

ВЛИЯНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ

© 2018 г. Е. Н. Ермолаева¹, С. А. Кантюков¹, В. И. Петухова¹,
Е. Ф. Сурина-Марышева²

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации Челябинск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный
исследовательский университет)», Челябинск, Россия

Поступила: 07.05.2018. Принята: 11.06.2018

Физическая нагрузка моделировалась в эксперименте на 59 белых беспородных крысах. Хроническую физическую нагрузку субмаксимальной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 минут. Нагрузку увеличивали постепенно: первые семь дней животные ежедневно плавали без груза, следующие две недели животные плавали с грузом 2% от массы тела. На 9, 15 и 21 день эксперимента, животные подвергались дополнительно максимальной 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 проводился на 9, 15 и 1 сутки эксперимента. Интенсивность свободнорадикального окисления в цельной крови исследовали методом люминол-усиленной хемилюминесценции. В условиях эксперимента на крысах показано, что при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности снижается продукция свободных радикалов в нейтрофилах. Введение церулоплазмина не приводит к восстановлению сниженной продукции свободных радикалов нейтрофильными лейкоцитами при физической нагрузке.

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

DOI: 10.31857/S102872210002395-9

Адрес: 454092 Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ермолаева Елена Николаевна.

Тел.: +79517810486, 8(3512)2327467. **E-mail:** ermen33@mail.ru

Авторы:

Ермолаева Е. Н., к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Кантюков С. А., к.м.н., доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Петухова В. И., к.м.н., ст. преподаватель кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Сурина-Марышева Е. Ф., к.б.н., с.н.с. Института спорта, туризма и сервиса ФГАОУ ВО ЮУРГУ (НИУ), Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Снижение физической работоспособности спортсменов в результате предельных повтор-

ных физических нагрузок, вызывающих состояние острого перенапряжения, сопровождается развитием окислительного стресса на фоне угнетения системы антиокислительной защиты организма [1]. Однако, интенсивность и продолжительность повышения свободнорадикального окисления имеют определенную зависимость от уровня тренированности, аэробных возможностей организма, характера физических нагрузок (вид, интенсивность, частота, продолжительность), преобладающих механизмов энергообеспечения мышечной работы [2]. Свободные радикалы играют важную роль, как в инициации, так и в прогрессировании повреждения мышечных волокон после интенсивной физической нагрузки. Актуальным является вопрос выбора антиоксидантов, действие которых приведет к снижению скорости образования активных форм кислорода. Сегодня не существует

универсального средства, которое могло бы нейтрализовать все свободные радикалы, участвующие в развитии окислительного стресса, провоцирующего патологические процессы. Одним из эндогенных антиоксидантов крови является церулоплазмин, обладающий мультифакторным действием, возможно он может оказать свой эффект при физической нагрузке [3].

Цель исследования — в условиях эксперимента определить эффективность влияния церулоплазмينا относительно интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) в цельной крови при хронической физической нагрузке (ХФН) субмаксимальной мощности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на белых беспородных крысах массой 200–250 грамм. Эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите животных. ХФН субмаксимальной мощности моделировалась ежедневным плаванием в течение 30 минут: первые семь дней крысы ежедневно плавали без груза, следующие две недели плавали с грузом 2% от массы тела. 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. Забор крови производили на 9, 15, 21 сутки через 15–20 минут после нагрузки. Церулоплазмин (ЦП) вводился на 1, 4 и 7 сутки физической нагрузки, в суммарной дозе 60 мг/кг массы тела, что составляет 50% от его физиологического уровня в сыворотке крови. Контрольная группа — интактные крысы.

