

Індукція оксидативного та нітрозативного стресу в юнаків при адаптації до фізичних навантажень у тренувальному та змагальному періодах

Н.В. Богдановська¹, А.В. Коцюруба², А.В. Голубенко¹

¹Запорізький національний університет, Запоріжжя;

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: 020190@ukr.net

Вивчали особливості розвитку оксидативного та нітрозативного стресу у практично здорових осіб під впливом довготривалих фізичних навантажень значного обсягу та інтенсивності. Показано, що для юнаків, які систематично виконують м'язову роботу, характерні високий вміст маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикала, активних форм кисню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та нітрозативного стресу. Збільшення ступеня несприятливого впливу на організм інтенсивних тренувальних і змагальних навантажень супроводжується вираженими адаптивними змінами в ієрархії окисного індукційного de novo синтезу оксиду азоту (збільшення у 3 рази), а також неокисного реутилізаційного його синтезу (зростання у 3 рази). Деадаптація організму юнаків наприкінці змагального періоду виражається у підвищенні вмісту продуктів розпаду пуринових нуклеотидів у 2 рази, зростанні рівнів генерації активних форм кисню (супероксидного радикалу у 3,5 рази та перекису водню у 2,5 рази), а також у підвищенні вмісту нітрат-аніона у 2,5 рази. Ключові слова: індукція; оксидативний стрес; нітрозативний стрес; адаптація; фізичні навантаження.

ВСТУП

Згідно із загальноприйнятим на сьогодні визначенням, оксидативний стрес являє собою порушення балансу про- – антиоксидантних речовин у бік перших, серед яких ключове місце займають активні форми кисню та азоту, вивченню шляхів утворення та метаболізму яких присвячені численні дослідження [1, 2]. Зокрема, показано значення оксидативного та нітрозативного стресу у виникненні таких патологічних станів, як аутоімунні (системні) [3], серцево-судинні [4] захворювання, цукровий діабет [5] тощо. Вивчені особливості розвитку оксидативного стресу за різних стресових станів, до яких можна віднести іонізуючу радіацію, хімічні речовини [6] та ін. Однак очевидним є те, що особливе місце в активізації метаболічних змін займають фізичні навантаження,

які відіграють ключову роль у функціонуванні антиоксидантної системи. Дійсно, дослідженню змін, що відбуваються у антиоксидантній системі під впливом фізичних навантажень різної інтенсивності, тривалості присвячена численна кількість праць, проте вони обмежуються лише констатацією вмісту певних метаболітів здатних або чинити пошкоджувальний вплив на системи організму [2], або ж сприяти певній стабілізації балансу про- – антиоксидантних речовин [7]. Важливо відмітити, що у вітчизняних і зарубіжних дослідженнях не було приділено належної уваги вивченню оксидативного та нітрозативного стресу за умов тривалих фізичних і психоемоційних навантажень, зокрема відсутні дані, які б дали змогу виявити такі особливості у юнаків-спортсменів високої кваліфікації.

Вперше утворення вільних радикалів у м'язах, що інтенсивно скорочуються, було

© Н.В. Богдановська, А.В. Коцюруба, А.В. Голубенко

зафіксоване Davies зі співавт. [2]. Нині встановлено, що оптимальний окисно-відновний баланс (вміст активних форм кисню та азоту – АФК та АФА відповідно) у крові відіграє важливу роль у регулюванні скорочувального апарату сили м'язів. З іншого боку, внаслідок розвитку окисного стресу пошкодження структури м'язів позначається на продуктивності їх функціонування. Причини утворення вільних радикалів, АФК та АФА у процесі тренування досі не виявлені остаточно. Хоча різноманітні механізми вже достатньо досліджені і описані, залишається невизначеним сумарний вклад, який вносить кожен із них у загальний стрес, адже ці механізми можуть діяти синергічно, і різні режими навантажень, ймовірно, активують різні шляхи утворення вільних радикалів. На наш погляд, різноманітні метаболічні зрушення, що виникають в організмі спортсменів при інтенсивних фізичних і психоемоційних навантаженнях, мають свої особливості, тому це питання вимагає більш детального вивчення.

Метою нашого дослідження було вивчення особливостей індукції оксидативного та нітрозативного стресу в юнаків при адаптації до фізичних навантажень у тренувальному та змагальному періодах.

