

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Овчинников А.Н., Дерюгина А.В.

РОТОВАЯ ЖИДКОСТЬ КАК ВЫСОКОИНФОРМАТИВНЫЙ СУБСТРАТ НЕИНВАЗИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ В УСЛОВИЯХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», кафедра физиологии и анатомии, 603950, Нижний Новгород, Россия

Цель: исследовать эффективность измерения показателей окислительного стресса и маркеров повреждения мышечной ткани в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов при физической нагрузке для анализа их функционального состояния. В исследовании приняло участие 70 высококвалифицированных спортсменов мужского пола в возрасте от 16 до 20 лет, специализирующихся в циклических видах спорта (легкая атлетика, плавание). Контрольные упражнения для спортсменов представляли серию отрезков 3×100 метров гладким бегом с отдыхом между ними 45 секунд – для легкоатлетов, и 4×50 метров ведущим стилем плавания с отдыхом между отрезками 45 секунд – для пловцов. Активность креатинкиназы и содержание продуктов ПОЛ в сыворотке крови и ротовой жидкости измеряли стандартными биохимическими методами. Установлено, что при выполнении контрольных упражнений происходит генерация продуктов липопероксидации, повышается активность креатинкиназы в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов. Проведение корреляционного анализа показало, что интенсивность реакций свободнорадикального окисления липидных субстратов у высококвалифицированных спортсменов можно оценивать по уровням продуктов ПОЛ в ротовой жидкости.

Ключевые слова: ротовая жидкость; продукты ПОЛ; окислительный стресс; креатинкиназа; повреждение мышц; высококвалифицированные спортсмены; физическая нагрузка.

Для цитирования: Овчинников А.Н., Дерюгина А.В. Ротовая жидкость как высокоинформативный субстрат неинвазивного исследования процессов липопероксидации и повреждения мышечной ткани у высококвалифицированных спортсменов в условиях физических нагрузок. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 405-408.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-405-408>

Ovchinnikov A.N., Deryugina A.V.

SALIVA AS HIGHLY INFORMATIVE SUBSTRATE FOR NON-INVASIVE ANALYSIS OF LIPOPEROXIDE PROCESSES AND MUSCLE DAMAGE IN HIGHLY SKILLED ATHLETES

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Department of Physiology and Anatomy, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

The purpose of the investigation was to study the efficiency of measuring markers of oxidative stress and muscle damage in the oral fluid in highly skilled sportsmen under physical exercise for the assessment of their functional state. 70 highly qualified athletes at the age of 16-20 years specializing in the cyclic kinds of sports (track and field, swimming) took part in the investigation. Sportsmen performed the control test which consisted of the series of 3×100 m distances by a flat race with an active 45 s rest between them for the track and field athletes, and 4×50 m by the main swimming style with an active rest between the distances also for 45 s for the swimmers. Activity of creatine kinase, content of lipid peroxidation products in the blood and oral fluid were measured standard biochemical methods. The performance of the functional tests induces the excessive accumulation of toxic products of lipoperoxidation and increases activity of creatine kinase in the oral fluid of highly qualified athletes. Correlation analysis shows, that the intensity of free radical and peroxide processes in athletes can be evaluated by means of the method of measuring the content of lipid peroxidation products in the oral fluid.

Key words: saliva; lipid peroxidation; oxidative stress; creatine kinase; muscle damage; highly qualified athletes; physical load.

For citation: Ovchinnikov A.N., Deryugina A.V. Saliva as highly informative substrate for non-invasive analysis of lipoperoxide processes and muscle damage in highly skilled athletes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (7): 405-408 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-405-408>

For correspondence: Ovchinnikov A.N., PhD student of the Department of Physiology and Anatomy; e-mail: alexander_ovchinnikov91@mail.ru

Information about authors:

Ovchinnikov A.N., <https://orcid.org/0000-0001-7527-3503>.

