

УДК 612.017.2

К.П. Базарин <sup>1</sup>, Н.М. Титова <sup>2</sup>

### ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ РЕГБИСТОВ

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН (Красноярск)<sup>2</sup> ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (Красноярск)

Исследована динамика уровня малонового диальдегида (МДА), активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и глутатион-S-трансферазы (GST) в плазме крови профессиональных регбистов в течение годового тренировочно-соревновательного макроцикла.

Уровень МДА существенно превышает контрольный на протяжении всего года. Концентрация МДА достигает максимума в окончании соревновательного периода и не восстанавливается за период отдыха. Активность СОД и КАТ существенно снижена и не возвращается к контрольным значениям в течение года. Указанные изменения подтверждают хроническую декомпенсацию в системе антиоксидантной защиты. Ведущим ферментом, реализующим защиту от активных форм кислорода в плазме крови спортсменов, является глутатион-S-трансфераза, компенсаторное повышение активности которой достигает 660 % относительно уровня контрольной группы.

**Ключевые слова:** спорт, физическая нагрузка, активные формы кислорода, система антиоксидантной защиты

### DYNAMIC CHANGES IN ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM IN BLOOD SERUM OF PROFESSIONAL RUGBY PLAYERS

К.П. Bazarin <sup>1</sup>, N.M. Titova <sup>2</sup><sup>1</sup> Scientific Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk<sup>2</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk

The dynamics of the level of malondialdehyde (MDA), activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase was investigated in blood serum of professional rugby players during one year training and competitive season.

The MDA level significantly exceeds control level during all the year. The maximum of MDA concentration is registered at the end of competition period and isn't restored during the period of rest. The SOD and CAT activity is significantly reduced and doesn't return to control levels during the year. These changes prove chronic decompensation in the antioxidant defense system. In athletes glutathione-S-transferase is the leading enzyme realizing protection against reactive oxygen species in blood serum of sportsmen. Compensatory increase of its activity is 660 % in reference to the level of control group.

**Key words:** sport, physical activity, reactive oxygen species, antioxidant defense system

#### ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) в последние годы привлекают значительное внимание исследователей [6, 7]. Считается, что АФК составляют отдельную систему в организме, участвующую как в ряде физиологических функций, так и во многих патологических процессах. Знание механизмов работы данной системы важно для понимания как закономерностей физиологического функционирования тканей организма в норме, так и особенностей течения многих патологических процессов и выбора способов активного влияния на них; оно способно дать возможность для разработки технологий лечения многих заболеваний, продления жизни, роста физических возможностей организма человека.

Высокий уровень физических нагрузок, характерный для спорта, оказывает существенное влияние на

систему АФК, вызывая комплекс изменений в ферментных системах. Эти изменения могут как носить положительный, компенсаторный характер, так и, в ряде случаев, приводить к декомпенсации, угнетению активности антиоксидантных механизмов, накоплению в тканях АФК с развитием повреждений.

Незначительный физиологический уровень АФК в мышечных клетках необходим для нормального сокращения [11]. Умеренный уровень оксидативного стресса при физической нагрузке полезен, так как свободные радикалы, выделяющиеся при разрушении мышечной ткани, являются важными регуляторами процессов репарации, которая лежит в основе адаптации мышечной ткани к нагрузке. АФК в диапазоне концентраций от низкой до средней модулируют сигнальные пути клеток и регулируют экспрессию множества генов, в том числе кодирующих ферменты

системы антиоксидантной защиты, белки теплового шока, ферменты системы репарации ДНК и ферменты дыхательной цепи [13]. Высокоинтенсивная и длительная физическая нагрузка ведет к оксидативному повреждению белковых и липидных структур сокращающихся миоцитов.

Защита организма от АФК осуществляется антиоксидантной системой (АОС). АОС включает низкомолекулярные антиоксиданты (АО) и систему ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения глутатиона и аскорбата, дисмутирующих активные формы кислорода и элиминирующих пероксиды [2]. Выделяют следующие ферменты, реализующие функции защиты от АФК: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза (GST), глутатионредуктаза.

