

## РОЛЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ОТНОСИТЕЛЬНО КОРРЕКЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ОСТРОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Ермолаева Е.Н.<sup>1</sup>, Кривохижина Л.В.<sup>1</sup>, Кантюков С.А.<sup>1</sup>, Яковлева В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, e-mail: ermen33@mail.ru

---

Цель исследования – в условиях эксперимента выяснить влияние церулоплазмина на интенсивность свободнорадикального окисления в крови и сыворотке при острой физической нагрузке. Следствием острой физической нагрузки у нетренированных крыс является увеличение свободных радикалов за счет активации свободнорадикальных процессов в цельной крови, сыворотке крови при неоднозначном изменении активности и содержания антиоксидантов. Предварительное введение церулоплазмина в дозе 50 % от физиологического уровня не приводит к нормализации свободнорадикальных процессов в крови и сыворотке. В крови не нормализуются абсолютные значения базальной и индуцированной хемилюминесценции (светосумма, максимальная светимость). В сыворотке крови на фоне повышения латентного периода, интегрального показателя мощности антиоксидантов, не снижаются показатели железиндуцированной хемилюминесценции (светосумма свечения, амплитуда быстрой и медленной вспышки), остаются повышенными первичные продукты перекисного окисления липидов.

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

## THE ROLE OF CERULOPLASMIN ON THE CORRECTION OF FREE RADICAL OXIDATION IN ACUTE EXERCISE

Ermolaeva E.N.<sup>1</sup>, Krivokhizhina L.V.<sup>1</sup>, Kantyukov S.A.<sup>1</sup>, Yakovleva V.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>South Ural State Medical University (SUSMU), Chelyabinsk;

<sup>2</sup>Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, e-mail: ermen33@mail.ru

---

The aim of the study in the experiment to determine the influence of ceruloplasmin on the intensity of free radical oxidation in blood and serum during acute physical exertion. Effect of acute exercise in untrained rats is the increase of free radicals due to activation of free radical processes in whole blood, serum despite the controversial change in the activity and content of antioxidants. Prior administration of ceruloplasmin in the dose of 50 % of the physiological level does not lead to normalization of free radical processes in the blood and serum. In the blood are not normalized absolute values of basal and induced chemiluminescence (light sum, maximum luminosity). In the blood serum to the increase of the latent period, the rate of integral antioxidants capacity is not reduced indicators of iron induced chemiluminescence (light sum of the illumination, the amplitude of the fast and slow flash), remain elevated primary products of lipid peroxidation

Keywords: acute exercise, ceruloplasmin, free radical oxidation, chemiluminescence.

Интенсивные физические нагрузки запускают окислительный стресс, значительно возрастающий в состоянии перенапряжения [13, 6]. Для коррекции негативных последствий физической нагрузки, особенно у недостаточно тренированных людей, и восстановления работоспособности эффективным может быть использование эндогенных веществ мультифакторного действия, в том числе и антиоксидантной направленности действия [12,9]. К группе подобных веществ относится церулоплазмин, функции которого разнообразны: главный антиоксидант крови; участник метаболизма железа; способен влиять на клеточный состав крови, гемостаз, проявления дислипидемии и др. [11,14,1].

**Цель** исследования – в условиях эксперимента выяснить влияние церулоплазмينا (ЦП) на интенсивность свободнорадикального окисления в крови и сыворотке при острой физической нагрузке.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на белых беспородных крысах, массой 200–250 грамм. Все эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных. Было сформировано три группы животных. Первая группа (контрольная) – интактные животные. Вторая группа – моделировалась острая физическая нагрузка (ОФН). Нетренированные крысы плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20 % от массы тела. Третья группа – за сутки до нагрузки однократно вводился церулоплазмин (НПО «Иммунопрепарат», Уфа) в дозе 50 % от физиологической концентрации в крови. Забор крови производился через 15–20 минут после физической нагрузки.

Интенсивность СРО в цельной крови исследовали методом люминол-усиленной хемилюминесценции (ХЛ) [15, 3]. Регистрировали базальную и индуцированную хемилюминесценцию цельной крови: светосумму (СС, у.е.·мин) и максимальную светимость (МС, у.е.) [2]. Показатели базальной и индуцированной ХЛ рассчитывали на  $10^5$  нейтрофильных лейкоцитов.