МЕТОДИКА

У дослідженні взяли участь нетреновані студенти (контрольна група) та спортсмени-волейболісти (основна група). Всього було проведено 765 обстежень. Юнаки основної групи протягом 11 міс (річний термін навчально-тренувального циклу спортсменів) систематично виконували м'язову роботу великого обсягу та інтенсивності: перші 3 міс (підготовчий етап) – вправи в аеробному режимі загальнорозвиваючого, спеціального характеру з частотою серцевих скорочень (ЧСС) 125–155 хв⁻¹ і спеціальний біг та ігри у змішаному анаеробно-аеробному режимі при ЧСС яка становила 140–185 хв⁻¹. Загальна кількість годин на цьому етапі була 268. В на-

ступні 8 міс (змагальний етап) тренувальні навантаження – 25–30% від загального обсягу підготовчого етапу, проводили паралельно зі змаганнями за календарним планом команди.

У плазмі крові досліджували біохімічні показники. Для характеристики інтенсивності розвитку оксидативного стресу нами були визначені: вміст тромбоксану В₂ (TxV₂), лейкотрієну С₄ (LxC₄), сечової кислоти, арахідонової кислоти, продуктів деградації пуринових нуклеотидів, швидкість генерації супероксидного радикала (в умовних одиницях), гідроксильного радикала, вміст перекису водню, дієнових кон'югантів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), негемового заліза – активатора утворення в реакції Фентона ·ОН-радикала, що є ініціатором перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ).

Інтенсивність розвитку нітрозативного стресу оцінювали, визначаючи сумарну активність конститутивних синтаз оксиду азоту (cNOS=eNOS+iNOS), активність індукційної синтази оксиду азоту (iNOS), сумарну активність НАДФН-залежних нітратредуктаз (Red), активність аргінази (Arg), вміст сірководню (H₂S), нітрат-аніона (NO₃⁻).

Визначення вмісту ейкозаноїдів, TxV₂ та LxC₄ проводили в спиртових екстрактах плазми крові за допомогою радіоімунного методу «Beckman» (Німеччина), користуючись стандартними наборами реактивів фірми «Amersham» (Англія). Вміст сечової кислоти вивчали колориметрично в аліквотах плазми крові за допомогою набору реактивів фірми «Філісит-Діагностика» (Україна), вміст вільної арахідонової кислоти – в ліпідному гептан-ізопропанольному екстракті плазми крові спектрофотометричним методом [8]. Визначення продуктів деградації пуринових нуклеотидів проводили загальноживаним колориметричним методом [9].

Швидкість генерації супероксидного радикала (·O₂⁻) в плазмі крові оцінювали за зміною екстинції при окисненні цитохрому С («Sigma», США) [10]. Спектрофотометрично визначали швидкість генерації ·ОН-радикала

і перекису водню (H_2O_2) проводили [11, 12], а також вміст ДК і МДА [8, 13]. Вміст заліза в пробах визначали фотометричним методом з використанням набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Вивчення активності NO-синтаз (Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної) використовували комбінацію класичного метода [14] та сучасну його модифікацію [15], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Для цього у 10 разів збільшили об'єм субстратної суміші і активність ферменту визначали з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності NO-синтаз до існуючого (базального) рівня. L-аргінін добавляли з надлишком, враховуючи його можливу утилізацію в аргіназній реакції.

Для визначення вмісту сірководню, застосовували раніше описаний спектрофотометричний метод [16] із застосуванням дипіридилдісульфату (N,N-DPD, («Sigma», США) $FeCl_3$ (х.ч., Україна).

Вміст нітрат-аніона (NO_3^-) вимірювали бруциновим методом в безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом [17]. Загальну нітратредуктазну активність визначали в плазмі крові за наявності надлишку НАДФН («Reanal», Угорщина) та нітрат-аніона (NO_3^- , ч.д.а.) [18].

Базальну аргіназну активність вивчали за утворенням сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс- HCl («Calbiochem») буфері (pH = 8,0) [19, 20].

Вміст сечовини в плазмі крові досліджували колориметричним методом у безбілкових розчинах за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Вміст білка в плазмі крові визначали загальноновживаним методом Лоурі [21] з використанням вітчизняного реактиву Фоліна.

Розраховували також відносні зміни (Δ , %) біохімічних показників щодо певного дослідженого періоду або контролю за такою формулою: $\Delta = 100 \cdot (X_i - X_n) / X_n$, де

X_i – кінцеве значення; X_n – вихідне значення показника.

