

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ СПОРТСМЕНОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА

В ходе исследования флуориметрическим методом установлено статистически значимое увеличение продуктов окислительной модификации белка в мембранах эритроцитов спортсменов циклических видов спорта. Микрополярность при-белкового (аннулярного) и общего липидного пулов в группе спортсменов также была статистически выше. Факторный анализ показателей перекисной модификации белков по методу главных компонент показал разделение обследованных людей на группы в зависимости от уровня спортивного мастерства – с максимальными значениями у мастеров спорта и минимальными у лиц, не занимающихся спортом. У спортсменов выявлена более высокая интенсивность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови, статистически значимо коррелирующая с микрополярностью аннулярного и общего липидного пулов.

**Ключевые слова:** мембрана эритроцита; перекисное окисление липидов; окислительная модификация белков; спорт.

The study found a statistically significant increase of oxidative modification of the protein in erythrocyte membranes cyclic sports athletes. Annular and total lipid pools micropolarity was statistically higher in the group of athletes. Factor analysis using principal component analysis showed a significant separation of athletes according to the level of sportsmanship and the comparison group. Also in athletes was found higher intensity of oxygen release from venous blood erythrocytes, which was significantly correlated with micropolarity of annular and total lipid pools.

**Key words:** erythrocyte membrane; lipid peroxidation; oxidative proteins modification; sport.

Спортсмены циклических видов спорта подвергаются регулярным продолжительным физическим нагрузкам, обуславливающим стресс организма. Во время выполнения забегов на длинные и сверхдлинные дистанции температура тела может подниматься до 40 °С, что вместе с интенсификацией обмена кислорода индуцирует перекисное окисление липидов (ПОЛ) и окислительную модификацию белков (ОМБ) [1], в том числе и ключевых, в транспорте кислорода клеток – эритроцитов. Учитывая способность ПОЛ и ОМБ ухудшать работу трансмембранных белков-ферментов [2], можно предположить аналогичное воздействие и на основные белки трансмембранного переноса кислорода – аквапорины, а также на анионные транспортеры, непосредственно участвующие в реализации эффекта Бора.

Однако регулярные тренировки являются неотъемлемой частью профессиональной деятельности спортсменов и, следуя вышеуказанной логике, должны приводить к снижению активности трансмембранного переноса кислорода, что не согласуется с фактическим увеличением выносливости. Более того, ряд исследований показал неэффективность использования антиоксидантов у спортсменов циклических видов спорта [3, 4] или даже снижение выносливости после их длительного приема [5]. Вероятно, описанные противоречия могут быть объяснены способностью окислительной модификации мембран и белков эритроцитов спортсменов увеличивать активность трансмембранного переноса кислорода при умеренном изменении их конформации, но в научной литературе отсутствует информация о такой способности ПОЛ и ОМБ мембран эритроцитов.

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования стало определение активности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови, степени окислительной модификации липидов и белков мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта в сравнении с лицами, не занимающимися спортом, а также математическое обоснование их взаимосвязи и математическое моделирование трехмерной структуры некоторых белков с учетом возможной окислительной модификации их аминокислот.

### Методы исследования

Для достижения поставленной цели была сформирована опытная группа, состоящая из спортсменов обоего пола со спортивной квалификацией 1-го взрослого разряда, кандидата в мастера спорта (КМС) и мастера спорта (МС) в возрасте  $18,2 \pm 1,1$  года. Контрольную группу составляли здоровые молодые люди обоего пола, не занимающиеся регулярными физическими упражнениями (возраст –  $19,0 \pm 2,1$  года).

Венозную кровь забирали в утренние часы, натощак, из локтевой вены в вакуутайнеры с цитратом натрия. Эритроциты отмывали в буферном (150 мМ NaCl + 5 мМ фосфат  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , pH 8) растворе.

Интенсивность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови определяли при помощи электрода Кларка на аппаратном комплексе Record 4 (Россия). В предварительно пробарботированную азотом

среду (2 мл 20 мМ фосфатного буферного раствора, pH 7,4) помещали 100 мкл эритроцитарной взвеси, предварительно стандартизованной до оптической плотности 0,5 ед.  $\pm$  5 % при длине волны 540 нм, и регистрировали увеличение концентрации кислорода в ячейке в течение 300 с. На основании полученных данных строили линейную регрессионную модель, коэффициент наклона прямой в которой принимали за интенсивность отдачи кислорода эритроцитами. Для устранения вклада растворенного атмосферного кислорода проводили «холостой» опыт (без добавления эритроцитарной взвеси), значения которого вычитали из опытных данных.