Интенсивность пероксидации липидов, как составляющей СРО, изучали методом железоиндуцированной хемилюминесценции сыворотки крови [15, 3].

Продукты ПОЛ в крови оценивали спектрофотометрическим методом в изопропаноловой фракции [4]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия [16]; активность каталазы определяли в цветной реакции с молибдатом аммония [8]; активность глутатионредуктазы оценивали по способности окислять НАДН при длине волны 340 нм [2]; уровень церулоплазмينا оценивали модифицированным методом Равина по способности окислять p-фенилендамин [7]. 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**

ОФН привела к активации процессов СРО в цельной крови (табл. 1). Базальное свечение: светосумма (СС) возросла на 42 %, максимальная светимость (МС) на 48 %. СС индуцированного свечения увеличилась на 136 %, МС на 177 %. ОФН сопровождается

миогенным лейкоцитозом, причем происходит достоверное увеличение нейтрофилов в абсолютных числах в 1,5 раза по сравнению с контролем. Пересчет на нейтрофильные лейкоциты, так как они являются основными источниками свободных радикалов, показал, что снижается базальное свечение (СС и МС) на 32 и 26 % соответственно; индуцированное свечение не меняется. Церулоплазмин практически не влияет на ХЛ цельной крови и производство свободных радикалов нейтрофильными лейкоцитами, способствуя лишь снижению относительно контроля СС индуцированного свечения при пересчете на нейтрофилы.

Таблица 1

Хемилюминесценция цельной крови при острой физической нагрузке и при введении церулоплазмينا ( $M \pm m; \sigma$ )

Группы сравнения/ показатели		Контроль (n=9)	ОФН (n=9)	ОФН+ЦП (n=9)
Базальное свечение	СС, у.е.•мин	0,677±0,02 0,07	1,17±0,17* 0,51	1,18±0,06* 0,18
	МС, у.е.	0,276±0,014 0,04	0,41±0,04* 0,12	0,4±0,02* 0,06
Индуцированное свечение	СС, у.е.•мин	2,66±0,21 0,63	6,27±0,65* 1,97	4,39±0,61* 1,84
	МС, у.е.	0,79±0,14 0,43	2,19±0,37* 1,12	1,48±0,28* 0,85
Базальное свечение в пересчете на 10 <sup>5</sup> нейтрофилов	СС, у.е.•мин	0,33±0,026 0,08	0,23±0,05* 0,14	0,24±0,02* 0,07
	МС, у.е.	0,13±0,01 0,03	0,08±0,01* 0,036	0,082±0,008* 0,02
Индуцированное свечение в пересчете на 10 <sup>5</sup> нейтрофилов	СС, у.е.•мин	1,29±0,13 0,39	1,19±0,13 0,4	0,87±0,09* 0,29
	МС, у.е.	0,39±0,08 0,26	0,41±0,07 0,22	0,29±0,04 0,13

Достоверность по критерию Манна – Уитни: \* – относительно контроля; ^ – относительно ОФН.

Острая физическая нагрузка не приводит к увеличению спонтанной светимости сыворотки крови, что говорит о сохранении стационарного состояния оксиданты-антиоксиданты (табл. 2). При ОФН возрастает СС за счет амплитуды быстрой вспышки, отражающей процессы накопления гидроперекисей липидов, и амплитуды медленной вспышки, максимально возможной интенсивности пероксидации липидов (ПОЛ). ЦП не изменяет спонтанную светимость сыворотки крови, не снижает светосумму свечения и амплитуду медленной вспышки; снижает, но не нормализует амплитуду быстрой вспышки; повышает длительность латентного периода, отражающего суммарную антиоксидантную активность сыворотки крови.