Активность ферментов системы антиоксидантной защиты не является постоянной и может меняться, в частности, в зависимости от паттернов физической активности индивидуума [1, 9]. Так, ряд исследований показывает, что тренировка на выносливость ведет к увеличению активности СОД с 20 % до 112 %, росту активности глутатионпероксидазы с 20 % до 177 % [10], причем отмечается увеличение активности как цитозольной, так и митохондриальной глутатионпероксидазы. Степень увеличения активности указанных ферментов зависит от интенсивности и продолжительности тренировки. Увеличение активности ферментов возникает под влиянием как аэробной, так и анаэробной нагрузки [8]. Считается, что адаптационные механизмы запускаются по причине того, что АФК выступают в роли сигнальных молекул, стимулируя экспрессию генов системы антиоксидантной защиты, а также иных защитных процессов, например, таких, как репарация ДНК [8]. Важно отметить, что некоторые гены системы антиоксидантной защиты могут быть активированы достаточно быстро в ответ на патологический процесс, связанный с увеличением уровня АФК, например, при острой инфекции, интоксикации, гипоксии, ишемии. Другие же гены активируются гораздо медленнее и отвечают за адаптацию организма к длительно действующим факторам – таким, например, как изменившиеся условия окружающей среды, изменившиеся энергетические затраты [9].

Тем не менее, несмотря на значительное внимание, уделяемое в последнее время исследованиям в данной области, практически отсутствует информация о долговременных изменениях в работе системы антиоксидантной защиты в условиях систематических высоких физических нагрузок.

#### МЕТОДЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие спортсмены мужского пола, члены профессиональной регбийной команды. Количество обследуемых – 30 человек, возраст –  $25,3 \pm 3,1$  года. В качестве контрольной группы обследовано 24 условно здоровых лица мужского пола, возраст –  $22,1 \pm 2,3$  лет, не имеющих регулярных высоких физических нагрузок.

Образцы венозной крови у каждого из спортсменов забирались трижды в течение года – в конце подготовительного, соревновательного (состояние максимальной усталости) и переходного (отдых) периодов; у лиц из контрольной группы – однократно. Кровь забирали из локтевой вены утром, натощак, в состоянии покоя, как минимум через 12 часов после окончания физической нагрузки, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Цельную гепаринизированную кровь центрифугировали в течение 15 мин при 1700 g, осторожно отбирали плазму и сохраняли при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа.

В плазме крови оценивалась активность ферментов, устраняющих АФК: супероксиддисмутаза, дисмутирующей супероксидные анион-радикалы, и каталазы, расщепляющей пероксид водорода, а также глутатион-S-трансферазы, элиминирующей продукты перекисного окисления липидов и эндонобиотики.

Активность СОД определялась по степени ингибирования аутоокисления адреналина в щелочной среде при длине волны 347 нм, активность каталазы – по скорости разложения перекиси водорода, концентрацию которой определяли по образованию окрашенных в желтый цвет комплексов с молибденовокислым аммонием. Активность GST анализировали по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между ГSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом. Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион-S-ХДНБ).

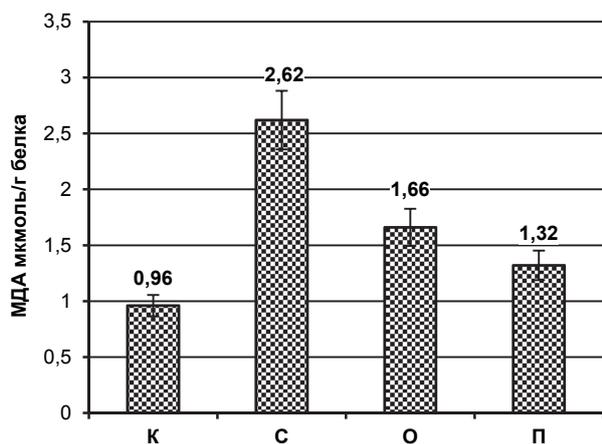
Степень окислительного стресса в плазме крови оценивали по уровню малонового диальдегида, вторичного продукта ПОЛ. Содержание МДА определяли по образованию окрашенных комплексов с 2-тио-барбитуровой кислотой с максимумом поглощения при 532 нм.

Определение содержания белка осуществляли с использованием набора фирмы VITAL DIAGNOSTICS SPb (Санкт-Петербург).

