

03.00.00 Biological sciences

03.00.00 Биологические науки

UDC 612.42; 612.46.322; 612.13; 612.57.034

Post-Exercise Effect of Anabolic Drug on Blood Cell Apoptosis

¹Unzira N. Kapuseva

²Sholpan K. Bakhtiyarova

³Elena A. Kustova

⁴Natalya T. Urazalieva

⁵Lola H. Mahmudova

¹Republican State Enterprise «Institute of Physiology of human and animals», Kazakhstan
Dr. (Biological), Professor

Almaty, 050060, AV. Al-Farabi, 93

E-mail: i_phys@mail.ru; unzira@inbox.ru

²Republican State Enterprise «Institute of Physiology of human and animals», Kazakhstan
PhD (Biological)

Almaty, 050060, AV. Al-Farabi, 93

E-mail bifara.66@mail.ru

³Republican State Enterprise «Scientific Center of Pediatrics and Pediatric Surgery», Kazakhstan
PhD (Biological)

E-mail lenbush@list.ru

⁴Republican State Enterprise «Scientific Center of Pediatrics and Pediatric Surgery», Kazakhstan
laboratory doctor

⁵Republican State Enterprise «Institute of Physiology of human and animals», Kazakhstan
Kazakhstan, Almaty, 050060, AV. Al-Farabi, 93

PhD (Biological)

Abstract. Intake of anabolic phytoecdysteroid “Ekdifit” conduces to the immune system reinforcement and apoptosis activation due to the high rate of metabolism and antioxidant effect of the drug, regulating stability of pro- and antioxidant balance in the blood cells.

Keywords: Anabolic steroid; phytoecdysteroid; “Ekdifit”; apoptosis; immunity; apoptosis markers; ANNEXIN-V; CD95; bcl-2.

Введение. Анаболические средства, благодаря своему общеукрепляющему и биостимулирующему действию, способны оказывать благоприятное воздействие при лечении практически любого заболевания, в связи с чем круг медицинских показаний к применению анаболиков постоянно расширяется. Анаболические средства – это целая группа самых различных по структуре и по происхождению средств, фармакологический эффект которых обусловлен их стимулирующим влиянием их на биосинтез нуклеиновых кислот, белка, липидов и других макромолекул организма [1-6].

Растительные анаболики практически не обладают токсичностью, хорошо переносятся, имеют очень мало противопоказаний и их условно делят на две большие группы: РА-адаптагены и РА гипогликемического действия. К РА-адаптогенам как источникам фитоэктистероидов относится серпуха венценосная (*Serratula coronata* L.). На основе экстракта серпухи венценосной, содержащего фитоэктистероиды и флавоноиды, Международным научно-производственным холдингом «Фитохимия» (г. Караганда) была создана таблетированная лекарственная форма препарата «Экдифит», обладающая анаболическим, адаптогенным и тонизирующим свойствами [7-10].

Однако до сих пор не изучено состояние про- и антиапоптозного баланса клеток крови в организме человека после применения данного фитопрепарата, обладающего выраженными анаболическими свойствами, тем более, что Экдифит был рекомендован для применения после тяжелых травм, операций, ожогов, при нарушении белкового обмена,

при кахексиях различного генеза, при хронических заболеваниях, сопровождаемых потерей белка. Исследования реакции апоптоза в организме необходимы для прогнозирования и обоснования применения любого препарата для лечения многих состояний, так как апоптоз и его нарушения лежат в основе развития многих патологических процессов, при этом нарушается баланс двух диаметрально противоположных по смыслу процессов – пролиферации и апоптоза (увеличение численности клеточной популяции и гибель клеток) [11].

Материалы и методы исследования. В исследованиях принимали участие волонтеры по договору – научные сотрудники, студенты, проживающие в г. Алматы, в возрасте от 20 до 60 лет. Всего было обследовано 54 человека. Исследования проводили в 3 этапа – до приема «Экдифита» и физической нагрузки, через 3 и 6 недель после приема «Экдифита» и после физической нагрузки. Контрольная группа – группа условно здоровых людей (20 человек).