Таблица 2

Хемиллюминесценции сыворотки крови при острой физической нагрузке и при введении церулоплазмина ( $M \pm m$ ;  $\sigma$ )

Группы сравнения/ показатели	Контроль (n=9)	ОФН (n=9)	ОФН+ЦП (n=9)
Спонтанная светимость, у.е.•мин	0,22±0,06; 0,23	0,23±0,05; 0,18	0,19±0,04; 0,11
Светосумма свечения, у.е.•мин	3,09±0,10; 0,42	4,87±0,19*;0,71	4,56±0,13*; 0,40
Амплитуда быстрой вспышки, у.е.	1,41±0,04; 0,15	2,07±0,096*; 0,35	1,68±0,1*^ 0,33
Амплитуда медленной вспышки, у.е.	1,65±0,05; 0,21	2,67±0,09*; 0,33	2,77±0,09*; 0,31
Длительность латентного периода, мм	17,82±0,69; 2,83	19,69±1,17; 4,21	28,4±0,85*^; 2,67

Достоверность по критерию Манна – Уитни: \* – относительно контроля; ^ – относительно ОФН.

В крови при нагрузке возрастает содержание общих, первичных и промежуточных продуктов ПОЛ (табл. 3). Введение ЦП приводит к нормализации общих и промежуточных продуктов ПОЛ.

Таблица 3

Динамика продуктов ПОЛ в сыворотке крови при острой физической нагрузке и при введении церулоплазмина ( $M \pm m$ ;  $\sigma$ )

Показатели/ сроки	Контроль (n=10)	ОФН (n=9)	ОФН +ЦП (n=10)
$\Sigma = 220$ ед/мл	2,99±0,21; 0,63	3,74±0,19*; 0,58	3,69±0,28; 0,84
$\Sigma = 232$ ед/мл	1,28±0,095; 0,30	1,86±0,15*; 0,44	1,81±0,13*; 0,38
$\Sigma = 278$ ед/мл	0,804±0,06; 0,21	1,26±0,14*; 0,43	1,13±0,13; 0,39
$\Sigma = 400$ ед/мл	0,059±0,02; 0,06	0,155±0,07; 0,24	0,084±0,03; 0,10

Достоверность по критерию Манна – Уитни: \* – относительно контроля; ^ – относительно ОФН.

Состояние антиоксидантной системы в сыворотке крови при острой физической нагрузке и введении ЦП представлено в таблице 4. В сыворотке крови при ОФН снижается активность каталазы, не изменяется активность СОД и глутатион-редуктазы, повышается церулоплазмин и общая антиокислительная активность. Глутатион-редуктаза, восстанавливающая окисленный глутатион, функционально связана с глутатион-пероксидазой. Введение ЦП приводит к повышению его в крови, нормализации активности

каталазы, увеличению активности глутатион-редуктазы относительно контроля, не влияя на мощность общей антиокислительной активности.

Таблица 4

Антиокислительные системы в сыворотке крови при острой физической нагрузке и при введении ЦП ( $M \pm m; \sigma$ )

Показатели/ сроки	Контроль (n=10)	ОФН (n=9)	ОФН +ЦП (n=10)
СОД, ед/мл	1,46±0,11; 0,40	1,22±0,20; 0,59	1,5±0,18; 0,55
Каталаза, мкат/л	22,84±3,38; 14,36	11,73±1,51*; 4,53	19,67±2,89; 8,66
Глутатионредуктаза, МЕ	8,04±0,32; 1,12	11,49±1,77; 5,01	13,21±1,46*; 4,13
ЦП, мг/л	333,95±22,87; 79,23	498,745±37,37*; 118,18	612,68±27,7*^; 87,64
ОАА, мкмоль/л	216,7±3,94; 18,95	255,6±7,05*; 33,86	253,89±6,69*; 20,09

\* – достоверность по критерию Манна – Уитни относительно контроля; ^ – относительно ОФН.

**Обсуждение.** В настоящее время многочисленные публикации посвящены генерации активных форм кислорода их физиологическому и патологическому действию [10, 5]. Следствием ОФН у нетренированных крыс является увеличение свободных радикалов за счет активации свободнорадикальных процессов в цельной крови, наиболее вероятно связанных с миогенным лейкоцитозом. Это предположение подтверждается снижением СС и МС базального свечения при пересчете на нейтрофилы. Потенциальная способность нейтрофилов к продукции радикалов при ОФН не изменяется, так как величины индуцированного свечения в пересчете на нейтрофилы остаются в пределах контрольных значений. Железоиндуцированная ХЛ и содержание продуктов ПОЛ в сыворотке крови указывают на интенсификацию пероксидации липидов. При ОФН имеется дисбаланс между ферментативными и неферментативными антиоксидантами и возрастание церулоплазмينا, длительности латентного периода и общей антиокислительной активности не компенсирует свободнорадикальную нагрузку. Кроме того, отсутствуют согласованные изменения активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы. Указывается, что активность, стабильность и согласованное действие ключевых ферментов должны быть взаимосвязаны, так как СОД, каталаза, глутатионпероксидаза могут инактивироваться одним из продуктов их ферментативной реакции [5, 17,18]. Более того, продукты ПОЛ являются потенциальными ингибиторами глутатионпероксидазы [5]. Церулоплазмин относится к высокомолекулярным неферментативным антиоксидантам. Антиоксидантные свойства церулоплазмينا связаны с

