

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 612.017.2

К.П. Базарин¹, А.А. Савченко^{1, 2}, И.И. Гвоздев¹

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

¹ ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия² ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия

Следствием высоких нагрузок является снижение реактивности клеток иммунной системы. Изучение зависимости хемилюминесцентной активности нейтрофилов от активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ важно для понимания метаболических механизмов формирования спортивного иммунодефицита и разработки методов его коррекции. Установлено, что метаболические ресурсы, обеспечивающие индукционную интенсивность респираторного взрыва, зависят от состояния митохондриальных процессов и липидного анаболизма.

Ключевые слова: нейтрофилы, метаболизм, функциональная активность, физическая нагрузка

METABOLIC MECHANISMS OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN QUALIFIED ATHLETES

К.Р. Bazarin¹, А.А. Savchenko^{1, 2}, I.I. Gvozdev¹

Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia
Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

The high exercise stress in sport causes the decrease of immune cells reactivity. Studying the interrelation between hemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes and NAD(P)-depending dehydrogenases in athletes is important for better understanding of sport immunodeficiency metabolic mechanisms and researching the methods for its correction. 51 male athletes of $22,1 \pm 3,7$ y. o. and 64 healthy males of the same age as the reference group were participated in the study. We found that metabolic resources providing the intensity of respiratory burst depend on mitochondrial processes condition and lipid metabolism. The activation index has logarithmic dependence on NAD(P)-MDH, NAD-IDH, NAD-IDH activities. Therefore the functional activity of neutrophilic granulocytes in athletes has positive correlation with plastic exchange level and negative correlation with oxygen-dependent ATP production.

Key words: neutrophilic granulocytes, metabolism, functional activity, high physical load

ВВЕДЕНИЕ

Высокие нагрузки в современном спорте часто являются причиной нарушения адаптационного потенциала организма. Одной из систем, активно участвующих в реализации адаптационных процессов, является иммунная [6, 7]. В случае срыва адаптационного процесса в иммунной системе развивается некомпенсированное напряжение, которое может проявляться в виде нарушения иммунореактивности и может обуславливать широкое как функциональное, так и структурное (патоморфологическое) многообразие проявлений патологии [5, 6]. К настоящему времени проведен ряд исследований влияния высоких физических нагрузок на состояние иммунитета спортсменов, показывающих, что следствием их является снижение реактивности клеток иммунной системы [8].

Нейтрофильные гранулоциты представляют собой высокореактивное звено иммунной системы. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты

организма [5, 6]. Активированные нейтрофилы сами становятся мощными эффекторами пусковых и регуляторных механизмов каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. У спортсменов обнаружено снижение продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами [10, 11].

Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов характеризует состояние «респираторного взрыва», который развивается при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза. Однако зависимость интенсивности «респираторного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов от основных ферментативных реакций, определяющих энергетическое и пластическое состояние клеток, до сих пор не исследована. Таким образом, целью исследования явилось изучение зависимости хемилюминесцентной активности нейтрофилов от активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ у квалифицированных спортсменов в динамике годового тренировочного цикла, что является важным шагом в понимании метаболических механизмов формирования

спортивного иммунодефицита и разработки методов его коррекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие квалифицированные спортсмены мужского пола, представители различных видов спорта с преимущественным проявлением выносливости – 51 человек в возрасте $22,1 \pm 3,7$ лет. В качестве контрольной группы обследовано 64 здоровых мужчин аналогичного возраста, не испытывающих регулярных высоких физических нагрузок. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых.

Образцы венозной крови у каждого из спортсменов забирались трижды в течение года – в конце подготовительного, соревновательного и переходного периодов. У лиц из контрольной группы забор крови осуществлялся однократно. Образцы брались из локтевой вены утром натощак, в состоянии покоя, как минимум через 12 часов после окончания физической нагрузки. Выделение нейтрофильных гранулоцитов осуществляли в двойном градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ – для отделения мононуклеарных клеток; $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ – для выделения нейтрофильных гранулоцитов). Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(-), 50 мкл люминола (Sigma, США) в концентрации 10^{-5} M , 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн/мл) и 240 мкл раствора Хэнкса («ПанЭко», Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса для определения индуцированной хемилюминесценции [1]. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе CL3606 (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{\max}), максимальное значение интенсивности (I_{\max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали по отношению площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной ($S_{\text{инд}}/S_{\text{спонт.}}$) и обозначали как индекс активации.

