

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СПОРТСМЕНОВ

DOI: 10.17691/stm2017.9.3.11
 УДК 616.31–008.8–74.796.071.2
 Поступила 24.11.2016 г.



К.Н. Конторщикова, д.б.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФПКВ¹; профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины²;
Ю.Р. Тихомирова, к.б.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФПКВ¹;
А.Н. Овчинников, аспирант кафедры биохимии и физиологии Института биологии и биомедицины²;
Т.И. Колегова, студентка кафедры молекулярной биологии и биомедицины Института биологии и биомедицины²;
Н.Н. Чуркина, врач клинико-диагностической лаборатории³;
С.Ю. Кузнецова, врач клинико-диагностической лаборатории³;
В.Н. Крылов, д.б.н., профессор кафедры биохимии и физиологии Института биологии и биомедицины²

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

³Приволжский окружной медицинский центр Федерального медико-биологического агентства России, Н. Новгород, 603005, Нижне-Волжская набережная, 2

Цель исследования — изучить эффективность определения показателей свободнорадикального и перекисного процессов в ротовой жидкости у высококвалифицированных спортсменов при анаэробной интервальной физической нагрузке для оценки их функционального состояния.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 23 высококвалифицированных спортсмена в возрасте в $18,7 \pm 0,6$ года. Для изучения показателей гомеостаза использованы следующие методы: индуцированной биохемилюминесценции, определения содержания первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов по И.А. Волчегорскому в модификации, энзиматический колориметрический метод определения концентрации креатинина, лактата, глюкозы и свободных жирных кислот, энзиматический кинетический метод определения количественной активности креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в ротовой жидкости.

Результаты. Установлено, что анаэробная интервальная физическая нагрузка инициирует увеличение активности лактатдегидрогеназы и концентрации лактата, снижение всех параметров кривой хемилюминесцентной реакции и повышение содержания триеновых конъюгатов и оснований Шиффа в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов.

Заключение. Изучение показателей свободнорадикального окисления, а также содержания первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов является доступным высокоинформативным способом исследования функционального состояния, адаптационных механизмов и резервных возможностей спортсменов на всех этапах учебно-тренировочного и соревновательного процессов.

Ключевые слова: креатинкиназа; лактатдегидрогеназа; креатинин; лактат; глюкоза; свободные жирные кислоты; прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз; ротовая жидкость; физическая нагрузка.

Как цитировать: Kontorshchikova K.N., Tikhomirova Y.R., Ovchinnikov A.N., Kolegova T.I., Churkina N.N., Kuznetsova S.Y., Krylov V.N. Indices of free radical oxidation in the oral fluid as markers of athletes' functional state. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(3): 82–86, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.3.11>

English

Indices of Free Radical Oxidation in the Oral Fluid as Markers of Athletes' Functional State

K.N. Kontorshchikova, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Faculty of Doctors' Advanced Training¹; Professor, Department of Molecular Biology and Immunology, Institute of Biology and Biomedicine²;

Для контактов: Конторщикова Клавдия Николаевна, e-mail: kontkn@mail.ru

Y.R. Tikhomirova, PhD, Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

A.N. Ovchinnikov, PhD Student, Department of Biology and Physiology, Institute of Biology and Biomedicine²;

T.I. Kolegova, Student, Department of Molecular Biology and Biomedicine, Institute of Biology and Biomedicine²;

N.N. Churkina, Physician, Clinicodiagnostic Laboratory³;

S.Y. Kuznetsova, Physician, Clinicodiagnostic Laboratory³;

V.N. Krylov, DSc, Professor, Department of Biochemistry and Physiology, Institute of Biology and Biomedicine²

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

³Privolzhsky District Medical Center of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, 2 Nizhne-Volzhsкая naberezhnaya, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the efficiency of determining indices of free radical and peroxide processes in the oral fluid in highly qualified athletes under anaerobic interval exercise for the assessment of their functional state.

Materials and Methods. 23 highly qualified athletes at the age of 18.7±0.6 years participated in the study. The following methods were used to investigate homeostasis indices: induced biochemiluminescence, determination of primary and end lipid peroxidation product content according to a modified Volchegorsky method, enzymatic colorimetric method of measuring the concentration of creatinine, lactate, glucose and free fatty acids, enzymatic kinetic method of determining the quantitative activity of creatine kinase and lactate dehydrogenase in the oral fluid.

