

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная  
Европа

3 (11) 2014

## Беларусь

**Журнал зарегистрирован**  
Министерством информации  
Республики Беларусь 02.12.2011  
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 отдела рекламы** Коваль М.А.  
**Технический редактор** Мурашко А.В.

## Украина

**Журнал зарегистрирован**  
Государственной регистрационной  
службой Украины 16.12.2011  
Регистрационное 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

в каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь)  
индивидуальный индекс 01389  
ведомственный индекс 013892  
в каталоге ОАО «Арзи» (Российская Федерация)  
индекс 01389

в каталоге АО «Казпочта» (Казахстан)  
индекс 01389

В Украине подписка оформляется через офис  
ООО «Издательский дом «Профессиональные издания».

В электронных каталогах «Газеты и журналы»  
на сайтах агентств:

ООО «Интерпочта-2003» (Российская Федерация)  
ООО «Информнаука» (Российская Федерация)  
ЗАО «МК-Периодика» (Российская Федерация)  
ГП «Пресса» (Украина)  
ГП «Пшта Молдовой» (Молдова)  
АО «Летувос паштас» (Литва)  
ООО «Подписное агентство PKS» (Латвия)  
Фирма «INDEX» (Болгария)  
Kubon&Sagner (Германия)

индекс 01389

Электронная версия журнала доступна  
на сайте научной электронной библиотеки РФ  
[www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru) и в базе данных East View  
на сайте [www.eastview.com](http://www.eastview.com)

По вопросам приобретения журнала обращайтесь  
в редакцию в Минске  
и представительство издательства в Киеве  
по тел.: +38 (067) 360 93 80

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.  
Цена свободная.

Подписано в печать 24.09.2014 г.  
Тираж 2000 экз.  
Заказ №

Формат 70x100 1/16. Печать офсетная

**Отпечатано** в типографии

---

УДК 577.115.3:796.071

Осочук С.С., Марцинкевич А.Ф.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

Osochuk S., Martsinkevich A.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

## Метод определения интенсивности отдачи кислорода эритроцитами спортсменов циклических видов спорта

The method of determination of the oxygen release intensity from erythrocytes in athletes of cyclic sports

---

### Резюме

Предложен метод непрямого оценивания интенсивности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови, основанный на регистрации изменений физико-химических свойств элементов капиллярной крови. Путем флуоресцентного зондирования с использованием пирена определялась микровязкость и микрополярность мембран клеток капиллярной крови. Интенсивность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови оценивалась по увеличению парциального давления кислорода в инкубационной ячейке на аппаратном комплексе Record4 (Россия). Установлено, что интенсивность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови была статистически значимо выше у спортсменов, чем у лиц, не занимающихся спортом. На основании полученных данных построена модель множественной линейной регрессии, позволяющая определять интенсивность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови исходя из микровязкости и микрополярности мембран клеток капиллярной крови. Разработана компьютерная программа для упрощенной оценки интенсивности отдачи кислорода с возможностью автоматического расчета модельных значений и классификации полученных данных по категориальной шкале.

**Ключевые слова:** эритроциты, мембраны эритроцитов, электрод Кларка, микровязкость, микрополярность, спорт.

---

### Resume

The article proposes a method of indirect determination of the oxygen release intensity from venous red blood cells based on the physicochemical properties of capillary blood. The study measured the microviscosity and micropolarity of capillary blood cell membranes using a fluorescent probe – pyrene. The intensity of the oxygen release from venous blood erythrocytes was evaluated by an increase in the partial pressure of oxygen in the incubation cell at the hardware complex Record4 (Russia). The intensity of the oxygen release from venous blood erythrocytes was significantly higher in athletes than in those not involved in sports. Based on the data a model of multiple

linear regression was obtained, which allows to determine the intensity of oxygen release from venous blood erythrocytes based on the microviscosity and micropolarity cell membranes of capillary blood. Also a computer program was implemented to simplify the evaluation of the intensity of the oxygen release and automatic calculating model values and the classification of the obtained data by categorical scale.