Достоверность различий средних величин показателей активности ферментов с соответствующими данными, полученными в контрольной группе, оценивали по непараметрическому U-критерию Манна – Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc.).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В плазме крови спортсменов в окончании соревновательного периода уровень МДА превышал контрольный на 174 % ( $p < 0,05$ ), после отдыха – на 85 % ( $p < 0,05$ ), в окончании подготовительного периода – на 60 % ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контрольной величиной (рис. 1). Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [11, 14]. Важной особенностью стоит считать то, что, несмотря на период отдыха длительностью порядка 30 дней, отсутствует снижение уровня МДА до величин, сходных с контрольными. Это позволяет предположить формирование в ходе соревновательного периода существенной декомпенсации в системе антиоксидантной защиты.



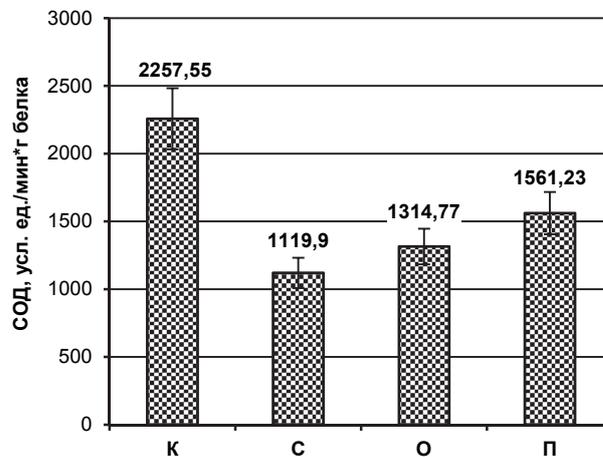
**Рис. 1.** Содержание малонового диальдегида в плазме крови (мкмоль/г белка): К – контрольная группа; С – спортсмены в окончании соревновательного периода; О – спортсмены в окончании переходного периода (отдых); П – спортсмены в окончании подготовительного периода.

Хорошо известно наличие трех типов СОД в организме человека: цитоплазматическая (СОД<sub>1</sub>), митохондриальная (СОД<sub>2</sub>) и экстрацеллюлярная (СОД<sub>3</sub>). Высокомолекулярная форма СОД хорошо связывается гепаринсульфатом гликокаликса эндотелиоцитов и защищает их от свободных радикалов. В плазме крови определялась преимущественно внеклеточная СОД<sub>3</sub>, так как СОД<sub>1</sub> и СОД<sub>2</sub> возникают в значимых концентрациях в крови лишь при повреждении тканей, гемолизе.

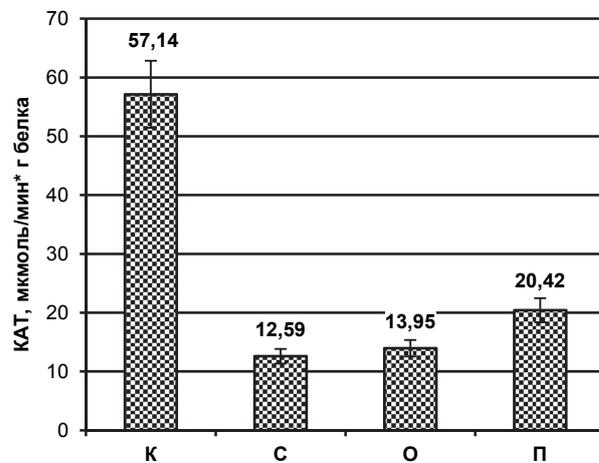
У спортсменов активность СОД была снижена, по сравнению с контролем, в окончании соревновательного периода на 47 % ( $p < 0,05$ ), после отдыха – на 37 % ( $p < 0,05$ ), в окончании подготовительного периода – на 26 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). Казалось, что следовало бы ожидать противоположной динамики активности фермента как компенсаторного ответа на повышение уровня образования АФК при физической нагрузке. Однако, как показано в работе Т.В. Сологуб с соавт. [5], компенсаторная активация СОД сыворотки крови истощается примерно к 3-м суткам. Таким образом, в условиях систематических высоких физических нагрузок мы наблюдаем истощение активности СОД сыворотки крови, не возвращающееся к нормальным значениям ни за период отдыха, ни в ходе подготовительного периода.

Аналогичные изменения обнаружены и в активности каталазы (рис. 3), однако для данного фермента степень угнетения еще более выражена. Так, в окончании соревновательного периода активность каталазы ниже уровня контрольной группы на 75 % ( $p < 0,05$ ), после окончания переходного периода изменений практически не наблюдается – активность ниже, чем в контрольной группе, на 73 % ( $p < 0,05$ ). В окончании подготовительного периода активность остается ниже контрольного уровня на 60 % ( $p < 0,05$ ). Выраженное некомпенсируемое истощение данного вида антиоксидантной защиты является следствием именно длительного пребывания организма в условиях оксидативного

стресса, что, в частности, подтверждается исследованиями Ю.В. Кубриковой с соавт., в которых обнаружено компенсаторное увеличение активности КАТ у рабочих, занятых на вредном производстве с небольшим стажем работы, и существенное снижение активности данного фермента у рабочих со стажем, превышающим 5 лет [3].