Для проведения биолюминесцентного анализа активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), малик-фермента (НАДФМДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и НАДН-ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ и НАДФН-ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ и НАДН-ГДГ), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР) нейтрофильные гранулоциты разрушали путем осмотического лизиса с добавлением 2 мМ дитиотреитола [3]. Активность НАД(Ф)-зависимых

дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 104 клетки, где 1 Е = 1 мкмоль/мин. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P):FMN оксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (Институт биофизики СО РАН, Красноярск). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Значимость различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни. Для оценки взаимосвязи между хемилюминесцентной активностью нейтрофилов и их метаболическими показателями применяли множественный регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамические изменения индекса активации (ИА) нейтрофильных гранулоцитов у квалифицированных спортсменов в ходе годового макроцикла подробно рассмотрены в наших предыдущих исследованиях [1]. Ранее проведенный анализ изменения активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах у квалифицированных спортсменов в динамике годового макроцикла позволил установить, что в конце подготовительного периода в клетках активированы основные метаболические процессы: анаэробная и аэробная энергетика, глутатион-зависимая антиоксидантная система, а также пластические реакции, определяющие уровень реакций макромолекулярного синтеза и реактивность клеток [2, 4]. На фоне усталости (в конце соревновательного периода) в нейтрофилах наблюдается выраженное снижение активности исследуемых НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ, что определяет снижение биоэнергетических процессов, реакций пластического обмена, повышается вероятность апоптоза. В период отдыха полного восстановления метаболических процессов в нейтрофильных гранулоцитах у спортсменов не происходит. В этот период наблюдается повышение роли анаэробной энергетики, в том числе за счет повышения притока субстратов с реакций липидного катаболизма, а также НАДФН-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена.

Очевидно, что функциональная активность клетки непосредственно связана с работой ее ферментативных систем, тем не менее, четкая взаимосвязь между этими процессами в условиях систематических высоких физических нагрузок до настоящего времени показана не была. Исследование данной взаимосвязи имеет значение в первую очередь для лучшего понимания механизмов формирования спортивного иммунодефицита, разработки методов превентивной диагностики и способов коррекции этого состояния.

Нами выявлено, что зависимость ИА нейтрофильных гранулоцитов крови от активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ для различных периодов годового тренировочно-соревновательного макроцикла с достаточно высокой точностью может быть описана уравнениями, включающими данные об активности следующих ферментов: НАДФ-МДГ, МДГ, НАДИЦДГ (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость ИА нейтрофильных гранулоцитов крови от активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ

Период	Уравнение	R ²
Контроль	$IA = 0,81 \ln(\text{НАДФ-МДГ}) - 0,15 \ln(\text{НАД-МДГ}) + 0,44 \ln(\text{НАД-ИЦДГ}) + 0,25$	0,78
Соревновательный	$IA = 0,4 \ln(\text{НАДФ-МДГ}) - 0,15 \ln(\text{НАД-МДГ}) + 0,33 \ln(\text{НАД-ИЦДГ}) + 0,13$	0,84
Переходный	$IA = 0,46 \ln(\text{НАДФ-МДГ}) - 0,21 \ln(\text{НАД-МДГ}) + 0,3 \ln(\text{НАД-ИЦДГ}) + 0,83$	0,72
Подготовительный	$IA = 0,84 \ln(\text{НАДФ-МДГ}) - 0,17 \ln(\text{НАД-МДГ}) + 0,45 \ln(\text{НАД-ИЦДГ}) + 0,13$	0,83

Представленные ферменты являются ключевыми и регуляторными в анаболических и энергетических процессах клетки. Так, НАДФ-МДГ – фермент, принимающий активное участие в системе липидного анаболизма и катаболизма ксенобиотиков, также участвует в шунтировании медленных реакций цикла трикарбоновых кислот [5]. МДГ и НАДИЦДГ являются ферментами цикла Кребса, тем самым определяя состояние аэробной энергетики клеток [5]. В настоящее время роль митохондрий в физиологии нейтрофильных гранулоцитов активно обсуждается, но доказана роль кислород-зависимого дыхания в реализации функциональной активности [5, 6]. При этом, исходя из установленной зависимости, уровни активности НАДФ-МДГ и НАДИЦДГ положительно влияют на величину индекса активации, тогда как активность МДГ – отрицательно. Цикл Кребса играет ключевую роль в системе внутриклеточного метаболизма, объединяя различные процессы и осуществляя амфиболические функции. Соответственно, интенсивность субстратного потока с начального этапа цикла (на уровне НАДИЦДГ) может распределяться и на пластические процессы (например, стимулировать аминокислотный обмен НАДНГДГ и НАДФНГДГ). В то же время активность МДГ характеризует интенсивность субстратного потока на завершающем этапе лимонного цикла, тем самым только отражая состояние аэробной энергетики. Малик-фермент является ключевым с реакциях липидного анаболизма и синтезирует НАДФН, который необходим для синтеза супероксид-радикала НАДФН-оксидазой и проявления хемилюминесцентной активности. Следовательно, величина индекса активации нейтрофильных гранулоцитов положительно зависит от пластического обмена и отрицательно – от уровня кислород-зависимого дыхания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У спортсменов в различных фазах годового макроцикла изменяется хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов. В период максимальной усталости у спортсменов снижается уровень метаболических резервов для реализации «респираторного взрыва». В переходном периоде у спортсменов наблюдается замедление скорости функциональной активации нейтрофилов, но при повышении интенсивности «респираторного взрыва». В подготовительный период (пик формы) у спортсменов наблюдается максимальный уровень «респираторного взрыва»,

