation.

Keywords: physical activity, ceruloplasmin, free radical oxidation, chemiluminescence.

Следствием различных видов физических нагрузок, как у юных спортсменов, так и спортсменов высокой квалификации является активация свободнорадикального окисления (СРО), что расценивается как универсальный механизм реагирования организма [14]. Однако интенсивность и продолжительность повышения СРО имеют определенную зависимость от уровня тренированности, аэробных возможностей организма, характера физических нагрузок (вид, интенсивность, частота, продолжительность), преобладающих механизмов энергообеспечения мышечной работы [16, 6]. Актуальным является вопрос об управлении свободнорадикальными процессами с целью профилактики и коррекции их негативных последствий. В организме существует многоуровневая система (клеточная и внеклеточная; ферментативная и неферментативная), контролирующая СРО. К регуляторам широкого спектра биохимических и физиологических процессов в организме относится

церулоплазмин, механизмы влияния которого реализуются, в том числе и через его антиоксидантные свойства [8, 10, 11, 9].

Цель исследования – в условиях эксперимента определить эффективность влияния церулоплазмينا (ЦП) относительно интенсивности СРО цельной крови и сыворотки при хронической физической нагрузке умеренной мощности.

Материалы и методы. Исследование проведено на белых беспородных крысах. Все эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных. Хроническая физическая нагрузка умеренной мощности моделировалась ежедневным плаванием в течение 30 минут – 21 день. На 9, 15 и 21 день эксперимента, животные подвергались дополнительно физической нагрузке: плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20 % от веса тела. Подобная экспериментальная модель аналогична тренировочному циклу подготовки спортсменов к соревновательному периоду. Забор крови производили на 9, 15, 21 сутки через 15–20 минут после нагрузки. Церулоплазмин вводился 3 раза (на 1, 4 и 7 сутки физической нагрузки) в суммарной дозе 60 мг/кг массы тела. Интенсивность СРО в цельной крови исследовали хемилюминесцентным методом в присутствии люминола на приборе «Хемилюминомер-003» с компьютерным обеспечением [12, 2]. Первоначально регистрировали базальную хемилюминесценцию (ХЛ) цельной крови: светосумму (СС) и максимальную светимость (МС). 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 минут при 37 °С). Параллельно в крови подсчитывали общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу. ХЛ крови выражали в абсолютных величинах и с пересчетом на количество нейтрофилов (10^5 /мл). Интенсивность пероксидации, как составляющей СРО, изучали методом железоиндуцированной хемилюминесценции сыворотки крови [12, 2]. Оценивали спонтанную и железоиндуцированную хемилюминесценцию (добавлением Fe^{2+} - 50 мкМ). Регистрацию хемилюминесценции сыворотки крови осуществляли на хемилюминомере ХЛ-003 с компьютерным обеспечением.

Продукты ПОЛ в крови оценивали спектрофотометрическим методом в изопропаноловой фракции с расчетом индексов окисления [3]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия [13]; активность каталазы определяли в цветной реакции с молибдатом аммония [7]; активность глутатион – редуктазы оценивали по способности окислять НАДН при длине волны 340 нм [1]; содержание церулоплазмينا оценивали модифицированным методом Равина по способности окислять р-фенилендамин [5]. Общую антиокислительную

активность (ОАО) оценивали фотометрическим тестом ImAnOx(TAS/TAC) Kit фирмы Immundiagnostik (Германия) по степени подавления оксидации в присутствии перекиси водорода. Статистическая обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере с помощью пакета программ анализа данных Statistica 6.0. Для оценки достоверности полученных результатов использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

Результаты исследования

ХФН умеренной мощности приводила к постепенному повышению базального свечения (СС и МС) в цельной крови относительно контроля. При этом индуцированное свечение цельной крови (СС и МС) было достоверно ниже контрольных значений (таблица 1). Основными источниками свободных радикалов в крови являются нейтрофилы, количество которых при физической нагрузке возрастает в 1,5 раза. При пересчете интенсивности базальной и индуцированной ХЛ крови на $\times 10^5$ нейтрофилов СС и МС достоверно снижаются (таблица 2). Показатели индуцированного свечения нейтрофилов к 21 суткам снижаются примерно в 3 раза. Таким образом, возрастание ХЛ цельной крови обусловлено увеличением в крови нейтрофильных лейкоцитов на фоне снижения их способности к продукции радикалов.

Введение ЦП при ХФН способствовало еще большему уменьшению продукции свободных радикалов нейтрофилами (15, 21 сутки); на 9–21 снижалась МС индуцированного свечения (таблица 2). Следствием этого было достижение нормальных величин базального свечения (СС и МС) в цельной крови, а СС и МС индуцированного свечения на 21 сутки приобретали самые низкие значения (таблица 1).