Results. Anaerobic interval exercise is estimated to initiate increase of lactate dehydrogenase activity and lactate concentration, reduction of all parameters of chemiluminescence reaction curve, and elevation of the content of trien conjugates and Schiff bases in the oral fluid of highly qualified athletes.

Conclusion. The study of free radical oxidation indices as well as the content of primary and end products of lipid peroxidation is an available, highly informative method of examining the functional state, adaptive mechanisms, and spare capacities of athletes at all stages of training and competitive processes.

Key words: creatine kinase; lactate dehydrogenase; creatinine; lactate; glucose; free fatty acids; prooxidant-antioxidant homeostasis; oral fluid; physical exercise.

Поиск новых эффективных методов и средств оперативной диагностики функционального состояния организма спортсмена в период интенсивных физических нагрузок является одним из приоритетных направлений научных исследований в спортивной медицине. Доминирующее значение в современных условиях в общем комплексе медико-биологических обследований и инструментального контроля уровня физической подготовленности занимает биохимический скрининг. Анализ показателей биохимического гомеостаза позволяет на ранней стадии диагностировать признаки физического переутомления, обнаруживать микрповреждения тканей, функциональные и структурные сдвиги адаптационных процессов под влиянием физических нагрузок и с учетом изменения этих показателей корректировать многоуровневую систему подготовки спортсменов.

Объектами биохимических исследований, как правило, являются кровь, выдыхаемый воздух, моча, реже — выделения потовых желез и ротовая жидкость. Однако выполнение забора крови в условиях учебно-тренировочного процесса предусматривает присутствие квалифицированного персонала ввиду строгой необходимости соблюдения всех предусмотренных мер защиты, что в случае перманентного биохимического контроля в процессе спортивной подготовки довольно затруднительно. Вместе с тем забор

крови нередко приводит к нестабильности психологического состояния обследуемых, что может существенно исказить исследуемые показатели. Особую значимость при проведении указанных процедур несет в себе факт ужесточения требований антидопингового контроля. Так, WADA отнесены к перечню запрещенных любые формы внутрисосудистых и иных манипуляций с кровью или ее компонентами физическими или химическими методами [1]. Сложившаяся ситуация обуславливает необходимость поиска других неинвазивных методов диагностики с высокой степенью доступности, специфичности и чувствительности.

В последнее время в качестве информативной биологической среды организма при проведении неинвазивного биохимического скрининга эксперты и ученые все чаще рассматривают ротовую жидкость. Известно, что ротовая жидкость обеспечивает взаимосвязь организма с внешней и внутренней средой [2]. В ее состав входят органические и неорганические компоненты из слюнных желез, сыворотки крови и тканей полости рта [3]. Все это создает хорошие возможности изучения биохимических показателей метаболизма в ротовой жидкости при проведении скрининговых обследований спортсменов.

В научной литературе достаточно подробно описано изменение в ротовой жидкости атлетов минерального баланса, спектра стероидных гормонов, содер-

жания компонентов иммунной системы, активности некоторых ферментов, концентрации важнейших продуктов метаболизма, колебания кислотно-щелочного равновесия [4–8]. Однако работ, посвященных исследованию процессов свободнорадикального окисления, а также изучению содержания первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов в качестве диагностических маркеров состояния окислительного стресса и негативных последствий его изменения на организм при выполнении физических нагрузок разного типа, нами не обнаружено. В то же время знание этих показателей играет большую роль в оценке состояния спортсменов, подвергающихся сильному стрессу.

Цель исследования — изучить эффективность определения показателей свободнорадикального и перекисного процессов в ротовой жидкости у высококвалифицированных спортсменов при анаэробной интервальной физической нагрузке для оценки их функционального состояния.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 23 представителя циклических видов спорта (легкая атлетика, плавание), имеющих спортивное звание мастера спорта России или спортивный разряд кандидата в мастера спорта. Средний возраст спортсменов составил $18,7 \pm 0,6$ года. В соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации все испытуемые были предварительно проинформированы о цели и методике проведения исследования и дали добровольное согласие на участие в эксперименте.