Deryugina A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8812-8559>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.05.2019
Accepted 04.07.2019

Введение. Доминирующее значение в современных условиях в общем комплексе медико-биологических процедур и инструментального контроля уровня физической подготовленности занимает совершенствование неинвазивных методов оперативной диагностики функционального состояния организма спортсменов. Субстратом биохимических исследований, как правило, является кровь, а также моча, реже – выделения потовых желез и ротовая жидкость [1]. Однако забор крови в условиях учебно-тренировочного процесса предусматривает присутствие квалифицированного персонала и наличие специального оборудования с целью предупреждения риска инфицирования, а также нередко приводит к возникновению состояния психологического дискомфорта у спортсменов. Вместе с тем, при использовании сыворотки крови и мочи в качестве субстратов биохимического скрининга неосуществимо многократное получение проб у спортсменов на разных этапах учебно-тренировочного занятия, в отличие от возможности забора ротовой жидкости. Кроме того следует учитывать требования ВАДА, где к перечню запрещенных отнесены любые формы внутрисосудистых и иных манипуляций с кровью или ее компонентами физическими или химическими методами [2]. Сложившаяся ситуация обуславливает предпочтительность использования ротовой жидкости (смешанной слюны) в качестве информативной биологической среды организма с высокой степенью доступности, специфичности и чувствительности. Известно, что одной из основных функций слюны является поддержание гомеостаза в ротовой полости. В её состав входят органические и неорганические компоненты из слюнных желез, сыворотки крови и тканей полости рта [3]. Оценка буффального эпителия позволяет судить о дестабилизационных процессах на местном и системном уровнях [4]. Кроме того, слюна содержит липиды, которые могут служить субстратом для свободнорадикальных процессов, антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы), витамины (А, С, Е), биологически активные вещества, известные как модуляторы реакций свободнорадикального окисления (адреналин, серотонин, гистамин, стероиды и др.) [5]. Вышеуказанное характеризует перспективность изучения биохимических показателей метаболизма в ротовой жидкости квалифицированных спортсменов в условиях выполнения ими физических упражнений для оценки уровня окислительного стресса и степени повреждения мышечной ткани.

Цель работы – исследовать эффективность измерения показателей окислительного стресса и маркеров повреждения мышечной ткани в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов при физической нагрузке для анализа их функционального состояния.

Материал и методы. В исследовании приняло участие 70 высококвалифицированных спортсменов мужского пола в возрасте от 16 до 20 лет, специализирующихся в циклических видах спорта (легкая атлетика, плавание). Контрольные упражнения для спортсменов представляли серию отрезков 3×100 метров гладким бегом с отдыхом между ними 45 секунд – для легкоатлетов, и 4×50 метров ведущим стилем плавания с отдыхом между отрезками 45 секунд – для пловцов.

Объектом исследования биохимических показателей выступала кровь и смешанная слюна (ротовая жидкость) спортсменов. Ротовую жидкость собирали в пластиковую микроцентрифужную пробирку без дополнительной стимуляции. Забор образцов крови производился из локтевой вены.

Перед участием в исследовании каждый спортсмен был ознакомлен с его условиями и подписал форму добровольного информированного согласия. Исследование было организовано и проводилось в соответствии с этическими нормами, установленными Хельсинкской декларацией [6].

Уровень первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и конечных продуктов липопероксидации – оснований Шиффа (ОШ) определяли на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ СПЕКТР», Россия) по методу И.А. Волчегорского [7]. Активность креатинкиназы (КК) в ротовой жидкости оценивали энзиматическим кинетическим методом в диапазоне 1-1100 Ед/л в биохимическом анализаторе «Clima MC-15» («RAL», Испания) с использованием набора реагентов СК-NAС DiaS (Германия).

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием программных приложений Microsoft Excel 2013, Statistica 12, R. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Анализ на предмет определения статистически значимых различий проводили с применением критерия Вилкоксона. С целью установления статистических связей между исследуемыми показателями окислительного стресса в крови и ротовой жидкости проводили корреляционный анализ.

Результаты и обсуждение. Преодоление пловцами серии отрезков 4×50 метров ведущим стилем плавания с отдыхом между отрезками 45 секунд приводило к интенсификации реакций свободнорадикального окисления липидных субстратов (табл. 1).