Усі біохімічні показники досліджували в збагаченій лейкоцитами плазмі крові нетренованих юнаків контрольної групи на початку дослідження, а у тренуваних юнаків основної групи тричі: після закінчення підготовчого періоду, в середині й наприкінці змагального періоду. У процесі підготовчого періоду (3 міс), фізичні навантаження виконували за відсутності факторів психологічного стресу, а в періоді змагань (8 міс) здійснювали як у тренувальному безстресовому режимі, так і в стресових умовах відповідальних змагань.

Обрана схема визначення вказаних біохімічних показників ґрунтувалася на тому, що ми спробували оцінити інтенсивність окисного стресу наприкінці підготовчого періоду (на піку фізичної форми, досягнутої під час тренувальних занять), в середині змагального (через 7 міс після початку тренувань або через 4 міс після початку змагань) і наприкінці змагального періоду (через 11 міс після початку тренувань або через 8 міс після початку змагань).

Обробку отриманих результатів проводили, використовуючи традиційні статистичні методи з вираховування відносних значень, середньої арифметичної, помилки репрезентативності та середнього квадратичного відхилення. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм «Microsoft Excel 2007» та «StatisticSoft 6.0».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами було проведено попереднє визначення досліджуваних показників у групах нетренованих і тренуваних юнаків. Для останніх початок дослідження збігався із закінченням підготовчого етапу навчально-тренувального циклу та початком змагального етапу, що супроводжується поєднанням інтенсивних фізичних та психоемоційних навантажень.

Відомо, що генерація реактивних сполук відбувається двома шляхами, а саме оксида-

тивним (класичним), ключовими сполуками якого є АФК та нітрозативним (новим), провідне місце в якому займають АФА. Взаємодія шляхів відбувається під час реакцій між цими активними сполуками, що призводить до активації каскаду ланцюгових реакцій, так званого перекисного окиснення ліпідів. Зважаючи на провідну роль у функціонуванні антиоксидантної системи супероксидного радикала (СОР), як ключового метаболіту, з якого починається каскад генерації активних метаболітів кисню, вважаємо за необхідне дослідити різні шляхи його утворення. Відзначимо, що під дією фосфоліпази А₂ з фосфоліпідного пулу клітинних мембран відщеплюється арахідонова кислота, яка, в свою чергу, може по циклооксигеназному шляху перетворюватися на простагландини і стабільний ТхВ₂, що є, в цілому, маркером інтенсивності циклооксигеназного шляху, а по ліпоксигеназному – в лейкотрієни, в тому числі пептидолейкотрієн LtC₄, що є маркером його інтенсивності. У табл. 1 представлені результати первинного визначення вмісту маркерів оксидативного стресу. Встановлено, що у групі тренуваних юнаків вміст

ТхВ₂ та LtC₄ виявився вищим у 3 рази. Але, враховуючи практично однакові значення співвідношень (1,3) цих метаболітів у групі тренуваних та нетренуваних юнаків, встановити переважання одного з шляхів генерації СОР на початку дослідження не вдалося.

Нами розглянутий інший шлях генерації СОР, за участю ксантиноксидази, під час роботи якої в процесі деградації пуринових нуклеотидів одночасно утворюються $\cdot\text{O}_2^-$ і сечова кислота. Таким чином, ксантиноксидаза – ключовий фермент глибокої деградації макроергічних сполук. Під час окиснення гіпоксантину до ксантину, а останнього до сечової кислоти, ксантиноксидаза одночасно генерує два радикали $\cdot\text{O}_2^-$. Отже, сечова кислота є одночасно маркером генерації $\cdot\text{O}_2^-$ ксантиноксидазою, і ступеня деградації пуринових нуклеотидів. У групі тренуваних юнаків процеси глибокого розпаду макроергічних сполук були більш вираженими, що підтверджується втричі вищим ($P<0,05$) вмістом продуктів деградації пуринових нуклеотидів та сечової кислоти ($P<0,01$).

