

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ СПОРТСМЕНОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА

ОСОЧУК С.С.\*, МАРЦИНКЕВИЧ А.Ф.\*\*

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,  
Научно-исследовательская лаборатория,\*  
кафедра общей и клинической биохимии\*\*

**Резюме.** В работе были исследованы физико-химические свойства мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта и лиц, не занимающихся регулярными физическими нагрузками. Установлено, что у спортсменов микровязкость мембран эритроцитов статистически значимо ( $p < 0,05$ ) ниже, а микрополярность и расстояние между поверхностью мембраны эритроцита и донорами энергии выше, чем у лиц, не занимающихся спортом. Полученные результаты указывают на существенное влияние физической нагрузки на физико-химические свойства мембран эритроцитов.

**Ключевые слова:** физико-химические свойства, мембрана эритроцита, микрополярность, микровязкость, пирен.

**Abstract.** Physicochemical properties of erythrocytes membranes in sportsmen engaged in cyclic kinds of sport and those in persons who do not go in for sports have been studied in this paper. Statistically significant ( $p < 0,05$ ) reduction of microviscosity of erythrocytes membranes, increase of micropolarity and distance between the surface of erythrocyte membrane and energy donors were observed in sportsmen. The results obtained indicate a significant influence of physical activity on physicochemical properties of erythrocytes membranes.

**Key words:** physicochemical properties, erythrocyte membrane, micropolarity, microviscosity, pyrene.

Одним из наиболее важных факторов, лимитирующих работоспособность, является доставка кислорода к работающим мышцам. По этой причине эритроцит представляет собой объект тщательного изучения исследователей при разработке технологий увеличения выносливости спортсменов и лиц военизированных подразделений. К настоящему времени разработаны технологии увеличения количества эритроцитов и содержания гемоглобина. Некоторые из этих методов

запрещены ВАДА (Всемирная антидопинговая ассоциация) к использованию. Вместе с тем разработка новых способов оптимизации транспорта кислорода является актуальной и необходимой. В связи с этим следует обратить пристальное внимание на мембрану эритроцита как на один из факторов, оказывающих существенное влияние на транспорт кислорода.

Известно, что физическая нагрузка сопровождается значительной гипертермией и тканевой гипоксией [1, 2], что способно привести к изменениям состава и физико-химических свойств мембран эритроцитов у спортсменов и, как следствие, к изменению ее функциональной активности. В свою очередь, скорость трансмембранного переноса кислорода

**Адрес для корреспонденции:** 210023, г.Витебск, пр-т Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Научно-исследовательская лаборатория. Раб.тел.: 8 (0212) 36-59-38 – Осочук Сергей Стефанович.

определяется белками-переносчиками аквапоринами [3], а функциональная активность мембранных белков контролируется составом и микровязкостью приобелкового (аннулярного) липидного пула мембраны, через их конформационные изменения и пространственную ориентацию [4]. Аннулярный липидный пул постоянно обменивается с общим липидным пулом мембраны [5]. Поскольку в эритроците отсутствует синтез белков и липидов, восстановление мембраны обеспечивается липидтранспортной системой (ЛТС) [6], что позволяет рассматривать мембрану и ЛТС как единый взаимосвязанный механизм. Учитывая такую особенность, становится теоретически возможным оказание влияния на состав и физико-химические свойства мембран эритроцитов посредством изменения пищевого режима и фармакологической коррекции состояния ЛТС. Косвенным подтверждением данного предположения могут служить факты влияния патологических состояний на физико-химические свойства и состав мембран эритроцитов [7, 8].

В связи с вышеизложенным, целью работы было исследование физико-химических свойств мембран эритроцитов у спортсменов циклических видов спорта.

### Методы

Для определения микровязкости мембран эритроцитов использовался метод флуоресцентных зондов, основанный на измерении интенсивности испускания энергии. В качестве зонда использовался пирен, плоская молекула которого способна избирательно проникать в гидрофобные полости мембраны: либо в виде мономера, либо в форме возбужденного димера (эксимера). Исследуя отношение интенсивности испускания эксимеров пирена к мономерам (т. н. коэффициент эксимеризации, КЭ), можно сделать вывод о вязкостных свойствах мембраны: при увеличении микровязкости КЭ будет снижаться вследствие стерических факторов, препятствующих встраиванию эксимеров;

возрастание микровязкости будет сопровождаться ростом КЭ.