Так, содержание ТК и ОШ в ротовой жидкости пловцов после физической нагрузки было статистически значимо выше на 5,71% и 15,73% в сравнении со значениями преднагрузочного состояния спортсменов. Кроме того, после выполнения функционального теста пловцами, показатель ОШ/(ДК+ТК), характеризующий направленность процессов липопероксидации, статистически значимо увеличился в сторону преобладания ОШ в ротовой жидкости на 12,8% в сравнении с данными преднагрузочного периода.

В условиях преодоления легкоатлетами серии отрезков 3×100 метров гладким бегом с отдыхом между ними 45 секунд также показано статистически значимое увеличение уровня молекулярных продуктов ПОЛ в постнагрузочных образцах ротовой жидкости по сравнению с преднагрузочными данными (табл. 2).

Так, после выполнения контрольного упражнения легкоатлетами содержание ДК, ТК и ОШ в ротовой жидкости было статистически значимо больше на 3,57%, 3,03% и 58,88% соответственно в сравнении со значениями преднагрузочного периода. Вместе с тем, коэффициент ОШ/(ДК+ТК), отражающий направленность процессов свободнорадикального окисления липидных субстратов в сторону накопления наиболее токсичных продуктов липопероксидации – ОШ, достоверно увеличился после физической нагрузки на 52,36%.

В свою очередь активность креатинкиназы в ротовой жидкости спортсменов после физической нагрузки была статистически значимо выше на 51,01% в сравнении с преднагрузочными данными (табл. 3).

При проведении корреляционного анализа установлена тесная прямая статистическая связь между показателями интенсивности свободнорадикального окис-

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в ротовой жидкости высококвалифицированных пловцов ($M \pm m$), $n = 40$

Показатель, ед. измерения	До физической нагрузки	После физической нагрузки
ДК, отн. ед.	0,28±0,001	0,28±0,002
ТК, отн. ед.	0,35±0,004	0,37±0,004*
ОШ, отн. ед.	127,23±3,42	147,24±4,81*
ОШ/(ДК+ТК), отн. ед.	200,75±3,90	226,44±5,61*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 : * - статистически значимая разница значений показателя до и после физической нагрузки, тест Вилкоксона, $p < 0,05$.

Таблица 2

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в ротовой жидкости высококвалифицированных легкоатлетов ($M \pm m$), $n = 30$

Показатель, ед. измерения	До физической нагрузки	После физической нагрузки
ДК, отн. ед.	0,28±0,003	0,29±0,004*
ТК, отн. ед.	0,33±0,009	0,34±0,008*
ОШ, отн. ед.	89,27±3,59	141,83±7,50*
ОШ/(ДК+ТК), отн. ед.	146,24±3,60	222,81±8,73*

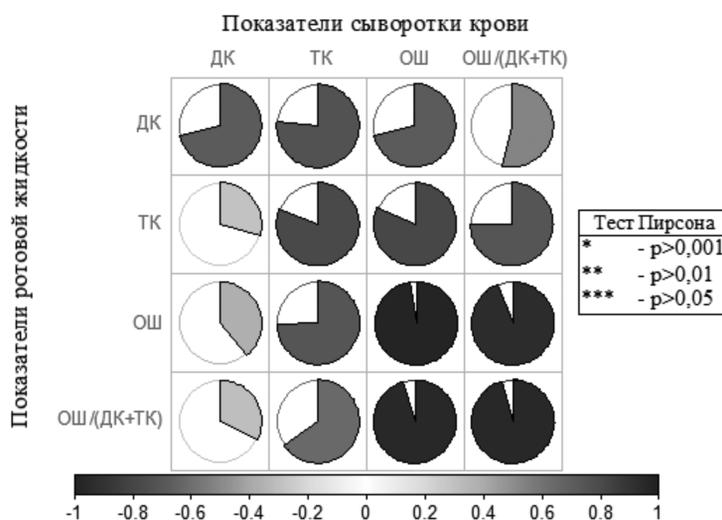
Таблица 3

Активность креатинкиназы в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов ($M \pm m$), $n = 30$

Показатель, ед. измерения	До физической нагрузки	После физической нагрузки
Креатинкиназа, отн. ед.	37,33±2,99	56,37±3,73*

ления липидов в сыворотке крови и смешанной слюне спортсменов в условиях выполнения физических упражнений. Сильная статистическая зависимость установлена между количеством ДК ($R=0,756$) в ротовой жидкости и сыворотке крови, содержанием ТК ($R=0,809$) в смешанной слюне и сыворотке крови (см. рисунок).