Забор образцов ротовой жидкости осуществляли путем сплевывания в пластиковую микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф объемом 2 мл без дополнительной стимуляции. Тестирование спортсменов осуществляли до и после выполнения контрольного испытания, которое было представлено в виде серии отрезков 3×100 м гладким бегом с активным отдыхом между ними в течение 45 с — для легкоатлетов и 4×50 м основным стилем плавания с активным отдыхом между отрезками также 45 с — для пловцов. Во время проведения контрольного испытания собранные образцы ротовой жидкости хранились в портативной морозильной камере (Ezetil, Германия) при температуре -18°C и затем транспортировались в лабораторию для проведения биохимического исследования.

Потенциальную интенсивность свободнорадикального процесса и уровень его компенсаторных механизмов в ротовой жидкости измеряли с помощью программно-методического комплекса биохемилюминесцентного анализа БХЛ-07 (ООО «Медозонс», Н. Новгород) методом индуцированной биохемилюминесценции [9]. Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов — диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и конечных — оснований Шиффа (ОШ) в ротовой жидкости опреде-

ляли на спектрофотометре СФ-2000 («ОКБ СПЕКТР», С.-Петербург) по методу И.А. Волчегорского в модификации [10]. Определение концентрации креатинина, лактата, глюкозы и свободных жирных кислот в ротовой жидкости проводили с помощью набора реагентов Vital («Витал Девелопмент Корпорейшн», Россия) и NEFA FS DiaSys (DiaSys, Германия) на биохимическом анализаторе StatFax 1904 Plus (Awareness Technology, США) энзиматическим колориметрическим методом. Определение общей активности креатинкиназы и лактатдегидрогеназы выполняли с использованием набора реагентов CK-NAC DiaS и LDH DiaS DGKC (DiaSys, Германия) соответственно на биохимическом анализаторе Clima MC-15 (RAL, Испания) энзиматическим кинетическим методом в диапазоне 1–1100 МЕ/л для креатинкиназы и оптимизированным кинетическим УФ-методом в диапазоне 5–1200 МЕ/л для лактатдегидрогеназы.

Статистический анализ полученных данных выполнен с использованием программных приложений Microsoft Excel 2013 и Statistica 13.0. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Проверку распределения на предмет соответствия нормальному закону выполняли путем вычисления критерия Шапиро–Уилка. После выяснения, что не по всем изучаемым параметрам вид распределения полученных данных соответствует нормальному, последующий анализ на предмет наличия статистически значимых различий проводили с применением критерия Вилкоксона.

Результаты и обсуждение. В соответствии с разработанной программой исследования с целью определения доминирующего механизма энергообразования при выполнении предъявленного контрольного испытания изучена динамика изменений биологической активности основных ферментов и субстратов креатинфосфокиназного и лактацидного механизмов ресинтеза АТФ в ротовой жидкости. Так, активность лактатдегидрогеназы, катализирующей взаимопревращение пировиноградной и молочной кислот как одну из важнейших реакций анаэробного гликолиза, в ответ на предъявленную физическую нагрузку статистически значимо повысилась на 41,74% (табл. 1).

Известно, что при интенсивной мышечной деятельности продолжительного характера покрытие энергозатрат организма происходит преимущественно за счет гликолитического механизма ресинтеза АТФ, характерной особенностью которого, в случае дефицита кислорода, является рост активности лактатдегидрогеназы с соответствующим повышением концентрации молочной кислоты в тканях [11]. После выполнения контрольного испытания содержание лактата в ротовой жидкости испытуемых статистически значимо увеличилось на 31,25% (табл. 2).

Лактат, влияя на Na^+/H^+ и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен в клетке, стимулирует снижение внутриклеточного и внеклеточного рН, что сопровождается нарушением функ-

ционирования многих энзимных систем, в том числе снижением интенсивности тканевого дыхания, уменьшением содержания в клетках АТФ и креатинфосфата, а также менее активной мобилизацией нейтральных липидов из жировых депо посредством ингибирования липаз. По всей вероятности, развитие лактатемии обусловило отсутствие существенных динамических изменений активности креатинкиназы, концентрации креатинина, глюкозы и свободных жирных кислот в ротовой жидкости спортсменов до и после выполнения контрольного испытания (табл. 3).

