

Е.А. Стаценко, Т.В. Серезкина, М.П. Королевич, Е.В. Алькевич

Лабораторные методы оценки состояния антиоксидантной системы организма в процессе занятий спортом

ГУ «НИИ физической культуры и спорта Республики Беларусь»

В статье кратко освещены вопросы негативных аспектов воздействия гипоксии нагрузки на организм спортсмена при продолжительной работе. Дана характеристика основных лабораторных методов оценки состояния антиоксидантной системы. Доказана обоснованность применения показателей суммарной антиоксидантной активности по данным автоматического анализатора антиоксидантов и свободных радикалов Photochem с целью оценки антиоксидантного статуса спортсменов в процессе занятий спортом.

Ключевые слова: антиоксидантная система, спорт, лабораторная диагностика

Согласно общепринятым в настоящее время педагогическим подходам тренировка в условиях природной либо искусственно создаваемой гипоксии и воздействие гипоксии нагрузки при продолжительной работе приводят к развитию адаптационных сдвигов в организме спортсмена и повышению уровня тренированности. Однако положительный тренирующий эффект гипоксии сочетается с целым рядом негативных аспектов ее воздействия, каждый из которых может приводить к ухудшению спортивного результата.

К возможным причинам накопления свободных радикалов кислорода в организме спортсменов относятся стресс, вызываемый чрезмерными физическими нагрузками и психоэмоциональным напряжением, воспалительные реакции, частота которых неуклонно возрастает у квалифицированных спортсменов по мере приближения соревновательного периода вследствие развития постнагрузочного иммунодефицита или иммуносупрессии, гипоксия нагрузки и эпизоды гипероксии, связанные с повышенным потреблением кислорода тканями организма с целью устранения так называемого кислородного долга.

Гипоксия является универсальным патологическим процессом и причиной нарушения клеточного метаболизма, в основе которого лежит недостаточность основной энергообразующей системы – митохондриального окислительного фосфорилирования. Именно нарушению функций митохондрий как главного источника образования свободных радикалов отводят в настоящее время ведущую роль в угнетении системы антиоксидантной защиты организма и активации процессов свободнорадикального окисления. Количество свободных радикалов строго контролируется ферментами антиоксидантной системы, при ингибировании которой увеличение количества свободных радикалов кислорода становится причиной развития многочисленных патологических процессов в

организме. Компоненты антиоксидантной системы делятся на первичные, которые предотвращают образование новых свободных радикалов кислорода (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, церулоплазмин, трансферрин, ферритин), вторичные, которые удаляют свободные радикалы прежде, чем они могут инициировать цепные реакции, повреждающие клетки (α-токоферол, аскорбиновая кислота, бета-каротин, мочевиная кислота, билирубин, альбумин) и третичные – восстанавливают клеточные структуры, поврежденные свободными радикалами кислорода (ферменты восстановления ДНК, метионин-сульфоксидредуктаза). Активность первых двух практически всегда ингибируется в критических состояниях и лишь при своевременном устранении гипоксического фактора в действие вступают третичные ферменты антиоксидантной системы.

При нормальном балансе кислорода в организме оксидазный путь утилизации кислорода (главный процесс выработки энергии в клетке) и оксигеназный путь (в результате которого образуются продукты перекисного окисления липидов) уравновешены. В условиях ишемии либо гипероксигенации наблюдается резкая активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), что способствует нарушению ферментативного обмена в клетках и выходу в кровь протеолитических ферментов и реактогенных веществ, среди которых особое место занимают свободные радикалы кислорода. Обычно в ответ на внешнее воздействие организм спортсменов реагирует активизацией обмена веществ, способствующей адаптации к новым условиям, но в случаях, когда нагрузка превышает способы защиты, происходит нарушение механизмов антиоксидантной защиты с развитием повреждений, обусловленных в первую очередь свободнорадикальными реакциями, что приводит к развитию «окислительного стресса». В результате накопления свободных радикалов кислорода и активации процессов перекисного окисления липидов происходит изменение структуры и функции биомембран, лейкоцитарная инфильтрация тканей, повышение микроваскулярной проницаемости, повреждение нуклеиновых кислот, белков.