Особенно тесная корреляция выявлена между концентрацией ОШ ($R=0,974$) в ротовой жидкости и сыворотке крови спортсменов после выполнения контрольных упражнений. Анализ результатов показал, что выполнение физических упражнений в зоне максимальной физиологической мощности сопровождается развитием окислительного стресса, проявляющегося изменением уровня продуктов липопероксидации не только в крови, но и в ротовой жидкости, что является отражением биохимических сдвигов, которые возникают при физических нагрузках. Известно, что во время мышечных сокращений увеличивается потребление молекулярного кислорода миоцитами, подавляющая часть которого используется электрон-транспортной цепью митохондрий в реакциях окислительного фосфорилирования с образованием молекулы воды [8], а другая часть конвертируется в супероксид анион радикал [9, 10]. При этом потеря электронов ферментными комплексами дыхательной цепи, которая приводит к генерации супероксид анион радикалов, во время сократительной активности мышечного волокна существенно меньше, чем в период расслабления, и составляет менее 0,15% от суммарного потребления кислорода клеткой [8- 12]. Следовательно, можно предположить, что основной вклад в интенсификацию реакций свободнорадикального окисления во время напряженной двигательной деятельности вносят другие метаболические пути [10, 13]. Ключевым источ-



Корреляционная матрица маркеров окислительного стресса в сыворотке крови и ротовой жидкости спортсменов, $n = 70$.

ником генерации реакционно-активных форм кислорода (АФК) в поперечно-полосатой мышечной ткани выступают две изоформы НАДФН-оксидазы (NOX2 и NOX4), катализирующие превращение внеклеточного молекулярного кислорода в супероксид анион радикал, используя внутриклеточный НАДФН в качестве донора электронов [10, 11, 13]. Другим потенциальным механизмом генерации АФК может являться рост активности ксантиноксидазы, который опосредован накоплением продуктов распада пуринового обмена в условиях гипоксии [10, 13]. При реперфузии ксантиноксидаза катаболизирует гипоксантин до мочевой кислоты и в сопряженной реакции восстанавливает молекулярный кислород до супероксид анион радикала, который, в свою очередь,

спонтанно дисмутирует в пероксид водорода. Третьим метаболическим путем инициации ПОЛ может служить активация липоксигеназ, катализирующих реакцию диоксигенации полиненасыщенных жирных кислот [10, 11]. Однако следует подчеркнуть, что интенсификация цепных реакций свободнорадикального окисления в организме в норме купируется своевременным функциональным ответом со стороны системы антиоксидантной защиты. Патологические последствия для метаболического фона возникают, прежде всего, в случае неспособности эндогенной антиоксидантной системы обеспечить поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия в границах физиологического оптимума, что в итоге приводит к катализации свободнорадикальных реакций и генерации токсичных продуктов пероксидации [1]. Последнее сопровождается нарушением структуры и функциональной активности клеток: от изменения проницаемости и барьерной функции мембран до лизиса и апоптоза клетки [14]. Идентификация во внеклеточной среде организма повышенного содержания растворимых мышечных ферментов, в частности креатинкиназы, может указывать на дезорганизацию структуры саркомера, нарушение барьерных свойств сарколеммы, повреждение миоцитов [15].

Таким образом, биохимические сдвиги, возникающие при повышенной двигательной активности, связаны с изменениями направленности метаболизма мышечной ткани, а анализ ротовой жидкости может выступать в качестве надежного атравматичного метода ранней диагностики в системе мониторинга предупреждения перетренированности и дизадаптации организма, обуславливающих снижение физической работоспособности высококвалифицированных спортсменов.

Выводы.

1. Выполнение физических упражнений максимальной физиологической мощности с интервалами отдыха стимулирует генерацию продуктов ПОЛ, увеличивает активность креатинкиназы в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов.