Исследование влияния анаэробной интервальной физической нагрузки на состояние системы «перекисное окисление липидов—антиоксидантная защита» в ротовой жидкости показало статистически значимое снижение всех параметров кривой хемилюминесцентной реакции по сравнению с данными, полученными в состоянии покоя (табл. 4).

Так, индексы биохемилюминограммы S и I_{max} статистически значимо уменьшились — на 22,29 и 14,73% соответственно. При этом, несмотря на более низкую потенциальную способность к свободнорадикальному окислению, содержание ТК и ОШ в ротовой жидкости в постнагрузочном состоянии было статистически значимо выше на 40,01 и 89,23% (табл. 5).

Полученные результаты убедительно свидетельствуют об интенсификации развития оксидативного стресса при выполнении предъявленной физической нагрузки, который сопровождается низкой степенью реактивности звеньев системы антиоксидантной защиты. После выполнения контрольного испытания показатель, характеризующий направленность цепных реакций свободнорадикального окисления липидов, статистически значимо увеличился на 49,94% в сторону существенного преобладания ОШ в ротовой жидкости испытуемых. По-видимому, гипоксическое состояние, вызванное несоответствием кислородного запроса его текущему потреблению при выполнении контрольного испытания, через стимуляцию симпатико-адреналовой системы инициировало интенсивное образование реакционно-активных форм кислорода с последующим каскадным ростом свободнорадикальных и перекисных процессов в тканях. Согласно данным [12], патоло-

Т а б л и ц а 1

Активность креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов (M±m)

Показатель	До физической нагрузки	После физической нагрузки
Креатинкиназа, отн. ед.	71,08±5,23	78,23±3,94
Лактатдегидрогеназа, отн. ед.	390,29±23,64	553,19±25,73*

* — статистически значимая разница значений до и после нагрузки, p≤0,05.

Т а б л и ц а 2

Концентрация креатинина и лактата в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов (M±m)

Показатель	До физической нагрузки	После физической нагрузки
Креатинин, мкмоль/л	16,45±2,47	14,01±2,06
Лактат, ммоль/л	0,16±0,01	0,21±0,02*

* — статистически значимая разница значений до и после нагрузки, p≤0,05.

Т а б л и ц а 3

Содержание глюкозы и свободных жирных кислот в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов (M±m)

Показатель	До физической нагрузки	После физической нагрузки
Глюкоза, ммоль/л	0,42±0,02	0,41±0,02
Жирные кислоты, ммоль/л	1,10±0,01	1,20±0,01

Т а б л и ц а 4

Параметры биохемилюминограммы ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов (M±m)

Показатель хемилюминесценции	До физической нагрузки	После физической нагрузки
S, мВ·с	1286,61±14,34	999,79±13,12*
I _{max} , мВ	218,25±4,65	186,11±3,94*
t _{ga₂}	78,34±1,44	73,02±1,75*
S/I _{max} , отн. ед.	6,22±0,07	5,69±0,04*

* — статистически значимая разница значений до и после нагрузки, p≤0,05.

Т а б л и ц а 5

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов (M±m)

Показатель	До физической нагрузки	После физической нагрузки
ДК, отн. ед.	0,29±0,01	0,31±0,02
ТК, отн. ед.	0,35±0,03	0,49±0,04*
ОШ, отн. ед.	99,94±9,41	189,12±7,69*
ОШ/(ДК+ТК), отн. ед.	158,65±9,22	237,88±8,84*

* — статистически значимая разница значений до и после нагрузки, p≤0,05.

гические последствия для метаболического фона в организме, в частности угнетение активности гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибирование синтеза белка и нуклеиновых кислот, нарушение различных ферментативных процессов, возникают прежде всего в случае неспособности собственной антиоксидантной системы обеспечить поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия в границах физиологической нормы, что в итоге и приводит к избыточному аккумулярованию токсичных продуктов липопероксидации и повреждению мембранных структур — от изменения проницаемости и барьерной функции мембран до лизиса и апоптоза клетки. Нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону существенного преобладания конечных продуктов окислительной модификации макромолекул является одним из факторов, лимитирующих физическую работоспособность и усиливающих риск развития преморбидных и патологических состояний у спортсменов.

