

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная
Европа

4 (08) 2013

Беларусь

Журнал зарегистрирован
Министерством информации
Республики Беларусь 2 декабря 2011 г.
Регистрационное свидетельство № 1496

Учредитель:
УП «Профессиональные издания»
при участии Республиканского научного
общества специалистов клинической
лабораторной диагностики Беларуси
Директор Евтушенко Л.А.

Адрес редакции:
220023, Минск, ул. Чернышевского, 10а, оф. 612
Тел.: (017) 385 65 09, (017) 280 88 09
e-mail: lab@recipe.by

Заместитель главного редактора Салова О.В.
Руководитель сектора рекламы Коваль М.А.
Технический редактор Мурашко А.В.

Украина

Журнал зарегистрирован
Государственной регистрационной
службой Украины 16 декабря 2011 г.
Свидетельство KB № 18559-7359P

Учредитель:
УП «Профессиональные издания»

Представительство в Украине:
ООО «Издательский дом
«Профессиональные издания»
Директор Ильина В.А.
Контакты: тел.: +38 (067) 363 65 05, (095) 091 24 50
e-mail: profidom@ukr.net

Подписка: Беларусь:

в каталоге РУП «Белпочта»
индивидуальный индекс – 01389,
ведомственный индекс – 013892

Украина:

через офис ООО «Издательский дом
«Профессиональные издания»
по тел.: (+38 067) 360 93 80

Российская Федерация:

индекс 01389 в каталогах ООО «Интерпочта-2003»,
ООО «Информнаука», ЗАО «МК-Периодика»,
ОАО «АРЗИ»

Молдова:

индекс 01389 в каталоге ГП «Пошта Молдовей»

Германия:

индекс 01389 в каталоге Kubon&Sagner

Литва:

индекс 01389 в каталоге АО «Летувос паштас»

Латвия:

индекс 01389 в каталоге
ООО «Подписное агентство PKS»

Болгария:

индекс 01389 в каталоге агентства Фирма «INDEX».

Казахстан:

индекс 01389 в каталоге АО «Казпочта»

Электронная версия журнала доступна
на сайтах издательства **www.recipe.by**
и научной электронной библиотеки РФ
www.elibrary.ru

По вопросам приобретения журнала обращайтесь
в редакцию в г. Минске
и представительство издательства в г. Киеве.

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.
Цена свободная.

Подписано в печать: 11.12.2013 г.
Тираж 2000 экз.
Заказ №

Формат 70x100 1/16. Печать офсетная

Отпечатано в типографии
ООО «ТМ АРГО-ГРАФИКС»
г. Минск, ул. Мележа, 1, оф. 221
Тел.: (017) 262 71 91. Лиц. № 02330/110 от 03.04.09 г.

УДК 577.115.3:796.071

Осочук С.С., Марцинкевич А.Ф.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Osochuk S., Martsinkevich A.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Физико-химические свойства и состав мембран эритроцитов спортсменов различной квалификации

Physical and chemical properties and composition of erythrocyte membranes athletes of different skills

Резюме

В статье рассматриваются особенности физико-химических свойств и состава мембран эритроцитов спортсменов в зависимости от их спортивной квалификации. В выделенных мембранах эритроцитов с использованием пирена определяли микровязкость и микрополярность общего и аннулярного липидного пула. Фосфолипидный спектр мембран эритроцитов изучали при помощи тонкослойной хроматографии. Спектр жирных кислот фосфатидилхолина и сфингомиелина устанавливался посредством газовой хроматографии на капиллярной колонке. В результате исследований предложена кибернетическая модель дерева принятия решений, позволяющая с высокой точностью определить мастеров спорта (100%), кандидатов в мастера спорта (90,91%), спортсменов первого разряда (100%) и лиц, не занимающихся спортом (93,64%). Выявлена неоднородность физико-химических свойств и состава мембран эритроцитов спортсменов в зависимости от уровня спортивного мастерства, что позволило предположить наличие различий в механизмах их реализации.