Відносно високий вміст маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикала

Таблиця 1. Показники оксидативного стресу в плазмі нетренуваних і тренуваних юнаків на початку дослідження (M±m)

Показники	Юнаки		Відносна різниця між показниками тренуваних і нетренуваних юнаків, %	
	Нетренувані	Тренувані		
Тромбоксан В ₂ , пмоль·мг ⁻¹ білка	1,74±0,36	5,4±0,75***	+210,34	
Лейкотрієн С ₄ , пмоль·мг ⁻¹ білка	1,33±0,27	4,34±0,81**	+226,32	
Сечова кислота, нмоль·мг ⁻¹ білка	3,3±0,57	9,36±1,57**	+183,64	
Продукти деградації пуринових нуклеотидів, нмоль·мг ⁻¹ білка	1,63±0,06	4,73±1,32*	+190,18	
Арахідонова кислота, нмоль·мг ⁻¹ білка	11,26±1,71	16,17±3,6	+43,61	
Швидкість генерації, ум.од.	$\cdot\text{O}_2^-$	1,89±0,24	5,46±0,91**	+188,89
	$\cdot\text{OH}^-$	1,22±0,26	8,9±1,71**	+629,51
Перекис водню, пмоль·мг ⁻¹ білка	5,01±0,82	2,96±0,32*	-40,92	
Негемове залізо, пмоль·мг ⁻¹ білка	2,28±0,25	4,24±0,81**	+85,96	
Дієнові кон'югати, нг·мг ⁻¹ білка	3,71±0,42	11,1±2,64*	+199,19	
Малоновый діальдегід, нмоль·мг ⁻¹ білка	14,8±2,4	40,7±6,8**	+175,00	

Примітка: тут і в табл. 2: * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ порівняно із нетренуваними юнаками.

у тренуваних юнаків спричинив збільшення ($P < 0,001$) швидкості його генерації майже втричі вже наприкінці підготовчого періоду (початок дослідження). Вірогідне збільшення майже у 2 рази пулу вільного заліза у плазмі крові тренуваних юнаків може бути причиною вищої ($P < 0,001$) у цій групі швидкості утворення гідроксидного радикала, що є ініціатором ліпопероксидації. Не виключено, що саме більш низький рівень вільного заліза поряд із вищим вмістом перекису водню ($P < 0,05$) у групі нетренованих юнаків зумовлює і значно меншу інтенсивність проходження реакції Фентона, а, отже, і генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала (у 7 разів) і, як наслідок, процесу перекисного окиснення ліпідів (див. табл. 1). Відомо, що інтенсивна генерація АФК, а саме гідроксидного аніона [22] посилює перекисне окиснення ліпідів, що підтверджується також результатами, отриманими при визначенні вмісту маркерів ліпопероксидації; відповідно до чого на початку дослідження у групі тренуваних юнаків були вищими у 3 рази вміст ДК ($P < 0,05$) та МДА ($P < 0,01$).

Враховуючи тісний взаємозв'язок АФК і АФА, а також зважаючи на важливу роль NO у пристосуванні організму до фізичних навантажень [23] ми визначили значення показників, які характеризують інтенсивність розвитку нітрозативного стресу у юнаків обох груп (табл. 2). Наші результати узгоджуються із даними, отриманими раніше

[23]. В процесі систематичних тренувальних навантажень активізується система синтезу оксиду азоту (зростає синтез NO de novo), що може призвести до збільшення вмісту АФА із утворенням особливо небезпечного пероксинітриду, оскільки при відсутності L-аргініну або кофактора тетрагідробіоптерину NO-синтаза здатна генерувати супероксидний аніон-радикал [1].

Встановлено, що на початку дослідження вміст аргінази був однаковим у представників обох груп. При цьому у тренуваних юнаків порівняно із нетренованими активність iNOS посилюється у 3 рази ($P < 0,01$), що має значно більшу продуктивність синтезу NO, ніж cNOS і за умов підвищення вмісту $\cdot\text{O}_2^-$ (див. табл. 1) може призводити до утворення пероксинітриду та подальшої активації процесів нітрозативного стресу у тренуваних юнаків. Крім цього виявлено, що реутилізаційний синтез NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриду, а останнього нітритредуктазою до оксиду азоту) переважав у спортсменів, що підтверджується вищою ($P < 0,01$) майже втричі нітрат-редуктазною активністю у основній групі порівняно з контролем.