Заключение. Изучение показателей свободнорадикального окисления, а также содержания первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов является доступным высокоинформативным способом исследования функционального состояния, адаптационных механизмов и резервных возможностей спортсменов на всех этапах учебно-тренировочного и соревновательного процессов.

Финансирование исследования. Исследование не финансировалось какими-либо источниками.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. World Anti-Doping Agency. *The World Anti-Doping Code. International Standard. Prohibited List 2017*. URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016-09-29_-_wada_prohibited_list_2017_eng_final.pdf.
2. Комарова Л.Г., Алексеева О.П. Саливалогиа. Н. Новгород: НижГМА; 2006; 180 с. Komarova L.G., Alekseeva O.P. *Salivalogiya* [Salivalogy]. Nizhny Novgorod: NizhGMA; 2006; 180 p.
3. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Рыскина Е.А. и др. Аналитические подходы к изучению показателей метаболизма в ротовой жидкости. М: Известия; 2006; 312 с. Gil'miyarova F.N., Radomskaya V.M., Ryskina E.A., et al. *Analiticheskie podkhody k izucheniyu pokazateley metabolizma v rotovoy zhidkosti* [Analytical approaches to the study of metabolism indices in the oral fluid]. Moscow: Izvestiya; 2006; 312 p.

4. Guilhem G., Hanon C., Gendreau N., Bonneau D., Guével A., Chennaoui M. Salivary hormones response to preparation and pre-competitive training of world-class level athletes. *Front Physiol* 2015; 6: 333, <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00333>.

5. Moreira A., Bacurau R.F., Napimoga M.H., Arruda A.F., Freitas C.G., Drago G., Aoki M.S. Salivary IL-21 and IgA responses to a competitive match in elite basketball players. *Biol Sport* 2013; 30(4): 243–247, <https://doi.org/10.5604/20831862.1077548>.

6. Tékus E., Kaj M., Szabó E., Szénási N.L., Kerepesi I., Figler M., Gábel R., Wilhelm M. Comparison of blood and saliva lactate level after maximum intensity exercise. *Acta Biol Hung* 2012; 63(Suppl 1): 89–98, <https://doi.org/10.1556/abiol.63.2012.suppl.1.9>.

7. Damirchi A., Saati Zareei A., Sariri R. Salivary antioxidants of male athletes after aerobic exercise and garlic supplementation on: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Oral Biol Craniofac Res* 2015; 5(3): 146–152, <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.001>.

8. Sant'Anna M., Casimiro-Lopes G., Boaventura G., Marques S.T., Sorenson M.M., Simão R., Pinto V.S. Anaerobic exercise affects the saliva antioxidant/oxidant balance in high-performance pentathlon athletes. *Human Movement* 2016; 17(1): 50–55, <https://doi.org/10.1515/humo-2016-0003>.

9. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. В кн.: Биохимия и биофизика микроорганизмов. Горький; 1983; с. 179–183. Kuz'mina E.I., Nelyubin A.S., Shchennikova M.K. *Primenenie indutsirovannoy khemilyuminestsentsii dlya otsenki svobodnoradikal'nykh reaktsiy v biologicheskikh substratakh*. V kn.: *Biokhimiya i biofizika mikroorganizmov* [The use of induced chemiluminescence to assess free radical reactions in biotic substrates]. In: *Biochemistry and biophysics of microorganisms*. Gorky; 1983; p. 179–183.

10. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. Вопросы медицинской химии 1989; 35(1): 127–131. Volchegorsky I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Lifshits R.I. Comparison of various approaches to determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoj khimii* 1989; 35(1): 127–131.

11. Михайлов С.С. Спортивная биохимия. М: Советский спорт; 2006; 260 с. Mikhaylov S.S. *Sportivnaya biokhimiya* [Biochemistry for sport]. Moscow: Sovetskiy sport; 2006; 260 p.

12. Гунина Л.М. Окислительный стресс и адаптация: метаболические аспекты влияния физических нагрузок. Наука в олимпийском спорте 2013; 4: 19–25. Gunina L.M. *Oxidative stress and adaptation: metabolic aspects of physical activity impact*. *Nauka v olimpiyskom sporte* 2013; 4: 19–25.