Выделение мембран эритроцитов проводили по методу Доджа [6]. Очищенные мембраны стандартизовали по белку до конечной концентрации 100 мг/мл и на спектрофлуориметре Солар СМ 2203 (Беларусь) оценивали окислительную модификацию белков по активности флуоресценции их продуктов свободнорадикальной модификации (битирозины, тритофанилы и конъюгаты лизина с продуктами ПОЛ) [7]. Активность флуоресценции битирозинов определяли при длине волны  $\lambda$ , равной 325 нм возбуждения, и регистрации 415 нм, тритофанилов – при  $\lambda$  = 295 нм возбуждения и регистрации 325 нм, конъюгатов лизина – при  $\lambda$  = 365 нм возбуждения и регистрации 440 нм [8–10].

Об окислительной модификации билипидного слоя мембран эритроцитов судили по его микрополярности после титрования пиреном [8], рассчитанной как отношение испускания первого вибронного пика к третьему пику мономеров пирена [11].

Нормальность распределения данных устанавливали при помощи теста Шапиро – Уилка. Для выявления гендерных отличий использован критерий  $\chi^2$ , и в связи с отсутствием таковых обследуемые объединены в одну группу вне зависимости от половой принадлежности. Сравнение выборок выполняли, применяя критерий Вилкоксона, множественное сравнение осуществляли на основании  $H$ -критерия Краскела – Уоллиса. Наличие корреляционной зависимости определяли в тесте Спирмена. Статистически значимыми считали результаты при  $p < 0,05$ .

Статистический анализ данных проводился с помощью пакета RV3.0.2. Моделирование трехмерной структуры белков с учетом возможной окислительной модификации осуществлялось с использованием интегрированного в Vega ZZ алгоритма AMMP [12].

### Результаты исследования и их обсуждение

При изучении активности отдачи кислорода эритроцитами выявлено, что в группе спортсменов тангенс угла наклона кривой насыщения кислородом ячейки был достоверно больше ( $0,01 \pm 0,003$  2,  $p < 0,001$ ), чем в группе лиц, не занимающихся спортом ( $0,0073 \pm 0,0023$ ), что свидетельствует о более высокой активности трансмембранного переноса кислорода у спортсменов (рис. 1).

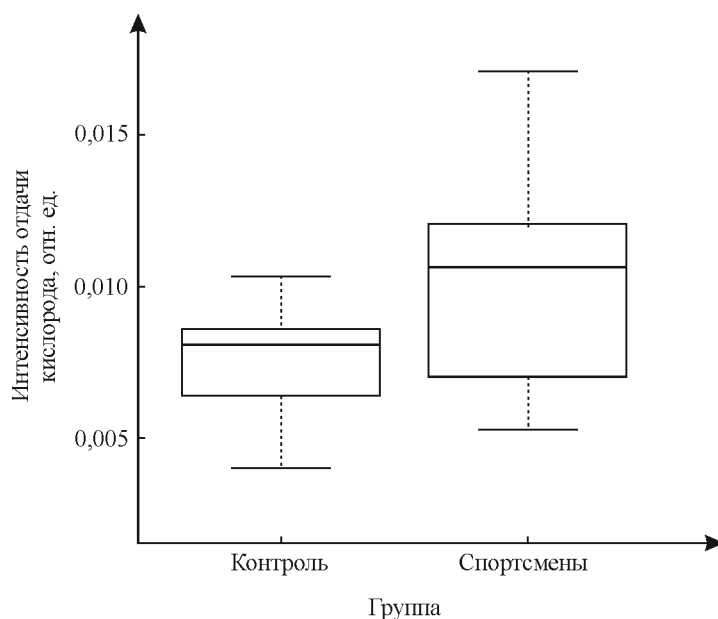


Рис. 1. Интенсивность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови спортсменов и лиц, не занимающихся спортом

Исследование интенсивности испускания триптофанилов показало, что у спортсменов этот показатель статистически значимо ниже, чем у лиц контрольной группы, что говорит о более высокой активности окислительной модификации белков мембран эритроцитов спортсменов [8]. Окислительная модификация белковых молекул подтверждается достоверно более высокой флуоресценцией битиризинов и конъюгатов лизина (Лиз-ПОЛ) в группе спортсменов (табл. 1).