Відомо, що біологічно активний газовий трансмітер сірководень (H_2S) відіграє суттєву роль у фізіологічних реакціях, вступаючи в реакції з АФК та АФА [24], і є важливим регулятором de novo синтезу NO. Оскільки він

Таблиця 2. Показники нітрозативного стресу в плазмі нетренованих і тренуваних юнаків на початку дослідження ($M \pm m$)

Показники	Юнаки		Відносна різниця між показниками тренуваних і нетренованих юнаків, %
	Нетреновані	Треновані	
NO-синтаза, пмоль \cdot хв ⁻¹ \cdot мг ⁻¹ білка			
конститутивна	43,4 \pm 4,2	84,2 \pm 15,4*	+94,01
індуцибельна	19,35 \pm 2,1	59,3 \pm 10,5**	+206,46
Сірководень, пмоль \cdot мг ⁻¹ білка	2,15 \pm 0,59	6,88 \pm 0,88***	+220,00
Нітрат-аніон, нмоль \cdot мг ⁻¹ білка	5,38 \pm 0,97	7,78 \pm 0,82	+44,61
Н-редуктаза, нмоль \cdot хв ⁻¹ \cdot мг ⁻¹ білка	2,53 \pm 0,49	7,1 \pm 1,16**	+180,63
Аргіназа, нмоль \cdot хв ⁻¹ \cdot мг ⁻¹ білка	1,11 \pm 0,28	1,03 \pm 0,12	-7,21

має антиоксидантні властивості, зумовлені його здатністю до взаємодії з пероксинітрином, вірогідне зростання пулу H_2S втричі в основній групі (див. табл. 2) може бути підтвердженням значного утворення пероксинітриду, і, таким чином, свідченням розвитку нітрозативного стресу у спортсменів вже наприкінці підготовчого періоду.

Отже, у юнаків, які регулярно інтенсивно тренувалися протягом 3 міс, на початку дослідження вірогідно більш високими були значення практично всіх вивчених біохімічних показників, ніж у нетренованих юнаків. Це свідчить про важливість дослідження особливостей оксидативного та нітрозативного стресу для процесу адаптації організму спортсменів до тривалих і значних фізичних навантажень. Отримані результати узгоджуються з даними досліджень цілої низки авторів, які показали важливу роль участі АФК і АФА у пристосуванні організму до фізичних навантажень [23, 25]. У зв'язку із цим ми оцінили зміни значень досліджуваних показників на різних етапах тренувальної та змагальної діяльності тренуваних юнаків, тобто в динаміці адаптації до зміни характеру та обсягу зовнішнього впливу на їх організм

у вигляді м'язової роботи та психоемоційних навантажень, притаманних змагальному періоду.

На другому етапі дослідження, що збігався з серединою змагального періоду, ми повторно визначили біохімічні показники у тренуваних юнаків (табл. 3). Слід відмітити, що змінився вміст маркерів шляхів генерації супероксидного радикала, але вірогідна різниця була відзначена лише для вмісту арахідонової кислоти (збільшення на 66%; $P < 0,05$) та сечової кислоти (зменшення на 57%; $P < 0,01$). Передумовою синтезу простагландинів (зокрема, визначених нами TxV_2 та LtC_4) є наявність вільної арахідонової кислоти, яка відщеплюється від фосфоліпідного шару мембрани під дією фосфоліпази A_2 . Оскільки вірогідний приріст вказаної поліненасиченої жирної кислоти відмічений нами у середині змагального періоду, було висунуте припущення про можливість збільшення вмісту TxV_2 та LtC_4 до кінця змагального періоду. Відносна сталість кількості продуктів деградації пуринових нуклеотидів при достовірному зменшенні вмісту сечової кислоти може свідчити про адаптивні зміни, що виникають у спортсменів при систематичних

Таблиця 3. Показники оксидативного стресу в плазмі тренуваних юнаків під час змагального періоду ($M \pm m$)

Показники	Вихідний стан	Змагальний період	
		середина	кінець
Тромбоксан V_2 , $\text{пмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	5,4±0,75	3,74±0,51	6,28±1,22
Лейкотрієн C_4 , $\text{пмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	4,34±0,81	3,52±0,46	4,6±0,72
Сечова кислота, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	9,36±1,57	4,01±0,47**	12,27±1,8
Продукти деградації пуринових нуклеотидів, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	4,73±1,32	4,64±0,41	10,24±1,58*
Арахідонова кислота, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	16,17±3,6	26,88±2,16*	29,98±3,42*
Швидкість генерації, ум.од. $\cdot \text{O}_2^-$	5,46±0,91	6,99±1,02	19,3±1,34*
	$\cdot \text{OH}^-$	8,9±1,71	4,26±0,61*
Перекис водню, $\text{пмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	2,96±0,32	3,35±0,36	7,76±0,82*
Негемове залізо, $\text{пмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	4,24±0,81	2,07±0,37*	13,6±1,8*
Дієнові кон'югати, $\text{нг} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	11,1±2,64	9,64±1,1	12,64±1,65
Малоновый діальдегід, $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	40,7±6,8	21,34±4,4*	46,52±3,48*

Примітка: тут і табл. 4 * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ порівняно з вихідним станом.