**Keywords:** red blood cells, red cell membranes, electrode Clark, microviscosity, micropolarity, sport.

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Снижение активности поставки кислорода к работающим мышцам у спортсменов циклических видов спорта – одна из главных причин соревновательного и тренировочного травматизма [1]. По этой причине одним из важнейших показателей, характеризующих энергетический обмен этих спортсменов, является активность отдачи кислорода эритроцитами.

Известно, что транспорт кислорода через мембрану эритроцита осуществляется специфическими белками-переносчиками – аквапоринами [2], активность которых зависит от состава и физико-химических свойств их липидного окружения [3]. Ранее нами были показаны наличие взаимосвязи между физико-химическими свойствами мембран эритроцитов спортсменов и их химическим составом, а также отличия характеризующих их показателей у спортсменов и лиц, не занимающихся спортом [4].

Наличие информации об активности отдачи кислорода эритроцитами может позволить выбрать интенсивность тренировочной нагрузки, соответствующую состоянию кислород-транспортной функции эритроцитов спортсмена и предотвратить тренировочный или соревновательный травматизм.

## ■ ЦЕЛЬ

Разработать малоинвазивный метод оценки активности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови спортсменов по показателям физико-химических свойств капиллярной крови.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели сформированы группы из 15 лиц, не занимающихся спортом (возраст –  $19,6 \pm 2,1$  года), и 36 спортсменов различной квалификации в возрасте  $17,9 \pm 3,2$  года. Взятие венозной крови осуществляли в утренние часы натощак из локтевой вены в вакутайнеры объемом 5 мл с 3,2% раствором цитрата натрия. Одновременно забирали капиллярную кровь из безымянного пальца левой руки обследуемых.

Определение физико-химических свойств клеток капиллярной крови осуществляли при помощи флуоресцентного зондирования. Для этого 10 мкл крови вносили в кварцевую кювету с толщиной оптического слоя 1 см и последовательно титровали пиреном до конечной концентрации 1,2 и 4 мкмоль/л. Микровязкость аннулярного и общего липидного слоя оценивали как отношение интенсивности пиков флуоресценции при длинах волн 374–376 нм и 470–480 нм при длине волны возбуждения 286 и 337 нм соответственно. Микрополярность аннулярного и общего липидного пула рассчитывали как отношение интенсивности испускания мономеров пирена при длинах волн возбуждения

286 и 337 нм. Процедуру исследования стандартизовали по интенсивности флуоресценции триптофанилов без пирена в диапазоне  $330 \pm 2$  нм при длине волны возбуждения 286 нм.

Оценку эффекта отдачи кислорода эритроцитами венозной крови проводили в термостатируемой ячейке с использованием электрода Кларка на аппаратном комплексе Record4 (Россия). Выделение эритроцитов проводили двукратным центрифугированием в рефрижераторной центрифуге РС 6 при 3000 об/мин в течение 15 мин с промежуточной отмывкой забуференным (рН 7,4) физиологическим раствором и удалением верхнего лейкоцитарного слоя. Полученную суспензию эритроцитов разводили фосфатным буферным раствором с рН=7,4 (20 ммоль/л раствор гидрофосфата натрия) до оптической плотности 0,5 ед.  $\pm$  5%. Перед добавлением суспензии эритроцитов в ячейку из инкубационной среды вытесняли кислород барбатируанием азотом (ОСЧ) в течение 15 мин. К 2 мл обедненной кислородом инкубационной среды добавляли 0,1 мл стандартизованной по оптической плотности суспензии эритроцитов и регистрировали увеличение концентрации кислорода в ячейке в течение 5 мин. Для устранения влияния процесса растворения кислорода окружающей среды на содержание кислорода в ячейке проводили «холостой» (без эритроцитарной взвеси) эксперимент, показатели которого вычитали из опытных данных. Об интенсивности отдачи кислорода эритроцитами судили по тангенсу угла наклона полученной прямой.