Ключевые слова: мембрана эритроцита, фосфолипиды, жирные кислоты, спорт.

Resume

The article discusses the features of the physicochemical properties and composition of erythrocyte membranes in athletes based on their sport skills. In isolated erythrocyte membranes microviscosity and micropolarity of annular and overall lipid pool was determined by using pyrene. We used thin layer chromatography method to determine the spectrum of erythrocyte membrane phospholipids. Spectrum of such fatty acids as sphingomyelin and phosphatidylcholine was investigated by using gas chromatography on a capillary column. The studies proposed a cybernetic model of a decision tree which allows to accurately determine the masters of sports (100%), candidate masters (90.91%), first-class sportsman (100%), and persons who are not involved in sports (93.64%). Revealed heterogeneity of physicochemical properties and composition of erythrocyte membranes in

athletes depending on the level of sportsmanship gives the opportunity to suggest the existence of differences in the mechanisms of their implementation.

Key words: erythrocyte membrane, phospholipids, fatty acids, sport.

Перенос кислорода
через мембрану
эритроцита
осуществляется
при помощи
специфических
интегральных белков –
аквапоринов-1 [3].

■ ВВЕДЕНИЕ

Циклические виды спорта, требующие продолжительной мышечной работы, сопряжены с длительным стрессом, который обусловлен влиянием высокой температуры [1], кетоацидозом и интенсификацией свободнорадикального окисления, вызывающими адаптационные изменения состава клеточных мембран. С учетом чрезвычайной важности доставки кислорода к работающим мышцам интерес представляет исследование мембран эритроцитов [2]. С учетом того, что активность трансмембранных белков зависит в том числе от их липидного микроокружения [4], можно предположить наличие взаимосвязи эффективной доставки кислорода с составом мембраны эритроцитов. Возможно, состав и физико-химические свойства мембран эритроцитов будут коррелировать с уровнем спортивной квалификации (тренированности) спортсменов.

Несмотря на актуальность проблемы, сведения о составе и физико-химических свойствах мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта не нашли отражения в научной периодической печати.

■ ЦЕЛЬ

Выявление особенностей состава и физико-химических свойств мембран эритроцитов спортсменов разного уровня квалификации, а также идентификация спортсменов с разным уровнем квалификации с использованием совокупности всех изучаемых показателей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе эксперимента были сформированы опытная группа, состоящая из спортсменов циклических видов спорта с квалификацией от 1-го взрослого разряда до разряда «мастер спорта» (средний возраст – $18,6 \pm 3,0$ года, 42 человека), и контрольная группа (практически здоровые доноры, не занимающиеся регулярными физическими упражнениями, средний возраст которых – $19,2 \pm 1,7$ года, 38 человек).

Кровь для исследований забирали в одноразовые вакутайнеры с цитратом натрия из локтевой вены в утренние часы (с 8 до 9 ч) натощак.

Мембраны эритроцитов выделялись по методу Доджа [5]. Определение микровязкости мембран эритроцитов производилось при помощи метода флуоресцентных зондов [6]. Для этого стандартизованные мембраны инкубировались с пиреном в концентрациях 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкмоль/мл в течение 15 мин. После инкубации снимались спектры флуоресценции при длинах волн возбуждения $\lambda_{\text{в}} = 286$ (зона аннулярного липидного фонда) и 337 нм (зона общего липидного фонда) на спектрофлуориметре SOLAR CM2203. По соотношению высоты пиков флуоресценции при $\lambda_{\text{пер}} = 470\text{--}480$ нм и при $\lambda_{\text{пер}} = 374\text{--}376$ нм судили о микровязкости мембран эритроцитов. Фосфолипиды экстрагировали

смесью хлороформа и метанола 2:1 по методу Фолча [7]. Определение фосфолипидного профиля проводили при помощи двумерной тонкослойной хроматографии, количественный анализ фосфолипидных фракций осуществляли по методу Васьковского [8]. Содержание общих фосфолипидов устанавливали по Свенбергу и Свеннерхолму [9].