Интенсивность СРО в цельной крови исследовали методом люминол-усиленной хемилюминесценции с помощью прибора «Хемилюминомер-003» с компьютерным обеспечением [4]. 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 минут при 37°C. Параллельно в крови подсчитывали общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу. ХЛ крови выражали в абсолютных величинах и с пересчетом на количество нейтрофилов (1×10^5 /мл).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета программ анализа данных Statistica 6.0. Достоверность различий между группами рассчитывали по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В цельной крови при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности не изменяются показатели светосуммы и максимальной светимости базального свечения, снижаются лишь показатели индуцированной ХЛ на 9–21 сутки (табл. 1). В пересчете на нейтрофилы (10^5) снижаются СС и МС как базального, так и индуцированного свечения во все сроки исследования. Введение ЦП при ХФН субмаксимальной мощности способствовало достоверному снижению МС базального свечения цельной крови на 21 сутки эксперимента и на 9–21 сутки СС и МС индуцированного свечения (табл. 1), что свидетельствует об уменьшении продукции свободных радикалов нейтрофилами. При пересчете интенсивности базальной и индуцированной ХЛ крови на 10^5 нейтрофилов ЦП еще больше снизил эти показатели. ЦП обладая неспецифическим лейкопоэтическим эффектом, увеличивает количество нейтрофилов без изменения их способности генерировать свободные радикалы. Введение ЦП не приводит к восстановлению интенсивности ХЛ в крови в абсолютных и относительных величинах при ХФН субмаксимальной мощности.

ОБСУЖДЕНИЕ

При физических нагрузках субмаксимальной мощности, стресс становится основным повреждающим фактором, он инициирует развитие гипоксии. Гипоксия инициирует образование активных форм кислорода с последующим разветвлением свободно-радикальных и перекисных реакций через умеренную мобилизацию эндогенных жирных кислот и стимуляцию симпатoadреналовой системы [5]. Накопление эндогенного кислорода в процессе свободнорадикальных реакций обеспечивает поддержание интенсивного энергетического обмена и привлечения продуктов свободнорадикального окисления к метаболическим процессам [6]. При этом изменение уровня продуктов перекисного окисления липидов и активности антиоксидантных ферментов имеют определенную зависимость

Таблица 1. Влияние ЦП на показатели ХЛ цельной крови при ХФН субмаксимальной мощности ($M \pm m$)

Группы сравнения/ показатели		Контроль (n=9)	ХФН субмаксимальной мощности			ХФН субмаксимальной мощности + 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)
ХЛ цельной крови								
Базальное свечение	СС, у.е. • мин	0,677±0,02	0,75±0,03	0,775±0,04	0,80±0,05	0,702±0,046	0,71±0,04	0,722±0,03
	МС, у.е.	0,276±0,014	0,29±0,012	0,31±0,015	0,34±0,02	0,26±0,001	0,28±0,014	0,29±0,02
Индуци- рованное свечение	СС, у.е. • мин	2,66±0,21	1,07±0,15*	1,11±0,036*	1,31±0,11*	1,08±0,03*	1,14±0,136*	1,25±0,105*
	МС, у.е.	0,79±0,14	0,41±0,04*	0,39±0,015*	0,43±0,02*	0,32±0,014*	0,36±0,06*	0,38±0,02*
ХЛ цельной крови в пересчете на нейтрофилы ($\times 10^5$)								
Базальное свечение	СС, у.е. • мин	0,33±0,03	0,203±0,02*	0,16±0,02*	0,124±0,01*	0,146±0,014*	0,13±0,013*	0,11±0,009*
	МС, у.е.	0,13±0,01	0,08±0,006*	0,063±0,006*	0,052±0,005*	0,054±0,005*	0,05±0,005*	0,04±0,005*
Индуци- рованное свечение	СС, у.е. • мин	1,29±0,13	0,30±0,06*	0,33±0,12*	0,204±0,02*	0,22±0,018*	0,204±0,03*	0,18±0,03*
	МС, у.е.	0,39±0,08	0,13±0,03*	0,1±0,03*	0,07±0,006*	0,066±0,005*	0,065±0,006*	0,058±0,005*

Примечание: * – достоверность ($p < 0,05$) по сравнению с контролем; ^ – достоверность по сравнению с аналогичным сроком ХФН субм. мощности

от уровня тренированности [7, 8]. Ключевым моментом в процессах адаптации к физическим нагрузкам является возможность антиоксидантной системы обезвреживать накопленные активные формы кислорода, которые имеют повреждающее влияние на организм и могут приводить к срыву адаптационных механизмов. Показано, что накопление активных форм кислорода играет важную роль в адаптации мышц к физическим нагрузкам путем продукции цитокинов (эритропоэтина, гипоксия-индицибельного фактора), ростовых факторов (фактора роста эндотелия сосудов), гормонов, и модуляцию их действия, изменений скорости ионного транспорта, процессов клеточной пролиферации и апоптоза, увеличения активности антиоксидантных и цитопротективных ферментов [9].