но при снижении метаболических ресурсов к дополнительной функциональной активации. Динамика хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов реализуется, в том числе, за счет изменения внутриклеточного метаболизма. С помощью метода нелинейной регрессии установлено, что метаболические ресурсы, обеспечивающие индукционную интенсивность «респираторного взрыва», зависят от состояния митохондриальных процессов и липидного анаболизма. Определение механизмов функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у спортсменов позволит разработать методы регуляции воспалительных процессов и, соответственно, технологии быстрого и эффективного восстановления после тяжелых физических нагрузок.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

- Базарин К.П., Савченко А.А., Александрова Л.И. Изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови у квалифицированных спортсменов // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 6. – С. 16–18.
- Bazarin KP, Savchenko AA, Alexandrova LI (2013). Changes in functional activity of neutrophilic granulocytes in qualified athletes [Изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови у квалифицированных спортсменов]. *Bjull. VSNC SO RAMN*, 6, 16–18.
- Базарин К.П., Савченко А.А. Особенности метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов у спортсменов в динамике тренировочного цикла // Спортивная медицина: наука и практика. – 2013. – № 1 (10). – С. 246–247.
- Bazarin KP, Savchenko AA (2013). Features of neutrophilic granulocytes metabolic activity in athletes during year-long macrocycle [Особенности метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов у спортсменов в динамике тренировочного цикла]. *Sportivnaja medicina: nauka i praktika*, 1, 246–247.
- Савченко А.А. Определение активности НАД(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биoluminesцентным методом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 5. – С. 656–660.
- Savchenko AA (2015). Estimation of NAD(P)-depending dehydrogenases activity in neutrophilic granulocytes by bioluminescent method [Определение активности НАД(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биoluminesцентным методом]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*, 159 (5), 656–660.

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

Savchenko AA, Bazarin KP (2013). The activity of neutrophilic granulocytes NAD(P)-depending dehydrogenases in athletes during year-long macrocycle [Sostojanie aktivnosti NAD- i NADF-zavisimyh degidrogenaz v nejtrofil'nyh granulocitah u sportsmenov v dinamike trenirovochnogo cikla.]. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologija*, 6, 151-162.

5. Савченко А.А., Борисов А.Г. Основы клинической иммунометаболизма. – Новосибирск: Наука, 2012. – 263 с.

Savchenko AA, Borisov AG (2012). The basis of clinical immunometabolomics [Osnovy klinicheskoy immunometabolomiki], 263.

6. Савченко А.А., Смирнова С.В., Борисов А.Г. Содержание АТФ и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах при иммунодефицит-ассоциированных заболеваниях у пришлых жителей Эвенкии // Бюлл. СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 3. – С. 33–38.

Savchenko AA, Smirnova SV, Borisov AG (2010). The ATP content and NAD(P)-depending dehydrogenases activity in lymphocytes during immune-associated diseases in alien inhabitants of Evenkia [Soderzhanie ATF i aktivnost' NAD(F)-zavisimyh degidrogenaz v limfocitah pri immunodeficit-associirovannyh zabolevaniyah u prishlyh zhitelej Jevenkii]. *Bjulleten' SO RAMN*, 30 (3), 33-38.

7. Hackney AC, Koltun KJ (2012). The immune system and overtraining in athletes: clinical implications. *Acta Clin. Croat.*, 51 (4), 633-637.

8. Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, Simmonds M, Gray B, Hooper SL, Marshall-Gradisnik SM (2010). The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Exerc. Immunol. Rev.*, 16, 119-137.

9. Kolaczowska E, Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 13 (3), 159-175.

10. Levada-Pires AC, Fonseca CE, Hatanaka E (2010). The effect of an adventure race on lymphocyte and neutrophil death. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 109 (3), 447-465.

11. Yaegaki M, Umeda T, Takahashi I (2008). Measuring neutrophil functions might be a good predictive marker of overtraining in athletes. *Luminescence*, 23 (5), 281-293.

Сведения об авторах Information about the authors

Базарин Кирилл Петрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: 8 (391) 228-06-83; e-mail: kpbazarin@gmail.com)

Bazarin Kirill Petrovich – Candidate of Medical Sciences, Senior Scientific Officer of the Laboratory of Cell Molecular Physiology and Pathology of Research Institute for Medical Problems of the North (660022, Krasnoyarsk, ul. Partizana Zheleznyaka, 3g; tel.: +7 (391) 228-06-83; e-mail: kpbazarin@gmail.com)

Савченко Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера», профессор кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79/10; тел.: 8 (391) 291-27-33)

Savchenko Andrey Anatoljevich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Cell Molecular Physiology and Pathology of Research Institute for Medical Problems of the North, Professor of the Department of Medical Biology of the Institute of Fundamental Biology and Biotechnology of Siberian Federal University (660041. Krasnoyarsk, pr. Svobodny, 79/10; tel.: (391) 291-27-33)

Гвоздев Иван Игоревич – младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера»

Gvozdev Ivan Igorevich – Junior Research Officer of the Laboratory of Cell Molecular Physiology and Pathology of Research Institute for Medical Problems of the North