Определение спектра жирных кислот фосфатидилхолина (ФХ) и сфингомиелина (СФМ) проводили на газовом хроматографе Focus GC с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой BPX70, 60 м×0,25 мм (производство Thermo Fisher Scientific). Экстрагированные фосфолипиды разделялись при помощи тонкослойной хроматографии на пластинах Merck (TLC Silicagel 60, 20×20 см). ФХ и СФМ идентифицировались по Rf стандартных образцов фосфолипидов, соскабливались с пластин и метилировались при помощи 2М раствора натрия метоксида в метаноле (ISO 5509:2000). В качестве газа-носителя использовался гелий (скорость потока – 1,3 мл/мин). Термостат колонки имел следующий режим работы: нагрев от 120 °С до 245 °С при скорости 3 °С/мин, изотерма при 245 °С – 5 мин (полное время анализа составило 46,66 мин). Температура испарителя – 200 °С, детектора – 280 °С, объем вводимой пробы – 2 мкл. Идентификацию жирных кислот проводили по стандартам их метиловых эфиров (производство Sigma Aldrich), количество оценивали по площади пика.

Так как статистический анализ при помощи Н-критерия Краскела – Уоллиса для множественных сравнений не позволил выявить различия группы спортсменов по уровню мастерства, был применен кибернетический метод анализа – деревья принятия решений. Для построения классификационного дерева решений использовался пакет интеллектуального анализа данных RapidMiner v. 5.3.005 [10].

Обучение модели проводили при помощи ресемплинга на основе метода Монте-Карло, оптимизацию параметров модели – при помощи эволюционного алгоритма с гауссовскими мутациями и турнирным отбором потомков. Следующее поколение создавалось на основе четверти текущего с 90%-й вероятностью кроссовера. Размер популяции – 5 единиц, количество поколений – 50.

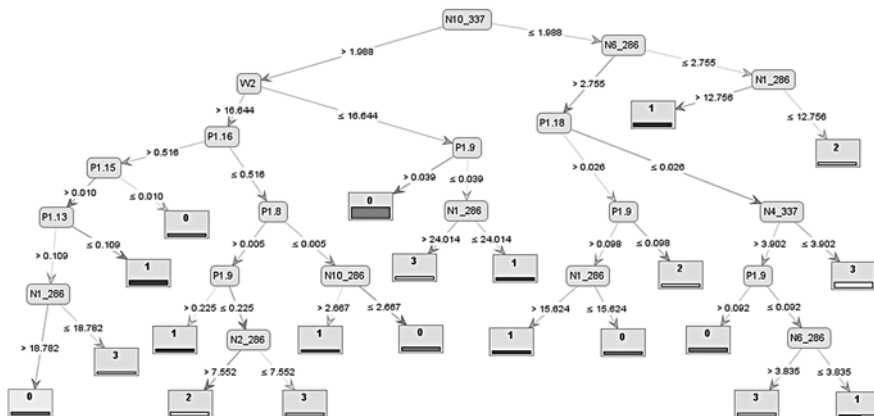
Дерево решений в качестве критерия расщепления использовало индекс Джини, минимальный размер для расщепления – 4, минимальный размер листа – 2. В ходе построения модели использовался метод «обрезки» с 3 альтернативами.

Контроль качества классификации осуществляли при помощи тестовой выборки, объем которой составлял 70% от исходной совокупности.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате примененного метода анализа выявлено (см. рисунок), что по исследуемым показателям 1-е разделение выборки происходит при исследовании микровязкости общего липидного пула с использованием пирена в концентрации 10 мкмоль/л. При численном значении микровязкости общего липида >1,988 последующий узел дифференцировки осуществлялся по массовой доле ФХ. Если численное значение микровязкости аннулярного липидного пула было ≤1,988 то последующая дифференцировка осуществлялась по микровязкости аннулярного липидного пула при концентрации пирена 6 мкмоль/л. Дальнейшая дифференцировка происходила согласно схеме, представленной на рисунке, по исследованным признакам.