2. Интенсивность процессов окислительной деградации липидных субстратов у спортсменов целесообразно оценивать по уровням продуктов липопероксидации в ротовой жидкости, что позволит оперативно корректировать многоуровневую систему подготовки спортсменов и улучшать их функциональное состояние.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 6, 8-13, 15 см. REFERENCES)

1. Контрощикова К.Н., Тихомирова Ю.Р., Овчинников А.Н., Колегова Т.И., Чуркина Н.Н., Кузнецова С.Ю. и др. Использование показателей свободнорадикального окисления в ротовой жидкости в качестве маркеров функционального состояния спортсменов. *Современные технологии в медицине*. 2017; 3: 82-6.
3. Гильмирова Ф.Н., Радомская В.М., Гергель Н.И. Аналитические подходы к изучению показателей метаболизма в ротовой жидкости. М.: Известия; 2006.
4. Дерюгина А.В., Ивашенко М.Н., Игнатьев П.С., Самоделькин А.Г., Белов А.А., Гушчин В.А. Оценка генотоксичных эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 290-2.

5. Фотина И.А. Диагностическая информативность изменений биохимических показателей сыворотки крови и ротовой жидкости при сахарном диабете 2-го типа. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2012; 1: 133-5.
7. 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): 127-31.
14. Гунина Л.М. Окислительный стресс и адаптация: метаболические аспекты влияния физических нагрузок. *Наука в олимпийском спорте*. 2013; 4: 19-25.

REFERENCES

1. Kontorshchikova K.N., Tihomirova Yu.R., Ovchinnikov A.N., Kolegova T.I., Churkina N.N., Kuznetsova S.Y. et al. Indices of Free Radical Oxidation in the Oral Fluid as Markers of Athletes' Functional State. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2017; (3): 82-6. (in Russian)
2. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. International Standard. Prohibited List 2019.
3. Gil'miyarova F.N., Radomskaya V.M., Gergel N.I. Analiticheskie podkhody k izucheniyu pokazateley metabolizma v rotovoy zhidkosti [Analytical approaches to the study of metabolism indices in the oral fluid]. Moscow: Izvestiya; 2006. (in Russian)
4. Deriugina A.V., Ivaschenko M.N., Ignatiev P.S., Samodelkin A.G., Belov A.A., Gushchin V.A. The evaluation of genotoxic effects in buccal epithelium under disorders of adaption status of organism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(5): 290-2. (in Russian)
5. Fotina I.A. Diagnostic changes informativeness of biochemical indicators of blood serum and the oral liquid at the diabetes mellitus mellitus 2 types. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennye nauki*. 2012; (1): 133-5. (in Russian)
6. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Journal of the American Medical Association*. 1997; 277(11): 925-6.
7. Volchegorskii I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Lifshic R.I. Comparison of various approaches to determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 35(1): 127-31. (in Russian)
8. Vasilaki A., Jackson M.J. Role of reactive oxygen species in the defective regeneration seen in aging muscle. *Free radical biology & medicine*. 2013; 65: 317-23.
9. Lamb G.D., Westerblad H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2011; 589: 2119-27.
10. Sakellariou G.K., Jackson M.J., Vasilaki A. Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD(P)H oxidases. *Free radical research*. 2014; 48(1): 12-29.
11. Powers S.K., Ji L.L., Kavazis A.N., Jackson M.J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*. 2011; 1(2): 941-69.
12. Kozakowska M., Pietraszek-Gremplewicz K., Jozkowicz A., Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *Journal of muscle research and cell motility*. 2015; 36(6): 377-93.
13. Beckendorf L., Linke W.A. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *Journal of muscle research and cell motility*. 2015; 36(1): 25-36.
14. Gunina L.M. Oxidative stress and adaptation: metabolic aspects of physical activity impact. *Nauka v olimpiyskom sporte*. 2013; (4): 19-25. (in Russian)
15. Aoi W., Naito Y., Yoshikawa T. Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage. *Free radical biology & medicine*. 2013; 65: 1265-72.

Поступила 20.05.19

Принята к печати 04.07.19