Определение маркеров апоптоза (ANNEXIN-V, CD95, bcl-2), клеточного иммунного звена (CD3, CD19, CD4, CD8, CD16+56, HLA-DR, CD25) в крови обследуемых проводили с помощью проточной цитофлюориметрии FacsCalibur (Becton Dickinson, USA).

Статистическая обработка. При математической обработке полученных данных использовали следующие методы: двухфакторный дисперсионный анализ, корреляционный и регрессионный анализ, определение доверительных интервалов. Для всех серий результатов находили средние арифметические величины и их средние квадратические ошибки. Для сравнения средних величин в процессе статистической обработки полученных данных использовали вычисление критерия достоверности разницы (t-критерий Стьюдента). Различия распределений между группами устанавливали по критерию χ^2 . Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для статистической обработки полученных результатов использовали компьютерную программу Biostat.

Результаты исследований

Иммунная система. Сравнительный анализ данных групп испытуемых до и после физической нагрузки по показателям популяционного состава лимфоцитов периферической крови показал, что ни по одному из показателей достоверной разницы нет ($P < 0,05$). Следовательно, физическая нагрузка не влияла на изменения показателей клеточного звена иммунитета, что не противоречит литературным данным (таблица 1).

Однако следует отметить, что после физической нагрузки показатели клеточного звена иммунной системы испытуемых достоверно ($P < 0,05$) отличались от референтных границ нормы. Так, относительное количество CD3 и CD4-лимфоцитов было ниже нормативных показателей, иммунорегуляторный индекс также значительно снижен. Экспрессия молекулы поздней активации HLA-DR превышала верхнюю границу нормы. Кроме этого было обнаружено увеличение относительного количества натуральных киллеров CD16+56+ ($P = 0,036$).

Таким образом, в группе испытуемых после физической нагрузки было выявлено достоверное снижение CD3-лимфоцитов, CD4-лимфоцитов, ИРИ, увеличение содержания HLA-DR и относительного количества натуральных киллеров CD16+56+ по сравнению с референтными значениями физиологической нормы, приведенными от производителя.

После приема фитопрепарата с анаболическим эффектом «Экдифит». Как видно из данных, приведенных в таблице 2, через 3 недели приема фитопрепарата относительное количество CD3-лимфоцитов в группе испытуемых было достоверно ниже относительного содержания этого антигена в группе контроля ($P < 0,001$), но после 6-недельного курса восстановилось до нормы ($66,66 \pm 8,9$ %).

Таблица 1

**Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови
испытуемых до и после физической нагрузки**

Группы	Содержание соответствующей популяции лимфоцитов*, %				ИРИ, CD4/CD8	Содержание соответствующей популяции лимфоцитов, %	
	CD3+	CD19+	CD4+	CD8+		HLA-DR	CD16+56+
До нагрузки	61,49±13,2	8,76±0,34	28,72±2,79	39,21±2,89	0,81 ±0,0 5	14,32±2,51	25,37±3,44
После нагрузки	62,09±9,72	8,09±0,33	27,21±6,8	40,38±2,71	0,72 ±0,0 3	12,04±1,29	28,41± 3,18
Контр. группа	68,78±6,11	10,16±0,32	33,75±6,7	35,90±3,83	1,02 ±0,0 1	13,62±1,51	15,02±1,61
Норма	58-85	10-23	35-50	25-35	1,5- 2,0	5-10	8-19

*-Среднеквадратическая величина и ее среднеквадратическая ошибка

Антиген В-лимфоцитов CD19+ достоверно не менялся после 3-х и 6-ти недель приема препарата «Экдифит», также как и маркер поздней активации HLA-DR (P<0,05).

Таблица 2.

**Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови
испытуемых до и после приема препарата «Экдифит»**

Группы обследуемых	Содержание соответствующей популяции лимфоцитов*, %				Соотношение содержания ИРИ (CD4/CD8)	Содержание соответствующей популяции лимфоцитов, %	
	CD3+	CD19+	CD4+	CD8+		HLA-DR	CD16+56+
Ч/з 3 нед.	53,97±2,14**	8,61±1,36	22,04±5,91	44,26±7,7* *	1,3±0,03* *	12,18±2,53**	32,67±3,15**
Ч/з 6 нед.	66,66±8,9	8,20±1,32* *	32,36±4,22**	38,08±7,3	0,89±0,0 3	13,24±4,32	22,24±1,10**
Контрольная	68,78±6,1	10,16±1,32	33,75±2,67	35,90±8,3	1,0±0,05	13,61±2,51	15,02±2,61
норма	58-85	10-23	35-50	25-35	1,5-2,0	5-10	8-19