тренувальних та змагальних навантажень.

У плазмі крові тренуваних юнаків швидкість генерації гідроксидного радикала знизилася на 52% ($P < 0,05$). При цьому вміст негемового заліза також зменшився на 51% ($P < 0,05$). Це свідчить про зниження інтенсивності реакції Фентона, що, ймовірно, повинно сприяти зменшенню активності процесів ліпопероксидації у середині змагального періоду (див. табл. 3). Таке припущення підтверджено результатами відповідно до яких у середині змагального періоду нами було зафіксоване вірогідне зменшення майже вдвічі вмісту МДА.

Беручи до уваги значимість дослідження маркерів окисного NO-синтазного й аргіназного обміну аргініну, як і окисного *de novo* та неокисного реутилізаційного синтезу оксиду азоту для процесу адаптації організму юнаків до тривалих і значних фізичних навантажень [23, 25], ми визначили показники, що характеризують інтенсивність нітрозативного стресу у спортсменів у середині змагального періоду (табл. 4). Встановлено, що вірогідна відмінність зафіксована для активності iNOS, значення якої знизилася на 48%. Це свідчить про адаптивні зміни у системі синтезу оксиду азоту, зокрема окисного *de novo*, під впливом тривалих фізичних і психоемоційних змагальних навантажень. Зазначимо, що за іншими показниками нітрозативного стресу у середині змагального періоду достовірних відмінностей зафіксовано не було.

Відомо, що закінчення змагального сезону у спортсменів характеризується потужним наростанням природного стомлення організму, зниженням фізичної працездатності та функціональної підготовленості [23]. Разом з тим необхідність продовження змагальної діяльності, виконання фізичних навантажень на високому рівні вимагає мобілізації функціональних резервів організму й формування нових фізіологічних механізмів його адекватної адаптації до систематичної м'язової роботи. Відповідно до цього, досить передбачуваними виявилися результати, отримані нами на третьому етапі дослідження, що відповідали закінченню змагального періоду.

Зміни фізіологічних показників, що відбулися наприкінці дослідження знайшли своє відображення у біохімічних показниках, які також зазнали суттєвих змін. Закінчення змагального періоду супроводжувалося збільшенням швидкості генерації супероксидного радикала (у 3,5 рази; $P < 0,001$), що, можливо, пов'язано зі значним збільшенням вмісту продуктів деградації пуринових нуклеотидів та арахідонової кислоти ($P < 0,05$) як джерел продукції $\cdot O_2^-$, а також активацією інших механізмів його утворення, наприклад, за участю НАДФН-оксидази, котра є однією з основних генераторів АФК під час виконання фізичних навантажень (див. табл. 3).

Відомо, що напруження механізмів антиоксидантного захисту на фоні фізичних навантажень високого обсягу та інтенсив-

Таблиця 4. Показники нітрозативного стресу в плазмі тренуваних юнаків під час змагального періоду (M±m)

Показники	Вихідний стан	Змагальний період	
		середина	кінець
NO-синтаза, пмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка			
конститутивна	84,2±15,4	50,1±11,52	66,93±17,31
індуцибельна	59,3±10,5	30,6±3,5*	56,52±6,21
Сірководень, пмоль·мг ⁻¹ білка	6,88±0,88	6,04±0,92	5,26±0,92
Нітрат-аніон, нмоль·мг ⁻¹ білка	7,78±0,82	6,04±0,73	19,95±2,74*
Н-редуктаза, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	7,1±1,16	5,69±0,73	10,89±1,65
Аргіназа, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	1,03±0,12	1,18±0,15	2,72±0,16*

ності може викликати накопичення перекису водню [26]. Нами встановлено, що у плазмі крові спортсменів у кінці змагального періоду збільшується майже у 3 рази ($P < 0,001$) вміст перекису водню та негемового заліза, цим зумовлені зміни у процесах перекисного окислення ліпідів, про що свідчить збільшення на 14% вмісту МДА ($P < 0,001$; див. табл. 3). Отримані результати повністю узгоджуються з літературними даними.