Известно [9, 10], что пирен имеет высокую чувствительность к полярности микроокружения, что проявляется в изменении структуры спектра флуоресценции в области первого и третьего пика испускания мономеров. Таким образом, для характеристики полярности микроокружения использовалось отношение интенсивности пиков мономеров пирена при 374 и 394 нм.

При длине возбуждения 286 нм пирен способен поглощать энергию в ходе безызлучательного переноса от триптофановых остатков белка, что применимо для оценки микровязкости приобелкового липидного окружения. При 337 нм возбуждаются непосредственно сами молекулы пирена, что позволяет отслеживать изменения в общей микровязкости мембраны.

На основании анализа уравнения Штерна-Фольмера возможна оценка эффективности переноса энергии с белковых триптофанилов на пирен и доступности их тушению [11], что может быть использовано как перспективный диагностический критерий конформационных состояний белковой молекулы. Помимо указанного, стерические модификации могут выражаться и в изменении среднего расстояния между триптофанилами и бислоем фосфолипидов, что также может быть оценено при помощи метода флуоресцентных зондов.

Для исследования была набрана контрольная группа из 38 человек в возрасте  $19,2 \pm 1,7$  лет, не занимающихся регулярными физическими упражнениями. Опытная группа состояла из 42 спортсменов легкоатлетического многоборья с уровнем спортивного мастерства от 1-го взрослого разряда до мастера спорта в возрасте  $18,6 \pm 3,0$  лет. Группы были однородны по возрасту (р-значение теста Вилкоксона 0,479).

Забор крови проводился натощак в вакуумные пробирки с цитратом натрия, с последующим центрифугированием при 1000 об/мин и отбором плазмы. Мембраны эритроцитов выделялись по методу Доджа [12] и стандартизовались по белку

до концентрации 100 мкг/мл. Стандартизованные мембраны объемом 2 мл титровались пиреном в концентрации 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкмоль/л с последующим снятием спектра флуоресценции при 286 и 337 нм. Интенсивность испускания мономеров и эксимеров пирена определялась в максимумах при 374, 394 и 470 нм.

Обработка данных производилась при помощи статистического пакета R v.2.15.2 [13]. Для оценки закона распределения использовался тест Шапиро-Уилка, на основании которого ( $p < 0,05$ ) было принято заключение о законе распределения исследуемых величин, отличном от нормального. Для парного сравнения использовался тест Вилкоксона, для множественного сравнения – дисперсионный анализ Крускала-Уоллиса.

### Результаты и обсуждение

Для выявления гендерных отличий было проведено сравнение исследуемых показателей у мужчин и женщин отдельно для спортсменов и лиц, не занимающихся спортом. При помощи теста Вилкоксона достоверных отличий изучаемых показателей между мужчинами и женщинами контрольной группы выявлено не было. Вместе с тем, согласно непараметрическому Н-критерию Крускала-Уоллиса ( $p > 0,05$ ) было принято решение о гомогенности исследуемых признаков относительно пола и уровня спортивного мастерства, на основании чего выборка спортсменов считалась извлеченной из одной генераль-

ной совокупности и в дальнейшем исследовалась без разбиения.

В ходе исследования было установлено, что микровязкость аннулярного липида статистически значимо была меньше у спортсменов, причем данная тенденция сохранялась при всех концентрациях пирена (табл. 1).

Микровязкость общего липидного пула у спортсменов также была снижена по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Известно, что снижению микровязкости могут способствовать полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) [14].

В связи с этим можно предположить, что количество ПНЖК у спортсменов будет выше, чем у лиц, не занимающихся спортом. В свою очередь, учитывая высокую предрасположенность ПНЖК к перекисному окислению липидов (ПОЛ), можно также предположить возможность более высокой активности перекисной модификации мембран у спортсменов по сравнению с лицами, не занимающимися спортом. Известно, что увеличение микровязкости мембранных липидов ассоциировано с ухудшением функциональной активности мембран и, в частности, с ухудшением проницаемости мембраны для электролитов и кислорода [15], влекущим за собой тканевую гипоксию и связанную с ней активацию перекисного окисления липидов [16]. Учитывая этот факт можно предположить, что у спортсменов активность переноса кислорода через мембрану эритроцитов выше, чем у лиц, не занимающихся спортом и как следствие более активного использования кислорода и возможные отличия в

Таблица 1

### Микровязкость аннулярного липидного слоя

	МВА 1, мкмоль	МВА 2, мкмоль	МВА 4, мкмоль	МВА 6, мкмоль	МВА 8, мкмоль	МВА 10, мкмоль
Спортсмены	21,49±8,02	11,45±4,50	5,84±2,25	3,96±1,43	2,92±1,05	2,38±0,77
Контроль	24,64±7,35	13,30±3,78	7,12±2,95	4,64±1,57	3,48±1,18	2,74±0,89
p	0,01565	0,002155	0,001374	0,01029	0,005856	0,0239

Примечания: МВА 1 ... 10 - микровязкость аннулярного пула при различных концентрациях пирена.