Таблица 1

**Интенсивность испускания триптофанилов, битиризинов и Лиз-ПОЛ, отн. ед.**

Наименование показателя	Спортсмены	Контроль	<i>p</i>
Триптофанилы	0,41 ± 0,23	0,58 ± 0,24	0,028 3
Битиризины	0,081 ± 0,021	0,068 ± 0,020	0,044 1
Лиз-ПОЛ	8,43 ± 5,20	5,05 ± 3,52	0,010 3

Примечание. Отн. ед. – интенсивность испускания, выраженная в относительных единицах (в соответствии с программным обеспечением спектрофлуориметра Солар СМ 2203); *p* – уровень значимости.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о достоверно более высокой окислительной модификации белков мембран эритроцитов у спортсменов. Учитывая, что окислительная модификация белков способна изменить их конформацию [13] и негативно влиять на активность трансмембранных белков [2], можно предположить наличие отрицательной корреляционной зависимости между активностью отдачи кислорода эритроцитами и окислительной модификацией белков и липидного бислоя. Однако корреляционный анализ не выявил взаимосвязи между интенсивностью флуоресценции триптофанилов, битиризина и Лиз-ПОЛ и интенсивностью отдачи кислорода. Вероятно, это может быть связано с достаточно низким содержанием (порядка 5 % по массе) триптофана, тирозина и лизина в молекуле аквапорины-1, а также локализацией названных аминокислотных остатков преимущественно в трансмембранном регионе [14], что способно затруднить окислительную модификацию аквапоринов и не допустить снижения их активности. Вместе с тем выявленное увеличение активности массопереноса кислорода у спортсменов противоречит предположению о негативном действии окислительной модификации белков на этот процесс. Возможно, окислительная модификация иных белков мембран эритроцитов способна привести к изменению их активности и вторично стимулировать массоперенос кислорода.

Исходя из анализа первичной структуры белков мембран эритроцитов, можно заключить, что среди белков, связанных с механизмами транспорта кислорода, одними из наиболее предрасположенных к окислительной модификации могут быть участвующие в реализации эффекта Бора анионные транспортеры [15]. Возможность такого механизма подтверждается математической моделью, полученной с помощью анализа цитоплазматического домена белка полосы 3 (SLC4A1, модель 1BH7 [16]), модифицированного одним из возможных продуктов перекисного окисления липидов – альдегидом муравьиной кислоты. При построении модели боковые цепи остатков лизина искусственно формировались и стабилизировались впоследствии при помощи поиска конформации с минимальной энергией.

В ходе анализа установлено, что окислительная модификация остатков лизина в значительной степени изменяет конформацию цитоплазматического домена SLC4A1 и относительное расположение аминокислот, отвечающих за транспорт анионов.

Компьютерный анализ пространственных параметров нативного и модифицированного цитозольного домена SLC4A1 с использованием программы Vega ZZ [12] показал, что согласно полученной модели ОМБ приводит к уменьшению площади и объема поры канала.

Вероятно, сужение канала позволяет белку полосы 3 проявить более высокую селективность в отношении гидрокарбонат-ионов, обеспечивая отсев ионов с большими размерами.

Анализ окислительной модификации липидного бислоя показал, что у спортсменов микрополярность как в зоне аннулярного (прибелкового), так и общего липидного пула статистически значима выше, чем у лиц, не занимающихся спортом (табл. 2).

Полученный результат подтвердил опубликованные нами ранее данные [17] и свидетельствует о более высокой окислительной модификации билипидного слоя мембран эритроцитов спортсменов.

Корреляционный анализ показал наличие прямой зависимости между интенсивностью отдачи кислорода эритроцитами венозной крови и микрополярностью (ПОЛ) их мембран у спортсменов (табл. 3).

Учитывая способность окислительной модификации липидов мембран модифицировать конформацию белков, можно предположить, что выявленная зависимость обусловлена конформационными изменениями аквапоринов.