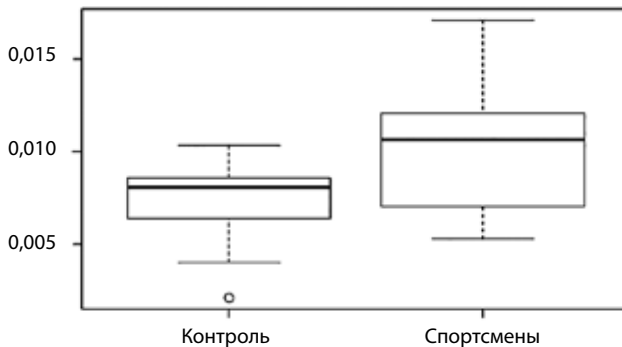
Так как распределение полученных данных отличалось от нормального (согласно тесту Шапиро – Уилка), использовались непараметрические методы статистики. Для разработки метода оценки активности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови по показателям физико-химических свойств клеток капиллярной крови использовали метод ранговой корреляции Спирмена. Полученная линейная множественная регрессия оценивалась при помощи информационного критерия Акаике [5]. Для получения более точной информации о состоянии процесса переноса кислорода характеризующие его показатели были подвергнуты кластерному анализу по методу k-средних на основе расстояния Брегмана в квадратичной Евклидовой метрике. Расчеты выполнялись при помощи статистического пакета R [6].

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование физико-химических свойств клеток капиллярной крови спортсменов и лиц, не занимающихся спортом, не выявило достоверных отличий, что не совпадает с полученными нами ранее данными при исследовании мембран эритроцитов венозной крови [4].

Анализ активности процесса увеличения количества кислорода в инкубационной среде в присутствии эритроцитов венозной крови показал, что у спортсменов тангенс угла наклона полученной кривой был больше, чем у лиц, не занимающихся спортом ( $p=0,03$ ), что свидетельствует о более активной отдаче кислорода эритроцитами спортсменов. Учитывая выявленные ранее отличия физико-химических свойств мембран эритроцитов спортсменов и лиц, не занимающихся спортом, можно предположить, что отличия в активности отдачи кислорода обусловлены, в том числе различиями физико-химических свойств (рис. 1).

Отсутствие отличий может быть обусловлено неоднородностью состава клеток капиллярной крови.



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

Проведение регрессионного анализа позволило получить математическую модель, представляющую собой уравнение множественной линейной регрессии вида:

$$IO_2 = -1,00 \times 10^{-6} \times icMVA2 + 2,83 \times 10^{-7} \times icMVG1 + 1,75 \times 10^{-7} \times icMVG2 - 3,14 \times 10^{-10} \times icMPA1 + 1,71 \times 10^{-10} \times icMPG1 - 3,99 \times 10^{-9} \times icMPG4 + 1,02 \times 10^{-2},$$

где  $IO_2$  – интенсивность отдачи кислорода;

$icMVA1$ ,  $icMVG1$ ,  $icMVG2$  – приведенные показатели оценки микровязкости аннулярного и общего липидных пулов мембран клеток капиллярной крови при 1 и 2 мкмоль/л пирена соответственно;

$icMPA1$ ,  $icMPG1$  и  $icMPG4$  – приведенные показатели оценки микрополярности аннулярного и общего липидных пулов мембран клеток капиллярной крови при 1 и 4 мкмоль/л пирена соответственно.

Коэффициенты регрессии являются значимыми при уровне 0,05, индекс Акаике – 476. Ошибка модели, вычисленная при проведении кросс-валидации по методу k-fold, равна  $8,18 \times 10^{-6}$  при среднем значении определяемого параметра –  $9,33 \times 10^{-3}$  (см. таблицу).

Согласно полученной модели высокая микровязкость аннулярного (прибелкового) липидного слоя мембран клеток капиллярной крови характерна для низкой активности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови. В свою очередь, повышение микровязкости общего

#### Коэффициенты регрессии и их характеристика

Параметр	Коэффициент	Стандартная ошибка	p
icMVA2	$-1,00 \times 10^{-6}$	$1,82 \times 10^{-7}$	<0,001
icMVG1	$2,83 \times 10^{-7}$	$5,3 \times 10^{-8}$	<0,001
icMVG2	$1,75 \times 10^{-7}$	$4,60 \times 10^{-8}$	<0,001
icMPA1	$-3,14 \times 10^{-10}$	$6,61 \times 10^{-11}$	<0,001
icMPG1	$1,71 \times 10^{-10}$	$6,45 \times 10^{-11}$	0,011
icMPG4	$-3,99 \times 10^{-9}$	$1,36 \times 10^{-9}$	0,005
Intercept	$1,02 \times 10^{-2}$	$3,92 \times 10^{-4}$	<0,001