Таблица 2

**Микровязкость общего липидного фонда**

	МВО 1, мкмоль	МВО 2, мкмоль	МВО 4, мкмоль	МВО 6, мкмоль	МВО 8, мкмоль	МВО 10, мкмоль
Спортсмены	12,64±3,64	7,45±2,40	4,25±1,32	3,01±0,91	2,43±0,68	2,06±0,51
Контроль	14,39±3,71	8,53±2,15	5,02±1,69	3,51±1,04	2,77±0,69	2,42±0,49
p	0,01744	0,003212	0,005507	0,00354	0,00354	0,0004184

Примечания: МВО 1 ... 10 - микровязкость общего липидного пула при различных концентрациях пирена.

Таблица 3

**Микрополярность аннулярного и общего липидных пулов**

	МПА 1, мкмоль	МПА 2, мкмоль	МПА 4, мкмоль	МПА 6, мкмоль	МПА 8, мкмоль	МПА 10, мкмоль
Спортсмены	0,05807 ± 0,01630	0,1022 ± 0,0303	0,1984 ± 0,0633	0,2828 ± 0,0928	0,3822 ± 0,1158	0,4503 ± 0,1234
Контроль	0,04955 ± 0,01266	0,08560 ± 0,01938	0,1598 ± 0,04100	0,2365 ± 0,06301	0,3161 ± 0,08730	0,3900 ± 0,1070
p	0,01565	0,007024	0,00188	0,0122	0,006416	0,02452
	МПО 1, мкмоль	МПО 2, мкмоль	МПО 4, мкмоль	МПО 6, мкмоль	МПО 8, мкмоль	МПО 10, мкмоль
Спортсмены	0,07789 ± 0,02190	0,1346 ± 0,04016	0,2360 ± 0,07300	0,3326 ± 0,1012	0,4049 ± 0,1133	0,4727 ± 0,1227
Контроль	0,06651 ± 0,01653	0,1109 ± 0,02482	0,1917 ± 0,04769	0,2706 ± 0,06332	0,3362 ± 0,07522	0,3793 ± 0,08058
p	0,01029	0,002466	0,003212	0,003108	0,005176	0,0004701

Примечания: МПА 1 ... 10, МПО 1 ... 10 - микрополярность аннулярного и общего липидного пула при различных концентрациях пирена.

количестве ПНЖК, более высокую активность перекисной модификации мембраны.

Сравнение микрополярности аннулярного и общего (табл. 3) липидных пулов спортсменов и лиц, не занимающихся спортом, косвенно подтверждает высказанную гипотезу о более высокой активности перекисной модификации мембран эритроцитов у спортсменов. Было выявлено, что при всех концентрациях пирена микрополярность аннулярного липидного пула у спортсменов выше, чем у лиц, не занимающихся спортом.

Поскольку одним из инициаторов роста микрополярности является ПОЛ, спо-

собное вводить в молекулы липидов высокополярные группы – гидроперекисные, гидроксильные и карбонильные [17], полученные отличия могут быть обусловлены именно этим процессом. Однако избыточная активация ПОЛ способна привести к существенным изменениям метаболизма, не согласующимся с высокой работоспособностью спортсменов.

На основании этого можно предположить, что высокая микрополярность эритроцитарной мембраны обусловлена не только высокой активностью ПОЛ, но и рядом иных не выявленных в настоящей работе факторов.

Исследование доступности триптофанилов тушению выявило, что у спортсменов этот показатель был ниже, чем у лиц, не занимающихся спортом, что указывает на конформационные изменения белковой молекулы, препятствующие свободному переносу энергии с ароматического кольца триптофанилов на пирен (табл. 4).

Также выявленный факт может быть объяснен возможным возникновением стерического барьера в непосредственной близости от белка, обусловленного ПОЛ. Так или иначе, экранирование триптофаниловых остатков указывает на увеличение стабильности белковой глобулы за счет внутрибелковых гидрофобных взаимодействий [18].