хелаторным действием относительно двухвалентных ионов меди, способностью окислять двухвалентное железо и дисмутацией супероксидного анион-радикала [5]. Предварительное введение церулоплазмина не достаточно эффективно относительно ХЛ цельной крови и сыворотки. В крови нет нормализации абсолютных значений базальной и индуцированной ХЛ (светосуммы и максимальной светимости), несмотря на снижение функциональной возможности нейтрофилов к продукции свободных радикалов после введения ЦП. В сыворотке крови на фоне повышения латентного периода не нормализуются – светосумма свечения, амплитуда быстрой и медленной вспышки, первичные продукты ПОЛ. Введение церулоплазмина не способствует дополнительному повышению мощности общей антиокислительной активности (ОАА), но приводит к возрастанию активности каталазы и глутатиоредуктазы. Таким образом, в условиях интенсивной генерации свободных радикалов предварительное введение церулоплазмина не достаточно эффективно. Более того, существует опасность, что церулоплазмин, как металл-связывающий белок, при окислительном стрессе, снижении рН крови и окислительной деструкции может быть источником активных форм металлов переменной валентности [5], провоцирующих свободнорадикальное окисление.

### **Выводы**

У нетренированных крыс предварительное однократное введение церулоплазмина в дозе 50 % от физиологического уровня не приводит к нормализации свободнорадикальных процессов в крови и сыворотке, инициированных острой физической нагрузкой.

### **Список литературы**

1. Ващенко В. И., Ващенко Т. Н. Биология и фармакология церулоплазмина: от эксперимента до лекарственной терапии // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 31–44.
2. Вербалович В.П., Подгорная Л. М. Определение активности глутатион – редуктазы и СОД на биохимическом анализаторе // *Лаб. дело.* – 1987. – № 2. – С.17–19.
3. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Успехи биологической химии.* – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
4. 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.

5. 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.
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](http://www.science-education.ru/130-23081) (дата обращения 21.04.2016).
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – Москва: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
8. Королюк М.А., Иванова Л. И., Майорова А.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16–19.
9. Кривохижина Л.В., Климова Е.В., Ермолаева Е.Н. Гематологические эффекты церулоплазмينا // Патофизиология органов и систем. Типовые патофизиологические процессы. Материалы II Российского конгресса по патофизиологии. – 2000. – С. 93-94.
10. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Шергин С.М. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты. – Новосибирск, 1994. – 203 с.
11. Осиков М.В., Кривохижина Л.В., Ермолаева Е.Н., Климова Е.В., Макаров Е.В., Кантюков С.А. Патофизиологические эффекты церулоплазмينا // Здравоохранение Башкортостана. – 2005. – № 7. – С. 99-100.
12. Рожкова Е.А., Панюшкин В.В., Сейфулла Н.Р. и др. Карнозин и антиоксиданты природного происхождения как средства профилактики острого посленагрузочного окислительного стресса // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т.70, № 5. – С. 44-46.
13. Сазонова Т.Г., Глазачев О.С., Болотова А.В. и др. Адаптация к гипоксии и гипероксии повышает физическую выносливость: роль активных форм кислорода и редок с сигнализации // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2012. – Т. 98, № 6. – С. 793-807.
14. 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.
15. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно – радикального окисления в биологии и медицине. – Уфа: Изд-во БГМИ, 1995. – 90 с.
16. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. –

C. 678–681.

17. Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2000. – Vol. 29, №. 11. – P. 1106–1114.

18. Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D. et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals // *Mech Ageing Dev.* – 1990. – Vol. 51, № 3. – P. 283–297.