липидного слоя клеток капиллярной крови ассоциировано с увеличением отдачи кислорода эритроцитами венозной крови. Учитывая неоднородность клеточного материала капиллярной крови, выявленные зависимости могут быть лишь частично обусловлены физико-химическими свойствами мембран эритроцитов. Вероятно, точность модели была бы еще выше при обработке одних лишь эритроцитов капиллярной крови.

Соотношение предсказанных и полученных экспериментально значений представлено на рис. 2.

Исходя из представленного материала и информации, отраженной на рис. 2, можно говорить о высокой точности полученной математической модели, что позволяет определить активность трансмембранного переноса кислорода из эритроцитов венозной крови в окружающую среду по физико-химическим свойствам клеток капиллярной крови.

Проведение кластерного анализа позволило выявить 3 основные кластера активности переноса кислорода от эритроцитов (рис. 3).

Для первого кластера (низкая активность переноса кислорода) диапазон значений составил 0,001–0,009, для второго кластера (умеренная активность переноса кислорода) – 0,009–0,013, для третьего (высокая активность переноса кислорода) – 0,013–0,017.

Таким образом, полученные результаты могут позволить дозировать физическую нагрузку в зависимости от степени активности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови. При низкой активности отдачи кислорода не рекомендуется проведение тренировок на выносливость. Соответственно, при высокой активности, напротив, тренировки на выносливость могут быть наиболее переносимыми.

Для упрощения расчетов по предлагаемому методу была разработана компьютерная программа для автоматизированного расчета зна-

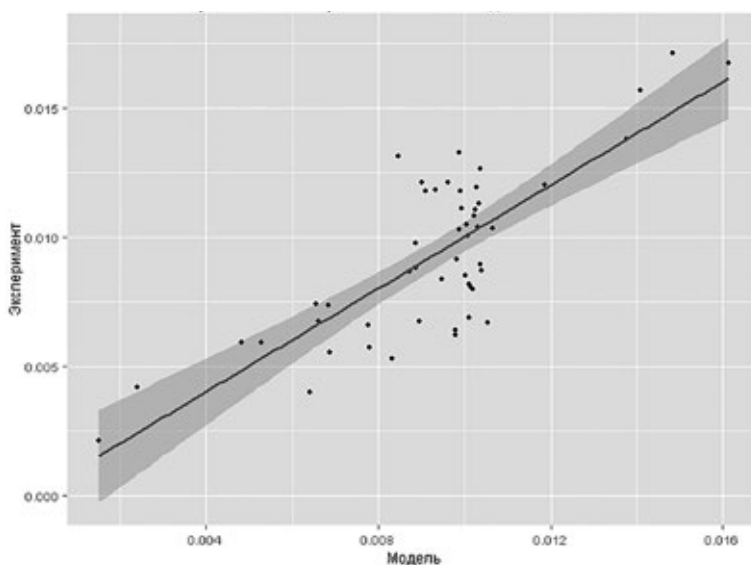
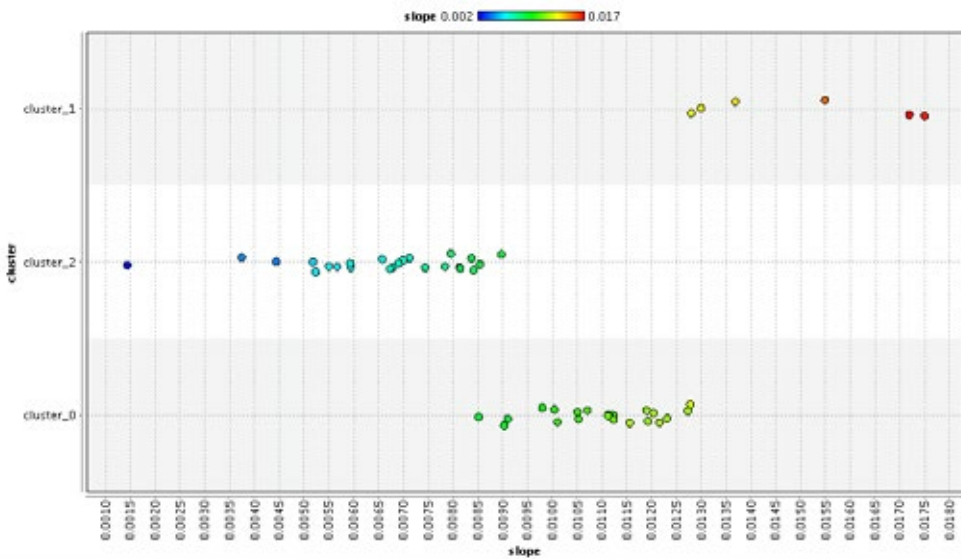