Анализируя графическое представление уравнения Штерна-Фольмера (рис.

1), можно получить сведения о количестве доноров энергии, доступных для тушения и о среднем расстоянии между донором и акцептором.

Анализ полученных данных свидетельствует о неизменности доли доноров первого рода ( $p=0,8368$ ), что, при первом приближении, может быть трактовано в пользу высказанной ранее версии о перекисной модификации мембраны или наличии неизвестных факторов, препятствующих переносу энергии. В таком контексте снижение доступности белка тушению не может быть обусловлено только конформационными изменениями.

Расстояние  $\theta$  между поверхностью бислоя и донорами первого рода было достоверно выше в контрольной группе

Таблица 4

**Тушение флуоресценции триптофанилов пиреном**

	$F_0/(F_0-F)$ 1, мкмоль	$F_0/(F_0-F)$ 2, мкмоль	$F_0/(F_0-F)$ 4, мкмоль	$F_0/(F_0-F)$ 6, мкмоль	$F_0/(F_0-F)$ 8, мкмоль	$F_0/(F_0-F)$ 10, мкмоль
Спортсмены	4,31±0,98	2,88±0,69	2,08±0,25	1,79±0,18	1,64±0,14	1,54±0,13
Контроль	5,22±1,77	3,19±0,46	2,29±0,28	1,91±0,14	1,75±0,14	1,62±0,099
p	0,004568	0,0009596	0,0001396	0,0002118	0,0003576	0,001374

Примечания:  $F_0/(F_0-F)$  1 ... 10 – эффективность передачи энергии с триптофанилов при различной концентрации пирена.

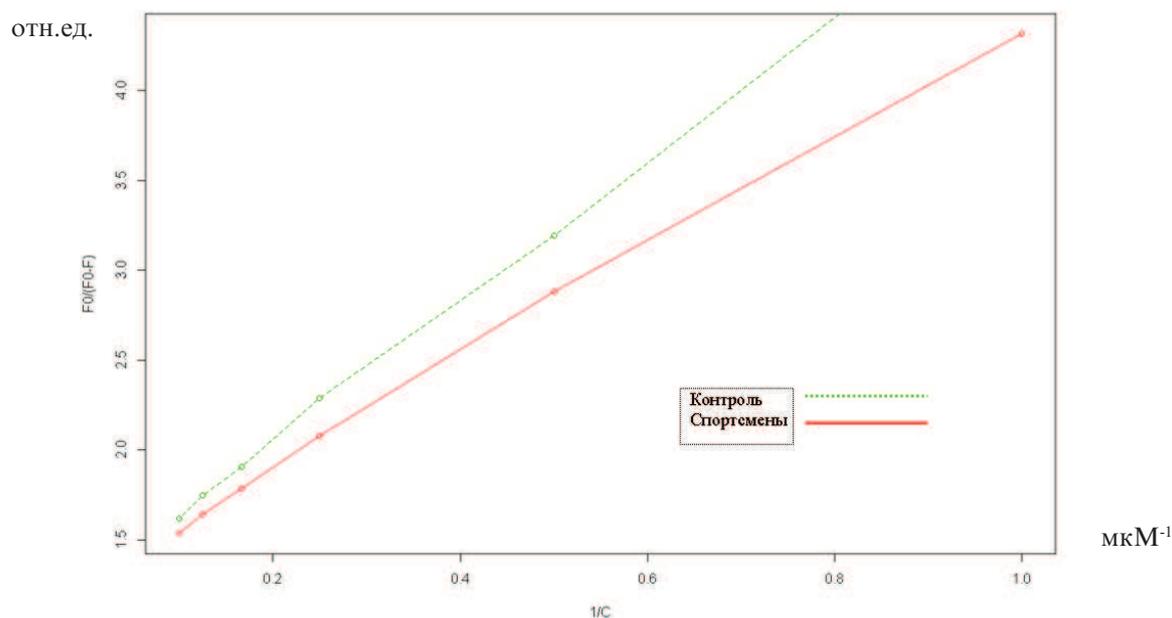


Рис. 1. Тушение флуоресценции триптофанилов пиреном у спортсменов и контрольной группы.