Таким образом, исходя из приведенной схемы, для спортсменов с квалификацией 1-го разряда было характерно значение микровязкости общего липидного пула при концентрации пирена 10 мкмоль/л $\leq 1,988$; микровязкости аннулярного липидного пула при концентрации пирена 6 мкмоль/л $\leq 2,755$; микровязкости аннулярного липидного пула при концентрации пирена 1 мкмоль/л $> 12,756$. Кандидаты в мастера спорта дифференцировались от спортсменов 1-го разряда по значению микровязкости аннулярного липида при концентрации пирена 1 мкмоль/л с численным выражением $\leq 12,756$. Описанная дифференцировка была характерна для 29,1% спортсменов 1-го разряда и 12,4% кандидатов в мастера спорта. Для остальных спортсменов 1-го разряда и кандидатов в мастера спорта набор дифференцирующих показателей отличался от описанного (см. рисунок). Всего при дифференцировке спортсменов по исследованным показателям было выделено 7 групп спортсменов 1-го разряда, четко различающихся между собой и с другими группами. Данный факт свидетельствует о значительной вариабельности реакции мембран эритроцитов на физическую нагрузку, характерную для спортсменов 1-го разряда. Вероятно, в основе данной вариабельности могут лежать также различные механизмы, их реализующие. Для кандидатов в мастера спорта было выделено всего 3 группы, а для мастеров спорта – 5. Возможно, различное количество групп при различном уровне спортивного мастерства обусловлено изменением вариабельности реакции на физические нагрузки разной интенсивности. Следует отметить, что точность модели для спортсменов 1-го разряда и мастеров спорта составила 100%, для кандидатов в мастера спорта – 90,91%. В контрольной группе лиц, не занимающихся спортом, выявлено 6 вариантов сочетаний исследованных показателей.



Графическое отображение дерева решений

Примечания:

0 – контрольная группа;

1 – спортсмены 1-го разряда;

2 – кандидаты в мастера спорта;

3 – мастера спорта;

N1_286, ..., N10_286 – микровязкость аннулярного липидного слоя при концентрациях пирена;

1, ..., 10 мкМ N1_337, ..., N10_337 – микровязкость общего липидного слоя при концентрациях пирена;

1, ..., 10 мкМ P1.13 – C18:0, P1.15 – C18:2, P1.16 – C18:3, P1.18 – C20:4, P1.19 – C20:5, W2 – массовая доля ФХ.

Точность модели составила 93,64%, коэффициент ранговой корреляции Спирмена для модели – 0,904.

При анализе графического представления полученной модели, можно отметить, что для дифференцирования лиц контрольной группы в 69,58% случаев достаточно выявить повышенную микровязкость общего липидного фонда ($N_{10_337} > 1,988$), низкое количество ФХ ($W_2 \leq 16,64$) и высокое содержание остатка пальмитиновой кислоты в СФМ ($P_{1.9} > 0,039$). Основная же доля мастеров спорта, порядка 72,54%, напротив, имеет пониженную микровязкость в зоне общего липидного фонда ($N_{10_337} \leq 1,988$ и $N_{4_337} \leq 3,902$), высокую микровязкость в зоне белок-липидных взаимодействий ($N_{6_286} > 2,755$), низкое содержание арахидоновой кислоты в СФМ ($P_{1.18} < 0,026$).

Паттерн, полученный для лиц контрольной группы, вероятно, указывает на снижение латеральной диффузии в мембране эритроцита в целом, что подтверждается как высокой микровязкостью, так и преобладанием в составе СФМ насыщенной жирной кислоты – пальмитиновой. Вместе с тем повышение микровязкости аннулярного липидного слоя у мастеров спорта может говорить о селективном изменении прибрежкового липидного окружения, направленного на оптимизацию конформационных переходов при функционировании аквапоринов-1. Тем не менее расценивать выявленные отличия как положительные преждевременно, так как не исключено, что изменения мембраны обусловлены ее деструкцией вследствие окислительной модификации [11].