При физической нагрузке в сыворотке крови не изменялась спонтанная светимость (СПС), постепенно повышались: СС, амплитуда быстрой и медленной вспышки. ЦП не влиял на СПС, амплитуду медленной вспышки; на 21 сутки нормализовал амплитуду быстрой вспышки; повышал длительность латентного периода. В итоге под влиянием ЦП снижалась, но не нормализовалась светосумма свечения (таблица 3).

Таблица 1

Влияние ЦП на ХЛ цельной крови при физической нагрузке умеренной мощности (M±m)

Группы сравнения/ показатели		Контроль (n=9)	ХФН умеренной мощности			ХФН + ЦП		
			9 сутки (n=8)	15 сутки (n=8)	21 сутки (n=9)	9 сутки (n=8)	15 сутки (n=8)	21 сутки (n=9)
Базальное свечение	СС, у.е.•мин	0,677±0,02	0,80±0,05	0,95±0,04*	0,97±0,05*	0,65±0,059	0,71±0,03^	0,74±0,04^
	МС, у.е.	0,276±0,014	0,31±0,02	0,37±0,013*	0,404±0,02*	0,22±0,01*^	0,24±0,018^	0,27±0,016^
Индукциро- ванное свечение	СС, у.е.•мин	2,66±0,21	1,23±0,14*	1,32±0,16*	1,77±0,17*	1,05±0,06*	1,11±0,058*	1,22±0,07*^
	МС, у.е.	0,79±0,14	0,475±0,04*	0,49±0,037*	0,578±0,06*	0,33±0,017*^	0,36±0,023*^	0,41±0,019*^

* – достоверность ($p \leq 0,05$) относительно контроля; ^ – достоверность относительно аналогичного срока физической нагрузки.

Таблица 2

Влияние ЦП на ХЛ нейтрофилов ($\times 10^5$) при физической нагрузке умеренной мощности (M±m)

Группы сравнения/ показатели		Контроль (n=9)	ХФН умеренной мощности			ХФН + ЦП		
			9 сутки (n=8)	15 сутки (n=8)	21 сутки (n=9)	9 сутки (n=8)	15 сутки (n=8)	21 сутки (n=9)
Базальное свечение	СС, у.е.•мин	0,33±0,026	0,24±0,03*	0,235±0,02*	0,185±0,01*	0,154±0,016*	0,133±0,015*^	0,13±0,01*^
	МС, у.е.	0,13±0,01	0,13±0,04	0,09±0,01*	0,08±0,004*	0,052±0,003*	0,045±0,006*^	0,047±0,004*^
Индукцирован- ное свечение	СС, у.е.•мин	1,29±0,13	0,35±0,02*	0,34±0,07*	0,31±0,03*	0,248±0,015*^	0,20±0,017*	0,21±0,02*
	МС, у.е.	0,39±0,08	0,13±0,01*	0,135±0,025*	0,11±0,01*	0,078±0,004*^	0,066±0,008*^	0,07±0,006*^

* – достоверность ($p \leq 0,05$) относительно контроля; ^ – достоверность относительно аналогичного срока физической нагрузки.

Таблица 3

Влияние ЦП на ХЛ сыворотки крови при физической нагрузке умеренной мощности ($M \pm m$)

Группы сравнения/ показатели	Контроль (n=9)	ХФН умеренной мощности			ХФН+ЦП умеренной мощности		
		9 сутки (n=8)	15 сутки (n=8)	21 сутки (n=9)	9 сутки (n=8)	15 сутки (n=8)	21 сутки (n=9)
СС, у.е.•мин	3,09±0,1	4,73±0,21*	5,63±0,29*	5,65±0,14*	3,72±0,15*^	4,62±0,11*^	4,77±0,21*^
СПС, у.е.•мин	0,22±0,06	0,15±0,05	0,14±0,06	0,23±0,07	0,14±0,05	0,14±0,05	0,14±0,06
Амплитуда быстрой вспышки, у.е.	1,41±0,04	1,68±0,09	2,00±0,16	2,07±0,14*	1,78±0,16	1,64±0,096	1,58±0,07^
Амплитуда медлен- ной вспышки, у.е	1,65±0,05	2,67±0,13	3,02±0,15*	3,04±0,06*	2,24±0,1* 0,30	2,76±0,07* 0,22	2,91±0,09* 0,30
Длительность латентного периода, мм	17,82±0,69	18,78±1,37	19,33±1,32	21,11±1,06	24±1,36*	25,11±1,59*^	28,78±2,07*^

* – достоверность ($p \leq 0,05$) относительно контроля; ^ – достоверность относительно аналогичного срока физической нагрузки.