Изучение негативных аспектов воздействия гипоксических тренировок на здоровье спортсменов должно быть направлено на исследование явлений развивающегося в условиях гипоксии окислительного стресса, вызываемого тренировочными нагрузками. Так, ранее при обследовании спортсменов мужской и женской национальных команд по гребле академической в подготовительном периоде годичного цикла подготовки, когда в тренировочном процессе преобладают нагрузки на выносливость с аэробным механизмом энергообеспечения, было установлено существенное снижение проницаемости эритроцитарных мембран, или осмотической стойкости эритроцитов, которая является интегральным тестом оценки ПОЛ. Так, % гемолиза у спортсменов мужской национальной команды составил: $5,05 \pm 4,29$ % в 1-й пробирке (при норме 2,78 %), $19,51 \pm 15,62$ % во 2-й пробирке (норма 8,73 %), $47,02 \pm 20,23$ % в 3-й пробирке (норма 17,46 %), $71,52 \pm 20,33$ % в 4-й пробирке (норма 26,73 %), $78,81 \pm 19,15$ % в 5-й пробирке (норма 50,41 %), $87,56 \pm 13,8$ % в 6-й пробирке (норма 88,38 %). У спортсменок женской национальной команды этот показатель составил $6,21 \pm 3,53$, $13,73 \pm 10,05$, $31,34 \pm 14,77$, $45,58 \pm 19,35$, $62,7 \pm 16,68$ и $84,79 \pm 10,92$ % соответственно, что указывает на высокую активность процессов

свободнорадикального окисления у спортсменов. Изучение окислительного стресса позволяет оценить эффективность разрабатываемых способов профилактики и фармакологической защиты от неблагоприятного воздействия гипоксии на организм спортсменов. Все перечисленное определяет актуальность исследования состояния системы антиоксидантной защиты спортсменов различными методами лабораторного контроля.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлось определение обоснованности применения показателей суммарной антиоксидантной активности по данным автоматического анализатора антиоксидантов и свободных радикалов Photochem. Для этого проведено сопоставление результатов оценки суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови спортсменов с результатами нижеперечисленных лабораторных методов определения состояния антиоксидантной системы защиты организма, традиционно используемых в клинической практике.

Материал и методы

Система антиоксидантной защиты может быть подразделена на 2 составляющих звена: ферментативные, или эндогенные, антиоксиданты (каталаза, супероксиддисмутаза и глутатионредуктаза), которые содержатся лишь в определенных частях клетки и предотвращают инициацию цепного свободнорадикального окисления, восстанавливая гидроперекиси без образования свободных радикалов. Вторая группа – неферментативные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, α -токоферол, провитамин А, каротиноиды, соли мочевиной кислоты, билирубин, убихинон, минеральные элементы – Zn, Mg, Se, флавоноиды, полифенолы) способны ловить свободные радикалы напрямую, тем самым блокируя окислительные процессы. Современными лабораторными методами возможно исследование активности отдельных ферментов антиокислительной системы защиты, в некоторых случаях осуществляют селективное определение отдельных неферментативных антиоксидантов. Однако оценка антиоксидантного состояния требует точного определения реальной эффективности защиты биологической системы, что может быть лишь частично сделано перечисленными методами. Так как свободные радикалы, образующиеся в организме, оказывают воздействие на различные компоненты клеток, но прежде всего на содержащие ненасыщенные жирные кислоты липиды плазматических мембран (фосфолипиды, эфирсвязанный холестерол), то для оценки окислительного стресса и, соответственно, активности системы антиоксидантной защиты в плазме и эритроцитах крови определяют содержание первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (малоновый диальдегид), конечных (шиффовы основания) продуктов перекисного окисления липидов, а также концентрацию основного природного антиоксиданта – альфа-токоферола с расчетом показателя коэффициента малоновый диальдегид/токоферол (МДА/ТФ). Определение проницаемости эритроцитарных мембран, или осмотической стойкости эритроцитов является интегральным тестом оценки перекисного окисления липидов.