Таблица 2

**Микрополярность мембран эритроцитов у спортсменов и лиц, не занимающихся спортом**

Наименование показателя	МПА1	МПА2	МПА4	МПО1	МПО2	МПО4
Спортсмены	2,25 ± 1,27	3,96 ± 2,26	5,21 ± 4,12	4,62 ± 2,43	8,92 ± 6,53	6,43 ± 4,31
Контроль	1,54 ± 0,48	2,79 ± 1,78	3,39 ± 2,21	3,28 ± 1,64	5,0 ± 3,17	3,87 ± 2,29
<i>p</i> -Значение	0,036 7	0,038 7	0,043	0,038 7	0,026 5	0,011 6

Примечание. МПА1, ..., МПА4 – микрополярность аннулярного липидного слоя мембран эритроцитов; МПО1, ..., МПО4 – микрополярность общего липидного слоя мембран эритроцитов, где 1, ..., 4 – концентрация пирена, мкМ/мл.

Таблица 3

**Корреляционный анализ между микрополярностью аннулярного и общего липидного пула и интенсивностью отдачи кислорода эритроцитами венозной крови (rho Спирмена)**

Наименование показателя	МПА1	МПА2	МПА4	МПО1	МПО2	МПО4
Спортсмены	0,352	0,350	0,394	0,340	0,400	0,385
<i>p</i> -Значение	0,036	0,037	0,018	0,043 2	0,015 7	0,021
Контроль	0,568	0,561	0,571	0,568	0,543	0,568
<i>p</i> -Значение	0,029 8	0,032 3	0,028 6	0,029 8	0,039 1	0,029 8

Полученные данные позволяют сделать заключение о возможном позитивном влиянии окислительной модификации белков мембран эритроцитов и липидного бислоя на активность отдачи кислорода эритроцитами у спортсменов циклических видов спорта.

Однофакторный дисперсионный анализ показал гетерогенность группы спортсменов по уровню окислительной модификации белков мембран эритроцитов в зависимости от их квалификации. По всем перечисленным показателям интенсивность перекисного окисления возрастала по мере увеличения спортивной квалификации.

Анализ главных компонент продемонстрировал разделение всей совокупности обследованных на 4 достаточно четко очерченных кластера (рис. 2).

Пересечение некоторых кластеров может быть объяснено различной физической подготовкой спортсменов в момент обследования. Вместе с тем следует отметить однозначное различие между группой лиц, не занимающихся спортом, и кандидатами в мастера, а также мастерами спорта.

На основании полученных данных можно констатировать высокую окислительную модификацию белков мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта, возрастающую по мере увеличения спортивного мастерства, которая линейно не связана с транспортом кислорода и, возможно, реализует позитивный эффект через анионные транспортеры. Микрополярность липидного бислоя мембран эритроцитов спортсменов, косвенно показывающая гидрофильность жирнокислотных остатков, достоверно прямо коррелирует с интенсивностью отдачи кислорода эритроцитами, что может быть обусловлено опосредованным влиянием модифицированной ПОЛ мембраны на конформацию аквапоринов и, как следствие, на их функциональное состояние.

Таким образом, у спортсменов циклических видов спорта активность отдачи кислорода эритроцитами, окислительная модификация белков и липидов их мембран выше, чем у лиц, не занимающихся спортом.

Окислительная модификация белков мембран эритроцитов увеличивается по мере роста спортивного мастерства.

Математическая модель влияния окислительной модификации анионных транспортеров подтверждает возможность изменения их конформации и увеличения селективности в отношении гидрокарбонат-иона.