( $p=0,01089$ ), что говорит о погружении белковой молекулы в толщу мембраны (рис. 2). Учитывая снижение доступности тушения доноров первого рода и их неизменное количество, а также отличия  $\theta$ , существует вероятность, что в мембранах эритроцитов спортсменов белок претерпевает внутримолекулярные, не затрагивающие внешние слои, конформационные перестройки.

Рассматривая данный факт с точки зрения адаптации, можно предположить, что внутримолекулярные перестройки аквапорина-1, представляющего собой трансмембранный белок (канал), способны оптимизировать процесс переноса кислорода и увеличить эффективность работы эритроцита за счет уменьшения площади соприкосновения канала с липидной фазой [19].

Вместе с тем, необходимо отметить, что уменьшение глубины погружения белковых молекул в липидный бислой мембраны может быть обусловлено наличием высокополярных групп, указывающих на активную пероксидацию интегральных белков [20] и/или их олигомеризацию [21].

Исследование механизмов, лежащих в основе выявленных отличий физико-химических свойств мембран эритроцитов спортсменов и лиц, не занимающихся спортом,

может позволить разработать новые методы мониторинга и коррекции работоспособности спортсменов, что и является предметом наших дальнейших исследований.

### Заключение

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. У спортсменов циклических видов спорта микровязкость общего и аннулярного липидного пулов эритроцитарной мембраны достоверно ниже, чем у лиц, не занимающихся спортом.

2. Микрополярность аннулярного и общего липидных пулов мембран эритроцитов спортсменов выше, чем у лиц, не занимающихся спортом.

3. Степень погруженности белков в билипидный слой мембран эритроцитов у спортсменов ниже, чем у лиц, не занимающихся спортом.

4. Выявленные отличия могут быть обусловлены более активной перекисной модификацией белково-липидных комплексов мембран эритроцитов спортсменов, а также отличиями в спектре жирных кислот, что требует подтверждения в ходе дальнейших исследований.

отн.ед.

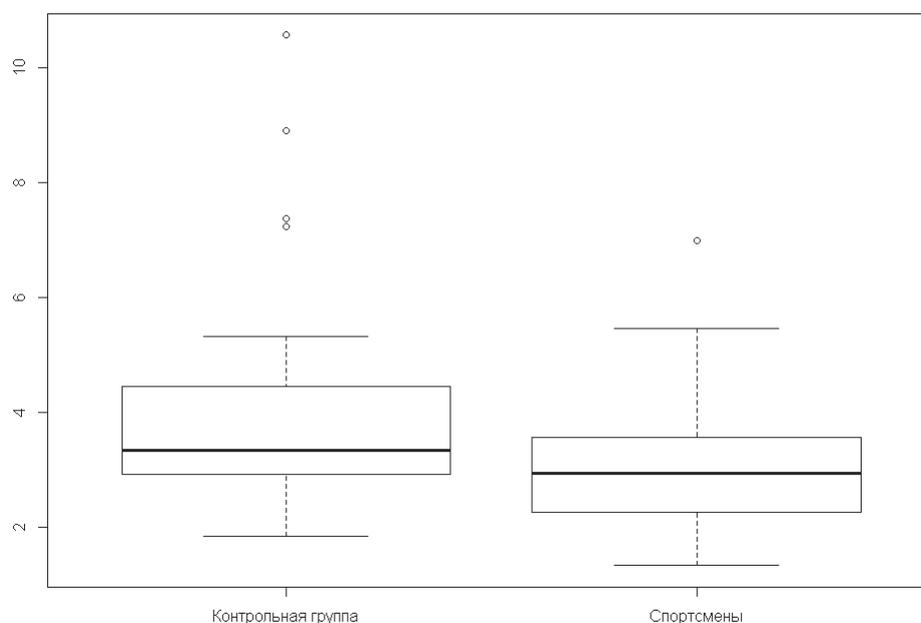


Рис. 2. Расстояние  $\theta$  между поверхностью бислоя и донорами первого рода у контрольной и опытной групп.