**Рис. 2.** Активность супероксиддисмутазы в плазме крови (усл. ед./мин\*г белка): К – контрольная группа; С – спортсмены в окончании соревновательного периода; О – спортсмены в окончании переходного периода (отдых); П – спортсмены в окончании подготовительного периода.

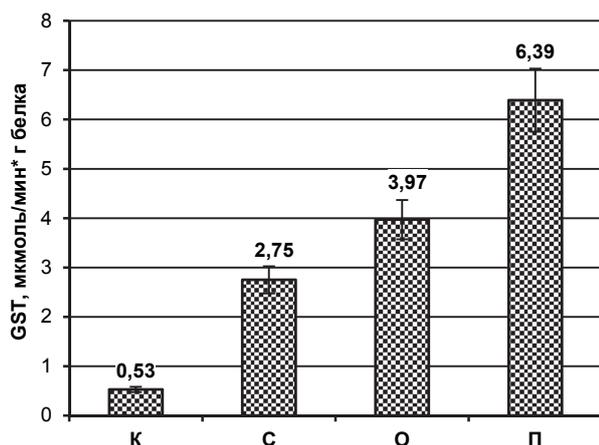


**Рис. 3.** Активность каталазы в плазме крови (мкмоль/мин\*г белка): К – контрольная группа; С – спортсмены в окончании соревновательного периода; О – спортсмены в окончании переходного периода (отдых); П – спортсмены в окончании подготовительного периода.

Изменения активности глутатион-S-трансферазы в плазме крови спортсменов носят иной характер (рис. 4). Так, в окончании соревновательного периода активность фермента повышена на 243 % ( $p < 0,05$ ) относительно уровня контрольной группы, после отдыха – на 398 % ( $p < 0,05$ ), в окончании подготовительного периода – на 660 % ( $p < 0,05$ ). Эти результаты согласуются с литературными данными, где показано компенсаторное повышение активности ферментов системы антиоксидантной защиты и глутатион-S-трансферазы

в частности в диапазоне от 20 % до 800 % при высокой физической нагрузке [4, 8, 9, 10, 12]. Учитывая, что GST является ферментом, который за счет восстановленного глутатиона осуществляет прямую регенерацию липоперекисей в мембранах без предварительного фосфолипазного гидролиза, снижая последствия окислительного стресса и эндогенной интоксикации, а также способствует выведению из организма токсичных продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков, компенсаторный рост активности данного фермента в условиях систематических физических нагрузок выглядит вполне закономерным.

Интересно отметить, тем не менее, имеющее место явление угнетения активности фермента вследствие высокой истощающей нагрузки в окончании соревновательного периода, однако возникающее снижение нивелируется исходно чрезвычайно повышенной активностью. Таким образом, можно предположить, что именно глутатион-S-трансфераза является основным ферментом, компенсирующим окислительный стресс при высокой систематической физической нагрузке.



**Рис. 4.** Активность глутатион-S-трансферазы в плазме крови (мкмоль/мин\*г белка): К – контрольная группа; С – спортсмены в окончании соревновательного периода; О – спортсмены в окончании переходного периода (отдых); П – спортсмены в окончании подготовительного периода.

### ВЫВОДЫ

Уровень малонового диальдегида в плазме крови профессиональных регбистов существенно превышает контрольный на протяжении всего годового тренировочно-соревновательного макроцикла. Максимум концентрации МДА достигает в окончании соревновательного периода и не восстанавливается за период отдыха. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в плазме крови существенно снижены и не возвращаются к контрольным значениям в течение года. Указанные изменения подтверждают хроническую декомпенсацию в системе антиоксидантной защиты. Ведущим ферментом, реализующим защиту

от активных форм кислорода в плазме крови спортсменов, является глутатион-S-трансфераза, компенсаторное повышение активности которой достигает 660 % относительно уровня контрольной группы.

### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Базарин К.П., Титова Н.М., Кузнецов С.А. Динамика показателей антиоксидантного статуса у спортсменов, членов команды по спортивному ориентированию // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 5. – С. 9–12.

Bazarin K.P., Titova N.M., Kuznetsov S.A. Dynamics of indices of antioxidant status of sportsmen, orienteering team members // Bul. ESSC SB RAMS. – 2013. – N 5. – P. 9–12. (in Russian)

2. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Труды ИСА РАН. – 2006. – № 19. – С. 50–69.

Dontsov V.I., Krutko V.N., Mrikaev B.M., Ukhonov S.V. Reactive oxygen species as a system: significance in physiology, pathology and natural ageing // Proceedings of Institute of System Analysis RAS. – 2006. – N 19. – P. 50–69. (in Russian)

3. Кубрикова Ю.В., Попова Т.Н., Makeeva A.V. Активность каталазы и супероксиддисмутазы в сыворотке крови людей, работающих в условиях повышенной концентрации металлов в окружающей среде // Успехи современного естествознания. – № 6. – 2011. – С. 50–51.

Kubrikova U.V., Popova T.N., Makeeva A.V. Catalase and superoxididismutase activity in blood serum of people working in the conditions of elevated concentration of metals in the environment // Successes of Modern Natural Science. – 2011. – N 6. – P. 50–51. (in Russian)

4. Савченко А.А., Базарин К.П. Состояние активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах у спортсменов в динамике тренировочного цикла // Ж. Сибирского федерального университета. Биология. – 2013. – № 6 (2). – С. 151–162.

Savchenko A.A., Bazarin K.P. State of activity of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases in neutrophilic granulocytes in athletes in the dynamics of training cycle // J. Siberian Federal University. Biology. – 2013. – N 6 (2). – P. 151–162. (in Russian)

5. Сологуб Т.В., Романцов М.Г., Кремень Н.В. и др. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты). – М.: Академия Естествознания, 2008. – 162 с.

Sologub T.V., Romantsov M.G., Kremen N.V. et al. Free-radical processes and inflammation (pathogenic, clinical and therapeutic aspects). – Moscow: Academy of Natural Science, 2008. – 254 p. (in Russian)

6. Alessio H.M., Hagerman A.E., Fulkerson B.K., Ambrose J. et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise // Medicine and Science in Sports and Exercise. – 2000. – Vol. 32 (9). – P. 1576–1581.

7. Gomez-Cabrera M.C., Domenech E., Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 44 (2). – P. 126–131.
8. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249. – P. 7130–7139.
9. Ko K.M., Godin D.V. Inhibition of transition metal ion-catalysed ascorbate oxidation and lipid peroxidation by allopurinol and oxypurinol // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 40. – P. 803–809.
10. Powers S.K., Jackson M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production // *Physiological Reviews.* – 2008. – Vol. 88 (4). – P. 1243–1276.
11. Radak Z., Chung H.Y., Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 44 (2). – P. 153–159.
12. Ramel A., Wagner K.H., Elmadfa I. Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men // *Br. J. Sports Med.* – 2004. – Vol. 38 (5). – P. 22.
13. Tanskanen M., Atalay M., Uusitalo A. Altered oxidative stress in overtrained athletes // *J. Sports Sci.* – 2010. – Vol. 28 (3). – P. 309–317.
14. Xu X., Arriaga E.A. Qualitative determination of superoxide release at both sides of the mitochondrial inner membrane by capillary electrophoretic analysis of the oxidation products of triphenylphosphonium hydroethidine // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 46 (7). – P. 905–913.

#### Сведения об авторах

**Базарин Кирилл Петрович** – кандидат медицинских наук, сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН (660000, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; e-mail: kpbazarin@gmail.com)  
**Титова Надежда Митрофановна** – кандидат биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660079, г. Красноярск, пр. Свободный, 79; e-mail: tinami@mail.ru)

#### Information about the authors

**Bazarin Kirill Petrovich** – candidate of medical science, officer of Scientific Institute of Medical Problems of the North SB RAMS (Partizan Zheleznyak str., 3g, Krasnoyarsk, 660000; e-mail: kpbazarin@gmail.com)  
**Titova Nadezhda Mitrofanovna** – candidate of medical science, professor of the department of medical biology of Institute of Fundamental Biology and Biotechnologies of Siberian Federal University (Svobodnyi av., 79, Krasnoyarsk, 660079; e-mail: tinami@mail.ru)