*-Среднеквадратическая величина и ее среднеквадратическая ошибка; **P<0,001- между группами обследуемых

Надо отметить, что в группе испытуемых после 3-х недель приема препарата «Экдифит» на 35 % уменьшилось относительное количество хелперов/индукторов CD4 (22,04±5,91 %) и восстановилось до контрольных значений после 6-недельного курса (32,36±4,22 %).

Выявлено, что содержание натуральных киллеров CD16+56+ после 3-х недель приема препарата «Экдифит» у испытуемых было в 2 раза выше, чем в контрольной группе (32,67±13,5 %), а после 6-ти недель приема данный показатель снизился на 50 % в целом в

группе испытуемых, хотя оставался достоверно выше от значений группы контроля на 48 % ($t=13.63$, $P<<0,001$).

Как следует из приведенных данных, после приема фитопрепарата «Экдифит» на протяжении 3х недель, по сравнению с контрольными показателями, в группе испытуемых после физической нагрузки было выявлено достоверное снижение CD3-лимфоцитов на 30 %, CD4 – на 35 %, увеличение содержания относительного количества натуральных киллеров CD16+56+ в 2 раза. Изменения данной группы показателей после 6-недельного приема «Экдифита» были менее значимые, прослеживалась тенденция к восстановлению контрольного уровня, кроме данных относительного количества натуральных киллеров CD16+56+, превышение которых в крови составляло 48 % по отношению к контролю.

Таким образом, при исследовании показателей клеточного звена иммунитета отмечен дисбаланс основных показателей иммунного статуса в группе испытуемых, которые отличались от группы контроля, а также референтных границ нормы.

Маркеры апоптоза. Нами было изучено содержание поверхностных антигенов ANNEXIN-V, CD95, CD25, а также цитоплазматического антигена Bcl-2 в группе испытуемых до и после физической нагрузки, а также после 3 и 6 недель приема препарата «Экдифит». Данные отображены в таблице 3.

Таблица 3

Содержание маркеров апоптоза и активации в группе испытуемых*, %

маркер группа	ANNEXIN-V	Bcl-2	CD95	CD25	CD95/CD25
Контрольная группа	2,02 ± 0,68**	15,47 ± 0,86	3,20 ± 0,33	13,66 ± 1,68	2,42 ± 0,18
до физ. нагрузки	0,55 ± 0,04	16,55 ± 2,43	2,68 ± 0,20**	10,88 ± 0,36	2,02 ± 0,14
после физ. нагрузки	1,22 ± 0,23	5,72 ± 0,61**	4,06 ± 0,44**	8,72 ± 0,39	2,60 ± 0,18
ч/з 3 нед.	1,15 ± 0,12	12,49 ± 0,23**	3,68 ± 0,22	5,58 ± 0,24	1,74 ± 0,12
ч/з 6 нед.	2,66 ± 0,13**	15,79 ± 2,44**	3,50 ± 0,14	5,85 ± 0,51	1,69 ± 0,17
*-Среднеквадратическая величина и ее среднеквадратическая ошибка; ** $P<0,001$ - между группами обследуемых					

Как видно из данных, представленных в таблице 3, экспрессия аннексина в группе после физического стресса была в 2,2 раза выше, чем в группе лиц, не подвергавшихся нагрузке ($t=9.8$, $P=0,001$). После 3-недельного приема «Экдифита» экспрессия аннексина увеличилась в 1,7 раза, а через 6 недель приема фитопрепарата – в 2 раза, в сравнении с данными группы лиц до физической нагрузки ($P=0.001$).

Экспрессия цитоплазматического антигена Bcl-2 в группе без нагрузки была в 3 раза выше ($t=10.2$, $P=0.001$), чем в группе испытуемых с физической нагрузкой: $16,55 \pm 2,43$ % и $5,72 \pm 0,61$ %, соответственно. После 3-х недель приема препарата «Экдифит» экспрессия Bcl-2 достоверно снизилась на 20% ($P=0,001$), а после 6-ти недель – увеличилась и стала соответствовать экспрессии данного маркера в контрольной группе ($15,79 \pm 2,44$).