Было показано, что при ХФН субмаксимальной мощности снижено производство радикалов в нейтрофилах, а сохранение ХЛ цельной крови при нагрузке в пределах контрольных значений обусловлено увеличением в крови этих клеток [10]. Одной из причин снижения функционального резерва нейтрофилов от-

носителю продукции кислородных радикалов может быть ограничение «респираторного взрыва» в нейтрофилах при абсолютном или относительном дефиците кислорода вследствие физической нагрузки и/или кислородного долга, что в определенной мере объясняет механизм снижения функциональной активности нейтрофилов у спортсменов в спорте высших достижений. Интенсивность свободнорадикальных процессов может зависеть не только от интенсивности и длительности физической нагрузки, но и от источника производства свободных радикалов. ЦП выступает в качестве катализатора окислительно-восстановительных реакций, окисляя Fe^{2+} до Fe^{3+} . За счет регуляции обмена железа ЦП стимулирует гемопоэз на уровне синтеза гемоглобина и образования эритроцитов, он рассматривается, как компонент комплексной системы антианемических факторов [11]. ЦП может нормализовать показатели липидов в крови и в клеточных мембранах при физических нагрузках [12]. ЦП может регулировать перекисное окисление липидов, функционируя в качестве перехватчика как су-

пероксидного анион-радикала, так и гипохлорита. Он восстанавливает O_2^- с помощью пары Si^{2+} до H_2O , перехватывает свободные кислородные радикалы и предохраняет липидосодержащие структуры от их повреждающего действия [13]. Таким образом, действие ЦП не затрагивает НАДФН-оксидазную систему нейтрофилов, не происходит восстановления функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов относительно производства свободных радикалов при ХФН субмаксимальной мощности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Panyushkin V.V., Rozhkov E.A., Tulova E.A. et al. Mechanisms of limiting physical performance hemodynamic disorders in microcirculation link. *Bulletin of Sport Science*, 2013, (2), 25–30.
2. Pesic S., Jakovljevic V., Djordjevic D. et al. Exercise-induced changes in redox status of elite karate athletes. *Chin J Physiol*, 2012, 55 (1), 8–15.
3. Сурина-Марышева Е. Ф., Кривохижина Л. В., Кантюков С. А. и др. Влияние церулоплазмينا на количество и резистентность эритроцитов при острой физической нагрузке. Бюл эксперим биол и мед, 2009, 148(8), 151–153. [Surina-Marysheva E. F., Krivokhizhina L. V., Kantyukov S. A. et al. Effect of ceruloplasmin on the number and resistance of erythrocytes in acute physical exertion. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, 148(8), 151–153. Russian].
4. Фархутдинов Р. Р., Лиховских В. А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине, Уфа: Изд-во БГМИ, 1995, 90. [Farkhutdinov R. R., Likhovskiy V. A. Chemiluminescent methods for studying free radical oxidation in biology and medicine, Ufa: Izdatelstvo BGMI, 1995, 90. Russian].
5. Heinonen I., Kemppainen J., Kaskinoro K. et al. Effects of adenosine, exercise, and moderate acute hypoxia on energy substrate utilization of human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012, 302(3), 385–390.
6. Little J. P., Safdar A., Wilkin G. P. et al. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol*, 2010, 588 (6), 1011–1022.
7. Finaud J., Scislawski V., Lac G., Durand D. et al. Antioxidant status and oxidative stress in professional rugby players: evolution throughout a season. *Int J Sports Med*, 2006, 27(2), 87–93.
8. Silva L. A., Silveira P. C. L., Ronsani M. M. et al. Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise. *Cell biochemistry and function*, 2011, 29(1), 43–49.
9. Powers S. K., Talbert E. E., Adhietty P. J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J. Physiol*, 2011, 589 (9), 2129–2138.
10. 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. [Kantyukov S.A., Ermolaeva E.N., Krivokhizhina L.V. Free radical oxidation in whole blood during physical exertions of various duration and intensity. *Modern problems of science and education*, 2015, 6: URL: www.science-education.ru/130–23081 Russian].
11. Мжельская Т. И. Биологические функции церулоплазмينا и их дефицит при мутациях генов, регулирующих обмен меди и железа. Бюл эксперим биол и мед, 2000, 130 (8), 124–133. [Mzhelskaya T. I. Biological functions of ceruloplasmin and their deficiency in mutations of genes that regulate the exchange of copper and iron. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2000, 130(8), 124–133. Russian].
12. Ермолаева Е. Н., Кривохижина Л. В. Церулоплазмин в коррекции дислипидемии, вызванной хронической физической нагрузкой субмаксимальной мощности в эксперименте. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2016, 79(6), 9–11. [Ermolaeva E. N., Krivokhizhina L. V. Ceruloplasmin in correction of dyslipidemia caused by chronic physical exercise of submaximal power in the experiment. *Experimental and Clinical Pharmacology*, 2016, 79(6), 9–11. Russian].
13. Ващенко В. И., Ващенко Т. Н. Церулоплазмин: от метаболита до лекарственного средства. Психофармакология и биологическая наркологию, 2006, 6(3), 1254–1269. [Vashchenko V.I., Vaschenko T.N. Ceruloplasmin: from the metabolite to the drug. *Psychopharmacology and biological narcology*, 2006, 6(3), 1254–1269. Russian].