Таблица 4

Влияние ЦП на продукты ПОЛ в крови при физической нагрузке умеренной мощности ($M \pm m$)

Группы сравнения/ показатели	Контроль (n=10)	ХФН умеренной мощности			ХФН +ЦП		
		9 сутки (n=10)	15 сутки (n=10)	21 сутки (n=11)	9 сутки (n=10)	15 сутки (n=10)	21 сутки (n=11)
$\Sigma = 220$ ед/мл	2,99±0,21	4,01±0,31	4,10±0,14*	4,43±0,24*	3,41±0,17	3,54±0,27	3,59±0,17^
$\Sigma = 232$ ед/мл	1,28±0,095	1,96±0,16*	1,80±0,09*	2,17±0,08*	1,78±0,17	1,77±0,09*	1,55±0,14^
$\Sigma = 278$ ед/мл	0,80±0,06	1,125±0,10*	1,22±0,12*	1,34±0,09*	0,95±0,11	1,00±0,11	1,03±0,13

$\Sigma = 400$ ед/мл	0,059±0,02	0,08±0,013	0,15±0,37	0,13±0,03	0,12±0,02	0,11±0,03	0,11±0,03
232/220 у.е.о	0,43±0,02	0,52±0,07	0,45±0,04	0,50±0,036	0,53±0,04	0,53±0,05	0,45±0,056
278/220 у.е.о	0,27±0,023	0,295±0,03	0,31±0,04	0,31±0,03	0,28±0,03	0,30±0,06	0,31±0,05

* – достоверность ($p \leq 0,05$) относительно контроля; ^ – достоверность относительно аналогичного срока физической нагрузки.

Таблица 5

Влияние ЦП на компоненты антиокислительной системы в крови при физической нагрузке умеренной интенсивности (M±m)

Показатели/ сроки	Контроль (n=10)	ХФН умеренной мощности			ХФН +ЦП		
		9 сутки (n=10)	15 сутки (n=10)	21 сутки (n=11)	9 сутки (n=15)	15 сутки (n=11)	21 сутки (n=14)
СОД, ед/мл	1,46±0,11	0,70±0,10*	0,90±0,15*	1,22±0,12	0,84±0,12*	1,045±0,11	1,01±0,10*
Каталаза мкат/л	22,61±3,38	12,31±0,98*	18,41±1,24	24,67±2,86	21,99±2,18^	23,67±1,54^	25,77±1,54
Глутатион- редуктаза МЕ	8,04±0,32	11,69±0,71*	14,04±1,14*	13,92±1,31*	11,22±0,805*	13,17±0,88*	15,84±0,65*
ЦП мг/л	333,95±22,87	439,32±18,27*	451,09±24,01*	481,23±23,71*	450,92±15,75*	455,65±15,04*	475,59±19,62*
ОАА мкмоль/л	211,5±3,94	не смотрели	не смотрели	262,72±11,97*	не смотрели	не смотрели	284,38±19,15*

* – достоверность ($p \leq 0,05$) относительно контроля; ^ – достоверность относительно аналогичного срока физической нагрузки.

В крови при нагрузке возрастали общие, первичные и промежуточные продукты ПОЛ. За счет параллельного возрастания общих, первичных и промежуточных продуктов ПОЛ, их индексы окисления не изменялись. Под влиянием ЦП к 9 сутками произошла нормализация общих и промежуточных продуктов, к 21 суткам – первичных продуктов ПОЛ (таблица 4).

ХФН умеренной мощности влияла на состояние антиокислительной системы. В частности, к 9 суткам снижалась активность СОД и каталазы при восстановлении их активности к 21 суткам. Активность глутатион-редуктазы, содержание ЦП (9–21 сутки) были повышены. На 21 сутки была повышена общая антиокислительная активность (ОАА). Введение ЦП приводило лишь к нормализации активности каталазы (таблица 5).