Помимо оценки активности ПОЛ в настоящее время возможно определение суммарной антиоксидантной активности биологической системы с помощью

метод фотохемилюминесценции на приборе Photochem компании AnalytikJena AG. Данный метод сочетает в себе очень быструю фотохимическую активацию образования радикалов (скорость окислительных реакций в исследуемом образце значительно увеличивается) с высокочувствительным люциметрическим детектированием: свободные радикалы регистрируются по их реакции с хемилюминесцентным веществом за счет измерения излучаемого света. В присутствии веществ, действующих как «ловушки радикалов», интенсивность фотохемилюминесценции убывает как функция концентрации. Результаты определения суммарной антиоксидантной активности представляются в эквивалентных единицах концентрации аскорбиновой кислоты (для водорастворимых веществ) или Trolox (для жирорастворимых веществ) и учитывают общее влияние многих ферментных и неферментных веществ, обладающих антиоксидантной активностью.

Объектом одной части исследования являлись показатели антиоксидантного статуса 30 пловцов в возрасте 14 – 19 лет, имеющих квалификацию от уровня I разряда до мастера спорта (всего 80 случаев обследования), в плазме которых определяли содержание диеновых конъюгатов и диенкетонов, малонового диальдегида, общую антиоксидантную активность плазмы по величине торможения перекисления липидов. Объектом другой части исследования являлись юные спортсмены в возрасте 7 – 15 лет во время прохождения спортивной подготовки в детском спортивно-оздоровительном летнем лагере (30 случаев обследования), в плазме которых определяли уровень а-токоферола. Помимо перечисленного в сыворотке крови всех спортсменов определяли суммарную антиоксидантную активность по водорастворимым (ACW) и жирорастворимым (ACL) веществам на анализаторе Photochem. В сыворотке крови определяли содержание билирубина, мочевой кислоты, общего белка, холестерина и триацилглицеринов.

Содержание первичных продуктов ПОЛ определяли по методике З. Плацер (1970) в модификации В.Б. Гаврилова, В.Н. Мишкорудной (1983) путем их экстракции из плазмы смесью гептан-изопропанол с последующим измерением оптической плотности при длине волны 233 и 278 нм и выражали в DD233 и DD278 на 1 мл плазмы.

Концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом Э.Н. Коробейниковой (1989), основанному на измерении оптического поглощения при длинах волн 535 и 580 нм. Концентрацию ТБКРС рассчитывали с помощью уравнения регрессии: $C=0,21+26,5DD$, где C – концентрация ТБКРС (в наномолях малоновый диальдегид на 1 мл сыворотки); D – показатель $D_{535-580}$ в центрифугате (в единицах оптической плотности).

Общая антиоксидантная активность плазмы (АОА) определялась по величине торможения перекисления липидов какой-либо модели. В качестве субстрата окисления использовалась линоленовая кислота. Данный показатель оценивает суммарное действие присутствующих в плазме ингибиторов перекисления липидов, а не удельный вклад того или иного эндогенного антиоксиданта в общий антиокислительный потенциал плазмы.

Для оценки токсического действия на структуры организма свободных

радикалов кислорода в условиях «окислительного стресса», обусловленного физической нагрузкой, помимо вышеперечисленных показателей антиоксидантного статуса определяли содержание среднемолекулярных пептидов в плазме крови с помощью реакции осаждения под действием хлорной кислоты и этилового спирта с последующей фотометрией при 210 нм. Концентрацию субстратов – билирубина, мочевой кислоты осуществляли ферментативными методами. Исследование биохимических показателей проводилось на биохимическом автоматическом анализаторе EURO Lyser.

Для решения поставленной задачи произвели подсчет коэффициентов корреляции между показателями суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови спортсменов по данным анализатора Photochem, результатами других методов определения состояния антиоксидантной системы защиты организма и определили их достоверность с помощью программного обеспечения Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Результаты статистической обработки, полученных в ходе исследования, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между лабораторными показателями, характеризующими состояние системы антиоксидантной защиты организма спортсмена