После приема фитопрепарата «Экдифит» в течение 3-х недель экспрессия антигена CD95+ оставалась на высоком уровне, превышая контрольный на 15 %, после 6-недельного курса терапии – на 9 %, по сравнению с контрольной группой ($P=0,05$).

Относительное количество активационного антигена CD25 достоверно отличалось в группе испытуемых по отношению к контролю как после физической нагрузки, так и после

приема препарата «Экдифит». Однако надо отметить, что после приема препарата «Экдифит» независимо от сроков его потребления было выявлено снижение экспрессии CD25 в среднем на 50 %, по сравнению с данными контрольной группы.

Коэкспрессия антигенов CD95/CD25 в группе испытуемых не отличалась от контрольной группы ($2,42 \pm 0,18$ % и $2,02 \pm 0,14$ %, соответственно). После физической нагрузки CD95/CD25 увеличилось на 7 % по сравнению с контрольными данными. Прием препарата «Экдифит» на протяжении 3-х недель вызвал достоверное снижение коэкспрессии активационного антигена CD25 и молекулы CD95 на 30 %, а после 6-ти недель приема – достоверное снижение относительного количества данного показателя на 28 % ($t=10.18$, $P=0.001$).

Обсуждение. Сравнительный анализ данных групп испытуемых до и после физической нагрузки по показателям популяционного состава лимфоцитов периферической крови показал, что физическая нагрузка не влияет на состояние показателей клеточного звена иммунитета – выявляемость маркеров CD4+, CD8+, CD19+ и CD25+ до и после физического стресса оставалась на одном уровне.

После приема «Экдифита» в течение 3 и 6 недель количество лимфоцитов, иммунорегуляторный индекс и экспрессия поверхностного антигена CD95 на физическую нагрузку обследуемых от 20 до 50 лет достоверно повышалась, что указывает на улучшение иммунной системы и активацию апоптоза в связи с высоким уровнем метаболизма, вызванным действием фитопрепарата.

Одним из перспективных направлений повышения эффективности фармакотерапии заболеваний, сопровождающихся метаболическими нарушениями, является использование лекарственных средств, активизирующих собственные биоэнергетические процессы организма, одним из которых является апоптоз [12]. Исследования показали рост экспрессии аннексина как после физического стресса, так и после приема «Экдифита» по сравнению с данными этих же людей до физической нагрузки. Известно, что на ранней стадии апоптоза целостность клеточной мембраны сохраняется, однако происходит перестройка ее фосфолипидных компонентов и на поверхности клетки появляется фосфатидилсерин. Аннексин V способен связываться с фосфатидилсерином в присутствии кальция. Чем больше изменений в клеточных мембранах, тем больше Аннексина V связывается с фосфатидилсерином, тем выше скорость апоптоза [13]. Экспрессия поверхностного антигена CD95 после физического стресса и приема «Экдифита» также достоверно увеличивалась на 9–15 % по сравнению с контрольными значениями.

Следовательно, фитоэкдистероид «Экдифит» оказывает умеренный стимулирующий эффект на индукцию апоптоза клеток, так как экспрессия аннексина V и CD95 повышалась, а экспрессия антиапоптотического фактора Bcl-2, снижалась как после нагрузки, так и после приема фитопрепарата в течение 6 недель. Белок Bcl2 – один из основных регуляторов апоптоза, может останавливать апоптоз, опосредуемый белком p53 или иными механизмами. Он подавляет естественно происходящую клеточную гибель предположительно путем регуляции тока кальция в клетке. Снижение этого фактора говорит о недостаточности энергоснабжения клетки – дестабилизации работы митохондрий. Учитывая, что физическая нагрузка вызывает большой расход энергии и истощение энергоресурсов, то повышение данного белка после 3х-недельного курса приема Экдифита отражает энерговосстанавливающий и мембраностабилизирующий эффект фитопрепарата.