## Литература

1. Агарков, Ф.Т. К вопросу о повышении тепловой устойчивости организма человека средствами мышечной тренировки / Ф.Т. Агарков, А.С. Павлов // Косм. биология и медицина. - 1975. - №5. - С.75-80.
2. Павлов, А.С. Функциональное напряжение организма спортсменов и неспортсменов при различных степенях гипертермии / А.С. Павлов, Т.А. Митрофанова, В.А. Романенко // Материалы VI респ. науч.-теорет. конф. по вопр. физич. воспитания и спорта среди детей и молодежи. - Ташкент: Уз. Медицина, 1977. - Ч.1. - С. 168-170.
3. Исследование механизмов кислородного обмена эритроцитов человека / Э.П. Титовец [и др.] // Биофизика. - 2009. - Т. 10. - С. 425-441.
4. Lee, A.G. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective / A.G. Lee // *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*. - 2003. - Vol. 1612. - P. 1-40.
5. Введение в биомембранологию: учеб. пособие МГУ / А.А. Болдырев [и др.]. - 1990. - 208 с.
6. Обоснование применения эссенциальных фосфолипидов при хронических заболеваниях печени: динамика электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов / С.А. Курилович [и др.] // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. - 2010. - №11. - С. 44-52.
7. Лоншакова, В. И. Изменение микровязкости мембран эритроцитов и лимфоцитов при почечноклеточном раке / В. И. Лоншакова // Молодёжь и наука: сборник материалов VI Всерос. науч.-техн. гонф. студентов, аспирантов и молодых учёных [Электронный ресурс]. - Красноярск: Сиб. федерал. ун-т, 2011. — Режим доступа: <http://conf.sfu-kras.ru/sites/mn2010/section9.html>.
8. Ишутина, Н.А. Изменение микровязкости мембран эритроцитов крови у беременных, инфицированных вирусом герпеса / Н.А. Ишутина, Н.Н. Дорофиенко, И.А. Андриевская // Бюл. физиологии и патологии дыхания. - 2006. - Вып. 23. - Прил. - С. 16-17.
9. Мельников, Г.В. Влияние полярности микроокружения пирена на интенсивность его твердофазной люминесценции при комнатной температуре / Г.В. Мельников, Т.И. Губина, О.А. Дячук // Журн. физ. химии. - 2006. - Т. 80, № 7. - С. 1319-23.
10. Гурарий, Е.Я. Пирен как флуоресцентный зонд для оценки полярности пенополиуретановых мембран / Е.Я. Гурарий, С.Г. Дмитриенко, В.К. Рунов // Хим. физика. 1999. --Т.18, № 2. - С. 30-35.
11. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / R. J. Lakowicz. -N.Y. : Springer Science, 2006. - 960 p.
12. 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, N 1. - P. 119-130.
13. The R Project for Statistical Computing [Electronic resource]. - Mode of access: <http://www.r-project.org/>. - Date of access : 20.04.2013.
14. Whitcomb, R.W. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro / R.W. Whitcomb, W.M. Linehan, R.A. Knazek // *J Clin Invest*. - 1988. - № 81(1). - P. 185-188.
15. Коломийцева, А.Г. Липиды сыворотки крови и мембран эритроцитов у беременных с поздними токсикозами / А.Г. Коломийцева, Т.С. Черненко // Акушерство и гинекология. - 1986. - №4. - С. 22-26.
16. Hochachka, P.W. The brain at high altitude: hypo metabolism as a defance against chronic hypoxia? / P.W. Hochachka, C.M. Clarc, W.D. Brown // *J Cered-Blood-From-Metab*. - 1994. - Vol. 14, №4. - P.671-679.
17. Бутусова, В.Н. Структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран при дислипидопротеинемиях: автореф. дис. ... канд.мед. наук / В.Н. Бутусова. - Новосибирск, 2007. - 24 с.
18. Структурное состояние мембранных белков эритроцитов человека при взаимодействии с лигандами  $\beta 1$ -адренорецепторов — добутамином и атенололом / В.В. Жирнов [и др.] // Доп. НАН України. - 2008. - № 11. - С. 176-181.
19. Дергунов, А.Д. Белок-липидные взаимодействия и функционирование мембраносвязанных ферментов / А.Д. Дергунов, А.С. Капрелянци, Д.Н. Островский // Успехи биол. химии. - 1984. - Т. 25. - С. 89-110.
20. Hicks, M. A spectrophotometric method for the determination of lipid hydroperoxides / M. Hicks, J.M. Gebicki // *Anal Biochem*. - 1979. - № 99. - P. 249-253.
21. Добрецов, Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. - М.: Наука, 1989. - 277 с.

Поступила 27.05.2013 г.

Принята в печать 05.09.2013 г.

## Сведения об авторах:

Осочук С.С. - д.м.н., доцент, заведующий Научно-исследовательской лабораторией УО «ВГМУ»;

Марцинкевич А.Ф. - аспирант кафедры общей и клинической биохимии УО «ВГМУ».