Вивчення показників нітрозативного стресу в обтяженому психологічним стресом режимі спортивних змагань дало змогу встановити (див. табл. 4), що у кінці змагального періоду майже 2,5 рази ($P < 0,001$) збільшилися вміст нітрат-аніона та активність аргінази. Нетоксичний нітрат-аніон містить атоми кисню, що походять із обох (оксидативного – класичного та нітрозативного – нового) шляхів метаболізму кисню і є основним циркулюючим метаболітом оксиду азоту. Таким чином, підвищений вміст NO_3^- є достатнім маркером для встановлення наявності і оксидативного, і нітрозативного стресу у спортсменів.

Отже, проведені нами дослідження дали змогу констатувати, що необхідний рівень адаптації організму спортсменів до тривалого інтенсивного фізичного навантаження, обтяженого психологічним стресом під час змагального періоду та відсутній у тренувальний період, забезпечувався і за рахунок неокисного шляху метаболізму L-аргініну, який проходить з утворенням сечовини та орнітину, з якого в суміжних реакціях утворюється путресцин і інші поліаміни, необхідні для підтримки проліферативних процесів, особливо синтезу ДНК.

ВИСНОВКИ

1. Наприкінці тренувальних занять у підготовчий період для юнаків, які систематично виконують м'язову роботу, характерні високі концентрації АФК і АФА. Адаптації організму до тривалих і значних фізичних навантажень відповідає висока активність

cNOS та достовірно вищий вміст сірководню – скавенджеру пероксинітриду.

2. Збільшення ступеня несприятливого впливу на організм інтенсивних тренувальних (фізичних) і змагальних (як фізичних, так і психологічних) навантажень проходить на фоні виражених адаптивних змін в ієрархії окисного конститутивного (зниження) *de novo* синтезу оксиду азоту, а також неокисного реутилізаційного його синтезу (підвищення) і окисної деградації L-аргініну (збільшення).

3. Дезадаптація організму юнаків наприкінці змагального періоду супроводжується значним зростанням рівнів генерації АФК, що спричиняє інтенсифікацію перекисного окиснення ліпідів, а також підвищенням вмісту NO_3^- , котрий є маркером для встановлення наявності і оксидативного, і нітрозативного стресу у спортсменів.

Н.В. Богдановская, А.В. Коцюрuba,
А.В. Голубенко

ИНДУКЦИЯ ОКСИДАТИВНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА У ЮНОШЕЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ В ТРЕНИРОВОЧНОМ И СОРЕВНОВАТЕЛЬНОМ ПЕРИОДАХ

Изучали особенности развития оксидативного и нитрозативного стресса у практически здоровых лиц под влиянием длительных физических нагрузок большого объема и интенсивности. Показано, что для юношей, которые систематически выполняют мышечную работу, характерны высокое содержание маркеров различных путей генерации супероксидного радикала, активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и нитрозативного стресса. Увеличение степени неблагоприятного воздействия на организм интенсивных тренировочных и соревновательных нагрузок сопровождается выраженными адаптивными изменениями в иерархии окислительного индуцибельного *de novo* синтеза оксида азота (увеличение в 3 раза), а также неокислительного реутилизационного его синтеза (увеличение в 3 раза). Дезадаптация организма юношей в конце соревновательного периода выражается в повышении содержания продуктов распада пуриновых нуклеотидов в 2 раза, в росте уровней генерации активных форм кислорода (супероксидного радикала в 3,5 раза и перекиси водорода в 2,5 раза), а также в повышении содержания нитрат-аниона в 2,5 раза.

Ключевые слова: индукция; оксидативный стресс; нитрозативный стресс; адаптация; физические нагрузки.