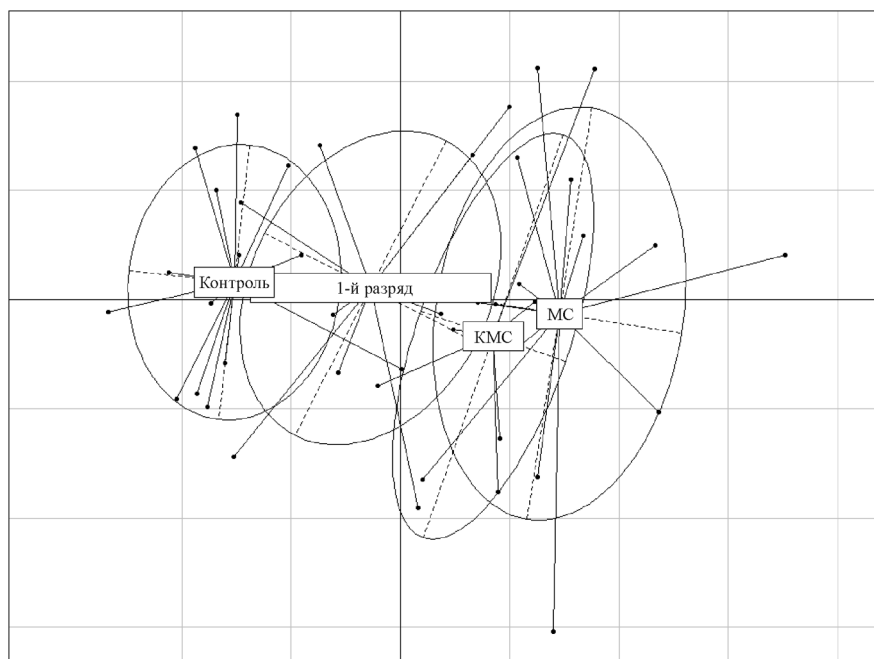


Рис. 2. Анализ показателей окислительной модификации белков мембран эритроцитов методом главных компонент

Микрополярность аннулярного и общего пулов липидного бислоя эритроцитов спортсменов прямо коррелирует с активностью отдачи кислорода эритроцитами.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Time-course changes of oxidative stress response to high-intensity discontinuous training versus moderate-intensity continuous training in masters runners / A. Vezzoli [et al.] // Public Library of Science. 2014. Vol. 9. P. 1–9.
2. Packer L. Oxygen Radicals in Biological Systems. London, 1994. P. 273.
3. Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial / G. Paulsen [et al.] // J. Physiol. 2014. № 592.8. P. 1887–1901.
4. Braakhuis A. J., Hopkins W. G., Lowe T. E. Effects of dietary antioxidants on training and performance in female runners // Eur. J. Sport Sci. 2014. № 2. P. 160–168.
5. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance / M. C. Gomez-Cabrera [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. 2008. № 87. P. 142–149.
6. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. 1963. Vol. 100, № 1. P. 119–130.
7. Тиньков А. А., Розачева М. Н., Никоноров А. А. Пероксидное повреждение белков и липидов сыворотки крови, индуцированное солями железа и меди питьевой воды // Вестн. ОГА. 2012. № 6. С. 191–194.
8. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М., 1989.
9. Giulivi C., Davies K. J. Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis // Methods Enzymol. 1994. Vol. 233. P. 363–371.
10. Fluorescence analysis of lipoprotein peroxidation / N. Dousset [et al.] // Methods Enzymol. 1994. Vol. 233. P. 459–469.
11. Влияние плеторического введения перфторана на параметры структурно-функционального состояния мембран эритроцитов / Н. Б. Кармен [и др.] // Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии : сб. материалов XII Междунар. конф. (Пушино, 25–26 июня 2002 г.). Пушино, 2003. С. 122–126.
12. Drug Design Laboratory [Electronic resource]. URL: <http://www.ddl.unimi.it/vegazz> (date of access: 23.06.2014).
13. Ohyashiki T., Ohtsuka T., Mohri T. Increase of the molecular rigidity of the protein conformation in the intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation // Biochim. Biophys. Acta. 1988. Vol. 2. P. 383–392.
14. A refined structure of human aquaporin 1 // RCSB Protein Data Bank [Electronic resource]. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1H61> (date of access: 25.04.2014).
15. Harper's Illustrated Biochemistry / R. K. Murray [et al.]. New York, 2009.
16. A low energy structure for the final cytoplasmic loop of band 3, NMR, minimized average structure // RCSB Protein Data Bank [Electronic resource]. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1BH7> (date of access: 25.04.2014).
17. Осочук С. С., Марцинкевич А. Ф. Физико-химические свойства мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта // Вестн. Витеб. гос. мед. ун-та : ежеквартальный науч.-практ. журн. 2013. Т. 12, № 3. С. 25–31.

Поступила в редакцию 07.10.2014.

**Сергей Стефанович Осочук** – доктор медицинских наук, доцент, заведующий научно-исследовательской лабораторией УО «Витебский государственный медицинский университет».

**Александр Францевич Марцинкевич** – аспирант кафедры общей и клинической биохимии УО «Витебский государственный медицинский университет». Научный руководитель – С. С. Осочук.