Примечания:

1. Виноградов П.А., Душанин А.П., Жолдак В.И. «Основы физической культуры и здорового образа жизни»/ П.А. Виноградов, А.П. Душанин, В.И. Жолдак. М.: Советский спорт, 2000. 133 с.
2. Потемкина Р.А. Физическая активность и питание. Школа здоровья / Р.А.Потемкина. М.: Издат. Группа Гэотар-медиа. 2010. 96 с.
3. Leadership for Active Living. Leadership action strategies. San Diego, San Diego State University, 2003, http://www.leadershipforactiveliving.org/pdf_file/.
4. At least five a week. Evidence on the impact of physical activity and its relationship to health. A report from the Chief Medical Officer. London, Department of Health, 2004 (<http://tinyurl.com/332mf>, по состоянию на 28 июля 2006 г.).

5. Кулиненко О.С. Фармакологическая помощь спортсмену. Коррекция факторов, лимитирующих спортивный результат / О.С. Кулиненко. М.: Советский спорт. 2007. 240 с.
6. Макарова М.Н., Макаров В.Г. Обзор методов оценки антирадикальной активности природных соединений // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. Санкт-Петербург:Фитофарм., Россия. 2005. С. 102-116.
7. Пунегова Н.В., Пунегов В.В., Сычев Р.Л. Получение субстанции «Экдистерон-80» из *Serratula coronata* L. и оценка ее фармакологического действия. I. Адаптогенная, гастропротекторная, термопротекторная и антигипоксическая активность субстанции // Хим.-фармац. журн. 2008. Т. 42, № 8. С. 6-11.
8. Пунегова Н.В., Федоров В.Н., Зайнуллин В.Г., Пунегов В.В., Сычев Р. Получение субстанции «Экдистерон-80» из *Serratula coronata* L. и оценка ее фармакологического действия. II. Кардиопротекторные свойства. Влияние субстанции на гормонально-медиаторный баланс в условиях хронической сердечной недостаточности // Хим.-фармац. журн. 2009. Т. 43, № 1. С. 45-49.
9. Кусаинова Д.Д., Карилхан И. Актопротектор «Экдифит» и его фармакологические показатели // Фармация Казахстана, специальный выпуск. 2005. С. 41-42.
10. Терешкина Н.Г., Альжанов С.С., Карилхан И. и др. Разработка твердой лекарственной формы на основе *Serratula coronata* L. // Этапы становления, современное состояние и фундаментальные проблемы развития образования и науки Казахстана: Матер. международной научно-практической конференции. Караганда, 2003. С. 5-10.
11. Фильченков А.А. Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии / А.А. Фильченков. Киев, 2003. 210 с.
12. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Зенкевич И.Г. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинации с другими антиоксидантами // Фармация. 2004. № 2. С. 30-32.
13. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. 2002. № 11. С. 25-32.

УДК 612.42; 612.46.322; 612.13; 612.57.034

Эффект действия препарата с анаболическим эффектом на активность апоптоза клеток крови после физической нагрузки

- ¹ Унзира Наурзбаевна Капышева
- ² Шолпан Кадирбаевна Бахтиярова
- ³ Елена Александровна Кустова
- ⁴ Наталья Турлыбековна Уразалиева
- ⁵ Лола Хамитовна Махмудова

¹ Институт физиологии человека и животных, Казахстан
доктор биологических наук, профессор

E-mail: unzira@inbox.ru

² Институт физиологии человека и животных, Казахстан
кандидат биологических наук

E-mail: bifara.66@mail.ru

³ Научный центр педиатрии и детской хирургии, Казахстан
кандидат биологических наук

E-mail: lenbush@list.ru

⁴ Научный центр педиатрии и детской хирургии, Казахстан
врач-лаборант

⁵ Институт физиологии человека и животных, Казахстан
кандидат биологических наук

Аннотация. Прием фитоэкдистероида с анаболическим эффектом «Экдифит» способствует улучшению состояния иммунной системы и активации апоптоза в связи с высоким уровнем метаболизма и выраженным антиоксидантным эффектом фитопрепарата, регулирующего устойчивость баланса про- и антиоксидантного соотношения в клетках крови.

Ключевые слова: Анаболик; фитоэкдистероид; экдифит; апоптоз; иммунитет; маркеры апоптоза; ANNEXIN-V; CD95; bcl-2.