IMPACT ON CERULOPLASMIN ON THE CHEMILUMINESCENCE OF NEUTROPHILS IN CHRONIC SUBMAXIMAL EXERCISE CAPACITY

© 2018 E. N. Ermolaeva¹, S. A. Kantukov¹, V. I. Petuhova¹,
E. F. Surina-Marysheva²

¹FSBEI of Higher Education "South Ural State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation Chelyabinsk, Russia;

²FSAEI of Higher Education "South Ural State University (National Research University)", Chelyabinsk, Russia

Received: 07.05.2018 Accepted: 11.06.2018

Exercise simulated in an experiment on 59 white rats. 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. Blood sampling was carried out on 9, 15 and 21 days after the experiment exercise intracardiac. Ceruloplasmin was administered on the 1st, 4th and 7th day of physical activity, in a total dose of 60 mg / kg of body weight. The intensity of free radical oxidation in whole blood was investigated by luminol-enhanced chemiluminescence. Under experimental conditions in rats, it was shown that in the case of chronic physical exercise of submaximal power, the production of free radicals in neutrophils decreases. The introduction of ceruloplasmin does not lead to a reduction in the reduced production of free radicals by neutrophilic leukocytes during physical activity.

Key words: physical activity, free radical oxidation, ceruloplasmin, chemiluminescence

Authors:

Ermolaeva E. N., ✉ PhD, associate professor, Department of Normal Physiology, South Federal Medical University of the Ministry of Health of Russia; Chelyabinsk, Russia;

454092 Chelyabinsk, South Federal Medical University of the Ministry of Health of Russia.

Phone: +79517810486, 8(3512)2327467. **E-mail:** ermen33@mail.ru;

Kantukov S. A., PhD, associate professor, Department of biological chemistry, South Federal Medical University of the Ministry of Health of Russia; Chelyabinsk, Russia;

Petuhova V. I., PhD, senior lecturer, Department of Normal Physiology, South Federal Medical University of the Ministry of Health of Russia; Chelyabinsk, Russia;

Surina-Marysheva E. F., PhD, senior researcher, Institute of Sport, Tourism and Service of the SUSU; Chelyabinsk, Russia.