Рис. 2. Сравнение экспериментальных и модельных значений



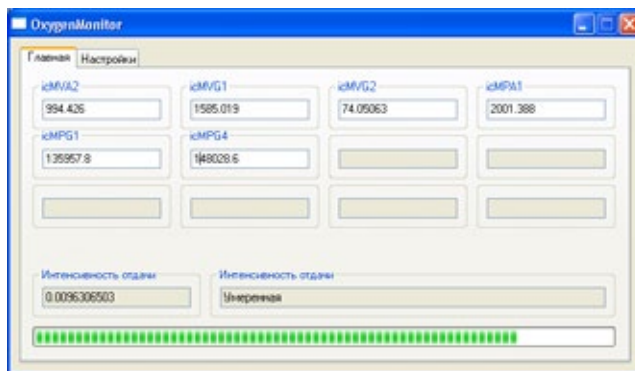
**Рис. 3. Кластерный анализ интенсивности отдачи кислородами эритроцитами венозной крови по методу k-средних**

чений интенсивности отдачи кислорода. Детально программа отражена в интернет-ресурсе [7] (рис. 4).

Программа имеет панель настройки, которая позволяет корректировать коэффициенты регрессии и вносить дополнительные параметры с целью внутрилабораторной корректировки получаемых данных, а также предоставляет словесное выражение степени активности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови: низкая, умеренная, высокая активность отдачи кислорода.

## ■ ВЫВОДЫ

1. Исследования с использованием флуоресцентного зондирования физико-химические свойства клеток капиллярной крови спортсме-



**Рис. 4. Главное окно программы**

- нов и лиц, не занимающихся спортом, не имеют достоверных отличий.
2. У спортсменов интенсивность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови выше, чем у лиц, не занимающихся спортом.
  3. Активность отдачи кислорода эритроцитами венозной крови находится в прямой зависимости от жидкостности аннулярного липидного пула и в обратной – от жидкостности общего липидного пула клеток капиллярной крови и может быть разделена на низкую, умеренную и высокую.
  4. Разработанная математическая модель может быть использована для определения активности отдачи кислорода эритроцитами венозной крови.
- 

## ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Теория и методика физической культуры: учебник / под ред. проф. Ю.М. Курамшина. – 2-е изд., испр. – Москва : Советский спорт, 2004. – С. 148–149.
  2. Титовец, Э.П. Исследование механизмов кислородного обмена эритроцитов человека / Э.П. Титовец [и др.] // Биофизика. – 2009. – Т. 10. – С. 425–441.
  3. 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.
  4. Физико-химические свойства мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта [Текст] / С.С. Осочук, А.Ф. Марцинкевич // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 25–31.
  5. Akaike, H. A new look at the statistical model identification / H. Akaike // *IEEE Transactions on Automatic Control*. – 1974. – Vol. 19. – P. 716–723.
  6. The R Project for Statistical Computing [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.r-project.org/>. – Date of access: 25.03.2014.
  7. Program for level oxygen monitoring [Electronic resource]. – Mode of access: <http://pastebin.com/5Stu3N8z> – Date of access : 25.03.2014.
- 

Поступила в редакцию 16.05.2014

Контакты

e-mail: [argentum32@gmail.com](mailto:argentum32@gmail.com)

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