Проведенное исследование позволяет не только констатировать влияние занятий спортом на мембрану эритроцита, но и выделить паттерны, характерные для различных степеней спортивного мастерства.

■ ВЫВОДЫ

1. Регулярные физические нагрузки изменяют состав и физико-химические свойства мембран эритроцитов, четко дифференцируя его в зависимости от уровня квалификации спортсмена.
2. Для 72,54% мастеров спорта характерна пониженная по сравнению с остальными группами микровязкость общего липидного фонда и, вероятно, за счет сниженного содержания арахидоновой кислоты в сфиломиелине, более высокая микровязкость липидного фонда прибрежковой (аннулярной) области. Для спортсменов 1-го разряда и кандидатов в мастера спорта использованный метод кибернетической обработки не позволил выделить характерные дифференцирующие признаки, обеспечив дифференцировку только с использованием совокупности всех показателей.
3. Построенная модель дерева принятия решений позволяет в 100% случаев идентифицировать спортсменов 1-го разряда и мастеров спорта, в 90,91% случаев – кандидатов в мастера спорта и в 93,64% случаев – лиц, не занимающихся спортом.
4. Набор дифференцирующих показателей неоднороден, что может свидетельствовать об отличиях в реализации выявленных особенностей физико-химических свойств мембран эритроцитов.

Необходимо учитывать, что полученные закономерности могут значительно варьировать в зависимости от времени года, структуры питания и тренировочного графика, что ни в коей мере не исключает факт влияния уровня спортивного мастерства на мембрану эритроцитов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Puneet, S. Exertional heat stroke in a marathon runner with extensive healed deep burns: a case report / S. Puneet, J. Poh // *International Journal of Emergency Medicine*, 2011. – P. 1.
2. Erythrocyte membrane microviscosity and phospholipid composition in lead workers / [L.R. Cook et al.] // *Br J Ind Med*. – 1987. – № 44. – P. 841–844.
3. Титовец, Э.П. Исследование механизмов кислородного обмена эритроцитов человека / Э.П. Титовец, Л. П. Пархач, Т.С. Степанова [и др.] // *Биофизика*. – Т. 10. – 2009. – С. 425–441.
4. Lee, A.G. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective / A.G. Lee // *Biochimica et Biophysica Acta / Biomembranes* – V. 1612. – 2003. – P. 1–40.
5. Dodge, J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of erythrocytes / J. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1963. – Vol. 100. – №1. – P. 119–130.
6. Добрецов, Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
7. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, S.G. Sloane // *J Biol. Chem.* – 1957. – № 226. – P. 497–509.
8. Vaskovsky, V.E. Modified Jungnickel reagent for detecting phospholipid and phosphorus compounds on TLC chromatograms / V.E. Vaskovsky, N.A. Latyshev // *J. Chromatogr.* – 1975. – V. 115. – P. 246–249.
9. Svannborg, A. Plasma total lipid cholesterol, triglycerides, phospholipids and in a healthy scan-dinavian population / A. Svannborg, L. Svennerholm // *Acta Med. Scand.* – 1961 – Vol. 169 – P. 43–46.
10. RapidMiner, Product Overview [Electronic resource] / Rapid-I. – Mode of access: <http://rapid-i.com/content/view/186/196>. – Date of access: 20.09.2013.
11. Гидулянова, К.В. Жирнокислотный состав плазмы и мембран эритроцитов больных хроническим гломерулонефритом / К.В. Гидулянова, С.В. Коношенко // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. – Т. 19. – № 4. – С. 56–62.

Поступила в редакцию 18.09.2013

Контакты:

e-mail: argentum32@gmail.com

Марцинкевич Александр Францевич – аспирант кафедры общей и клинической биохимии Витебского государственного университета