**N.V. Bogdanovskaya, A.V. Kotsuruba,
A.V. Golubenko**

INDUCTION OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS IN BOYS IN ADAPTING TO PHYSICAL STRESS DURING TRAINING AND COMPETITIVE PERIODS

We studied the features of development of oxidative and nitrosative stress in otherwise healthy individuals under the influence of prolonged exercise of high volume and intensity. It is shown that young men who systematically performed muscular work have a high content of markers of different ways of generation of superoxide radical, a reactive oxygen species for products of lipid peroxidation and markers of nitrosative stress. The increase in the degree of adverse effects on the body intensive training and competitive loads is accompanied by pronounced adaptive changes in the hierarchy of oxidizing constitutive de novo synthesis of nitric oxide, as well as its nonoxide reutilization synthesis (in 3 times higher). Disadaptation of the organism of boys at the end of the competition period is reflected in growing levels of generation of ROS (superoxide radical: 3,5 times higher, hydrogen peroxide: 2,5 times higher). The products of purine nucleotides degradation were 2 times higher, and the increase in the content of the nitrate anion was 2,5 times higher.

Key words: induction; oxidative stress; nitrosative stress; adaptation; physical activity.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

REFERENCES

- Martinovich GG, Cherenkevich SN. Oxidation-reduction processes in cells: Monograph. Mn.: BSU, 2008. 159 P. [Russian].
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 107:1198-05.
- Andras Perl Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* 2013; 9 (11):674-86.
- Thomas J. Grahame and Richard B. Schlesinger Grahame Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Part Fibre Toxicol.* 2012; 9: 9-21.
- Dario Pitocco, Manfredi Tesauro, Rizzi Alessandro, Giovanni Ghirlanda, and Carmine Cardillo Oxidative Stress in Diabetes: Implications for Vascular and Other Complications. *Int J Mol Sci.* 2013; № 14(11):21525–50.
- Dvorschenko KO. The effect of ionizing radiation and hydrogen peroxide on the performance of oxide - antioxidant balance and energy metabolism in thymocytes and hepatocytes in vitro. *Kiev national University of Taras Shevchenko.* 2004; 20 [Ukrainian].
- Gomez-Cabrera M, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine.* 2008;44 (2): 126-31.
- Gavrilov VB., Gavrilova AG. The Measurement of diene conjugates in plasma blood by UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *The lab. case.* 1988; 2:60-3.
- Biochemical research methods in the clinic. *Guide. Medicine.* 1969:652.
- McCord J., Fridovich I.A. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem. J.* 1982; 203(3): 551–8.
- Conte D., Narindrasorasa KS., Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. *Eur. J. Biochem.* 1996; 271(9):5125–30.
- Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalic degradation of hydrogen peroxide in lactoperoxidase iodide system. *Eur. journal Biochemistry.* 1984; 1:69-4.
- Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test *Anal. Biochem.* 1978; 86 (1):271-8.
- Salter M., Knowles RG., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1991;291 (1):145-9.
- So Yeon Chin, kailash n. Pandey, Shang-Jin Shi, Hiroyuki Kobori, Carol Moreno, And L. Gabriel Navar. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Amer. J. Physiol.* 1999;277 (5 Pt. 2):797-4.
- Svenson AA. Rapid and Sensitive Spectrophotometric Method for Determination of Hydrogen Sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal Biochem.* 1980;107:51-5.
- Jszakahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats. *Am J. Physiol.* 1996; (270)5:840-5.
- Alikulov ZA., Lviv NP., Kretovich VL. Nitrate and nitrite is activity of milk. *BioChem.* 1980;45(9):1714-8 [Russian].
- Shugaley VS, Kozina AS. The content of urea and arginase activity in the organs of rats during acclimatization to cold // *Fiziol Zh. USSR.* 1977; 8:1199-2.
- Garganta CL, Bond JS. Assay and kinetics of arginase *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265–75.
- Gutteredge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry.* 1995;41:1819-28.
- Bogdanovska NV, Kotsuruba AV, Malikov MV. Features of metabolism of arginine and nitric oxide synthesis in young men during adaptation to physical stress during training and competitive periods *Fiziol Zh.* 2011;57:45-54 [Ukrainian].

24. Sojitra B, Bulani Y, Putchu UK, Kanwal A, Gupta P, Kuncha M, Banerjee SK. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. *Mol Cell Biochem.* 2012;360:61-9.
25. Green D, Maiorana A, Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.* 2004; 561(1):1-25.
26. Rakhmanov RS, Troshin VV, Blinova TV, Strakhova LA. Correction of immunodeficiency States and antioxidative status during strenuous exercises products with a high content of biologically active substances. *Med Almanac.* 2012;3:156-8 [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 08.12.2015