Показатель, число случаев обследования	Суммарная антиоксидантная активность по водорастворимым веществам ACW	Суммарная антиоксидантная активность по жирорастворимым веществам ACL
Токоферол, n=30	r=-0,1584 p=0,403	r=0,4943 p<0,005
Диеновые коньюгаты, n=50	r=-0,0050 p=0,974	r=0,1259 p=0,416
Диенкетоны, n=50	r=-0,3358 p=0,026	r=0,2536 p=0,097
Малоновый диальдегид, n=50	r=0,0749 p=0,629	r=-0,1803 p=0,241
Общая антиоксидантная активность плазмы по величине торможения перекисления липидов, n=50	r=0,4539 p=0,002	r=-0,2953 p=0,052
Общий белок, n=76	r=0,2497 p=0,102	r=0,2399 p=0,117
Билирубин общий, n=76	r=-0,1323 p=0,392	r=-0,2906 p=0,056
Мочевая кислота, n=76	r=0,1541 p=0,318	r=0,3560 p=0,018
Содержание среднемолекулярных пептидов, n=76	r=-0,6672 p<0,001	r=0,0878 p=0,571
Холестерин, n=78	r=0,0808 p=0,482	r=0,2866 p=0,011
Триацилглицерин, n=78	r=-0,2452 p=0,031	r=0,1666 p=0,145

Подсчет достоверности корреляции между значениями ACW и ACL показал отсутствие достоверной взаимосвязи между данными показателями (r=-0,0868, n=80, p=0,444).

Обоснованность применения показателя суммарной антиоксидантной

активности по водорастворимым веществам, полученного с помощью автоматического анализатора антиоксидантов и свободных радикалов Photochem подтверждается достоверной отрицательной корреляцией данного показателя с содержанием диенкетонов в плазме крови и достоверной положительной корреляцией с показателем общей антиоксидантной активности плазмы по величине торможения переоисления липидов.

Достоверная отрицательная корреляция показателя ACW с содержанием среднемолекулярных пептидов в плазме, как показателя эндогенной интоксикации, может быть объяснена токсическим действия на структуры организма свободных радикалов кислорода в условиях «окислительного стресса», обусловленного физической нагрузкой.

Обоснованность применения показателя суммарной антиоксидантной активности по жирорастворимым веществам, полученного с помощью автоматического анализатора антиоксидантов и свободных радикалов Photochem подтверждается достоверной положительной корреляцией данного показателя с уровнем а-токоферола в плазме крови.

Не до конца ясно, чем обусловлена достоверная положительная корреляция содержания в плазме крови водорастворимого субстрата с антиоксидантными свойствами – мочевой кислоты и показателя ACL при отсутствии достоверной корреляции с показателем суммарной антиоксидантной активности по водорастворимым веществам. Также затруднительным представляется объяснить достоверную положительную корреляцию содержания триацилглицеринов в плазме крови и показателем ACW.

Достоверная положительная корреляция уровня холестерина в плазме крови и ACL может быть объяснена полифенольной структурой данного жирорастворимого субстрата.

Выводы

1. На основе сопоставления результатов оценки суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови спортсменов с результатами лабораторных методов определения состояния антиоксидантной системы защиты организма, традиционно используемых в клинической практике, доказана обоснованность применения показателей суммарной антиоксидантной активности по данным автоматического анализатора антиоксидантов и свободных радикалов Photochem с целью оценки антиоксидантного статуса спортсменов в процессе занятий спортом.

2. Достоверная отрицательная корреляция показателя ACW с содержанием среднемолекулярных пептидов в плазме, как показателя эндогенной интоксикации, может быть объяснена токсическим действия на структуры организма свободных радикалов кислорода в условиях «окислительного стресса», обусловленного физической нагрузкой.

Литература

1. Дементьева, И. И. Лабораторная диагностика и клиническая оценка нарушений гомеостаза у больных в критическом состоянии / И. И. Дементьева. Москва, 2007. 161 с.

2. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. Минск: Беларусь, 2000. 2 т.

3. Камышников, В. С. Карманный справочник врача по лабораторной диагностике / В. С. Камышников. Минск: Бел. наука, 2002. 463 с.

4. Комаров, Ф. И. Биохимические показатели в клинике внутренних болезней / Ф. И. Комаров, Б. Ф. Коровкин. Москва: МЕДпресс, 2006. 208 с.

5. Шанин, В. Ю. Патофизиология критических состояний / В. Ю. Шанин. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. 435 с