Обсуждение

Итак, при ХФН умеренной мощности активируются свободнорадикальные процессы в цельной крови и ПОЛ в сыворотке. Это является следствием миогенного лейкоцитоза и нагрузочной гипоксии с дальнейшей реализацией компенсаторно-адаптивных процессов. Гипоксия инициирует образование активных форм кислорода с последующим развертыванием свободно-радикальных и перекисных реакций через умеренную мобилизацию эндогенных жирных кислот и стимуляцию симпатoadреналовой системы. Кислородные радикалы являются факторами формирования активированного состояния митохондрий. Кроме того, свободнорадикальные реакции обеспечивают поддержание интенсивного энергетического обмена и привлечения продуктов свободнорадикального окисления к метаболическим процессам. Основное действие ЦП при ХФН умеренной мощности проявилось на уровне нейтрофилов. Трехкратное введение ЦП приводило к снижению продукции свободных радикалов нейтрофильными лейкоцитами и ХЛ цельной крови. ЦП противостоял снижению активности каталазы, увеличивал длительность латентного периода, который в литературе рассматривается в качестве интегрального показателя мощности антиокислительной системы [4]. Восстановление активности каталазы под влиянием ЦП может быть связано с его дисмутирующей способностью. Указывается, что ЦП обладает СОД активностью [9, 4]. В плазме крови его действие аналогично действию клеточной СОД. Он восстанавливает O_2 с помощью пары Si^{2+} до H_2O , перехватывает свободные кислородные радикалы и предохраняет липидосодержащие структуры от их повреждающего действия [9]. ЦП в отличие от СОД не катализирует реакцию диспропорционирования, а взаимодействуют с предшественниками O_2 радикалов. Восстановление активности каталазы под влиянием ЦП может быть связано с дополнительным разрушением O_2 и защитой каталазы от его инактивирующего влияния, при этом снижается вероятность восстановления трехвалентного железа и возможность образования $OH\cdot$, который служит прооксидантом ПОЛ [4]. Некоторые авторы считают ЦП

антиоксидантом, который вызывает обрыв цепи свободных радикалов, перехватывает супероксидные радикалы, ингибирует аутоокисление липидов, не связывая эти эффекты с его ферроксидазной активностью [9]. Кроме того, ЦП может способствовать накоплению в клетках антиоксиданта глутатиона [15]. Все это может быть объяснением факта нормализации содержания общих, первичных и промежуточных продуктов ПОЛ и снижению железоиндуцированной ХЛ сыворотки крови под влиянием ЦП.

Выводы

1. При ХФН умеренной мощности активируются свободнорадикальные процессы в цельной крови и ПОЛ в сыворотке; возрастает общая антиокислительная активность.
2. Трехкратное введение ЦП в суммарной дозе 60 мг/кг массы тела приводило к снижению продукции свободных радикалов нейтрофильными лейкоцитами и ХЛ цельной крови.
3. ЦП увеличивал длительность латентного периода, отражающего суммарную мощность антиокислительной системы, тем самым способствовал снижению железоиндуцированной ХЛ сыворотки крови и нормализации содержания общих, первичных, промежуточных продуктов ПОЛ.

Список литературы

1. Вербалович В.П., Подгорная Л. М. Определение активности глутатион – редуктазы и СОД на биохимическом анализаторе // Лаб. дело. – 1987. – № 2. – С.17–19.
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
3. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. и др. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах крови // Вопр. мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127-131.
4. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение) // Физиологические и клинико-биохимические аспекты. – СПб.: Изд-во Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – Москва: МЕДпресс-информ, 2009. – 896с.
6. Кантюков С.А., Ермолаева Е.Н., Кривохижина Л.В. Свободнорадикальное окисление в цельной крови при физических нагрузках различной длительности и интенсивности // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6; URL:www.science-education.ru/130-23081 (дата обращения 21.04.2016).

7. Королюк М.А., Иванова Л. И., Майорова А.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16–19.
8. Кривохижина Л.В., Климова Е.В., Ермолаева Е.Н. Гематологические эффекты церулоплазмينا // Патологическая физиология органов и систем. Типовые патологические процессы. Материалы II Российского конгресса по патологической физиологии. – 2000. – С. 93-94.
9. Мжельская Т.И. Биологические функции церулоплазмينا и их дефицит при мутациях генов, регулирующих обмен меди и железа (обзор) // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 8. – С.124–133.
10. Осиков М.В., Кривохижина Л.В., Ермолаева Е.Н., Климова Е.В., Макаров Е.В., Кантюков С.А. Патологические эффекты церулоплазмينا // Здравоохранение Башкортостана. – 2005. – № 7. – С. 99-100.
11. Сурина-Марышева Е.Ф., Кривохижина Л.В., Кантюков С.А., Сергиенко В.И., Ермолаева Е.Н., Смирнов Д.М. Влияние церулоплазмينا на количество и резистентность эритроцитов при острой физической нагрузке // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 8. – С. 151-153.
12. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно – радикального окисления в биологии и медицине. – Уфа: Изд-во БГМИ, 1995. – 90 с.
13. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
14. Djordjevic D., Cubrilo D., Macura M. et al. The influence of training status on oxidative stress in young male handball players // Mol. Cell. Biochem. – 2011. – Vol. 351, № 1-2. – P. 251-259.
15. Park Y.S., Suzuki K., Taniguchi N. et al. Glutathione peroxidase – like activity of ceruloplasmin as an important lung antioxidant // FEBS Letters. – 1999. – N. 458. – P.133-136.
16. Pesic S., Jakovljevic V., Djordjevic D. et al. Exercise-induced changes in redox status of elite karate athletes // Chin. J. Physiol. – 2012. – Vol. 55, № 1. – P. 8-15.