



*К Первому Белорусскому
Биохимическому Конгрессу*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ

CURRENT PROBLEMS IN BIOCHEMISTRY



1 часть

ГРОДНО 2016 GRODNO

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «ИНСТИТУТ БИОХИМИИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ»

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ

CURRENT PROBLEMS IN BIOCHEMISTRY

Сборник научных статей

Часть 1

Гродно

2016

УДК 577+615

ББК 28.072

С 56

Рекомендовано Ученым советом Республиканского научно-исследовательского
унитарного предприятия «Институт биохимии биологически активных
соединений НАН Беларуси»

Редакционная коллегия:

Надольник Л. И., доктор биологических наук (главный редактор);

Пронько П. С., доктор биологических наук;

Аверин В. А., кандидат биологических наук;

Чумаченко С. С., кандидат биологических наук;

Кирюхина Л. Г., ведущий переводчик;

Шляхтун А. Г., научный сотрудник.

Рецензенты:

Макарчиков А. Ф., доктор биологических наук;

Чиркин А. А., доктор биологических наук, профессор.

С 56 **Современные проблемы биохимии**= Current problems in biochemistry :

сб, науч. ст./ НАН Беларуси [и др.]; редкол.: Л. И. Надольник (гл. ред.) и [и др.].

– Гродно: ЮрСаПринт, 2016. – Ч. 1. – 340 с.

ISBN 978-985-6484-92-8.

В сборнике статей представлены результаты научных исследований в области биохимии, биомедицинской химии, молекулярной биологии, генетики, биофизики, посвященные важнейшим направлениям современных биологических наук. Основу сборника составили научные статьи ученых Беларуси, также представлены статьи ученых России, Грузии, Украины, Литвы, Турции, Хорватии, Монголии. Адресовано научным работникам, преподавателям учреждений высшего образования, аспирантам, магистрантам, студентам биологических и медицинских специальностей.

УДК 577+615

ББК 28.072

ISBN 978-985-6484-92-8

© Республиканское научно-исследовательское
унитарное предприятие «Институт биохимии биологически
активных соединений Национальной академии наук
Беларуси», 2016

ВЛИЯНИЕ Ω3-ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И РАБОТОСПОСОБНОСТЬ СПОРТСМЕНОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА

В настоящее время спорт высоких достижений является, в том числе, средством продвижения национальных интересов государств на мировом уровне. Результативность спортсменов зависит, в первую очередь, от их энергетического потенциала, определяющегося эффективностью механизмов доставки кислорода в ткани, что обуславливает актуальность исследований в этой области.

Ранее нами было показано, что у спортсменов циклических видов спорта активность перекисной модификации мембран эритроцитов увеличивается по мере роста уровня спортивного мастерства, достигая максимальных значений у мастеров спорта [1]. Трёхмерное моделирование модификации анионного транспортера (участник эффекта Бора) продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ) показало наличие возможности роста их селективности по отношению к углекислому газу [1] и, таким образом, увеличения эффективности транспорта кислорода эритроцитами. Вместе с тем, было определено, что у спортсменов циклических видов спорта микровязкость общего и прибежкового (аннулярного) липидных пулов была ниже, чем у лиц, не занимающихся спортом [2]. Известно, что ключевую роль в регуляции активности трансмембранных белков играют физико-химические свойства прибежкового и общего липидных пулов [3]. Учитывая способность ПОЛ повышать текучесть мембран за счет понижения плотности упаковки фосфолипидов [4], можно заключить, что этот процесс является одним из способов изменения физико-химических свойств с целью изменения функциональной активности ассоциированных с мембраной белков. В свою очередь, микровязкость мембран может лимитироваться и иными факторами, в частности полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) [5]. Возможно, рост перекисной модификации белков и липидного окружения является адаптационным механизмом снижения доступности ПНЖК. Оценка влияния ПНЖК на работоспособность спортсменов показала, что прием льняного масла в течение месяца статистически значимо увеличивал показатели работоспособности спортсменов в ходе велоэргометрии [6], что косвенно подтверждает наше предположение.

Целью настоящей работы было построение графической модели взаимодействия физико-химических свойств мембран эритроцитов, показателей их перекисной модификации при обычном рационе и при потреблении ПНЖК льняного масла.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 14 спортсменах циклических видов спорта (велоспорт, легкая атлетика,

биатлон), обучавшихся в Витебском училище олимпийского резерва. Возраст спортсменов составил $18,0 \pm 1,6$ лет. Уровень спортивного мастерства: 1-й взрослый разряд – кандидат в мастера спорта. Кровь для обследования забирали дважды, в утренние часы, натощак, из локтевой вены в вакуутайнеры с цитратом натрия в условиях клинической лаборатории Витебского областного диспансера спортивной медицины. Первый забор крови осуществлялся до применения льняного масла, второй - через 30 дней ежедневного приема масла в дозе 14-18 граммов во время второго обеденного блюда. Для работы использовано льняное масло производства ООО «Клуб «Фарм-Эко», (Республика Беларусь, г. Дрогичин), содержащее $11,2 \pm 4,2\%$ пальмитиновой (C16:0), $13,6 \pm 5,8\%$ олеиновой (C18:1n9), $42,2 \pm 8,1\%$ линолевой (C18:2n6) и $32,2 \pm 4,4\%$ линоленовой (C18:3n6) кислот.

Эритроциты отмывали в буферном (150 мМ NaCl+5 мМ фосфат Na, pH 8,0) растворе и проводили выделение мембран эритроцитов по методу Доджа [7]. Очищенные мембраны стандартизовали по белку до конечной концентрации 100 мг/мл и оценивали физико-химические свойства при помощи флуоресцентного зонда пирена в концентрации 10 мкМ [2] на спектрофлуориметре SOLAR CM2203 (Беларусь). На основании анализа уравнения Штерна-Фольмера оценивали эффективность переноса энергии с белковых триптофанилов на пирен, доступность их тушению и среднее расстояние между триптофанилами и бислоем фосфолипидов [8].

Окислительную модификацию белков оценивали по активности флуоресценции продуктов их свободнорадикальной модификации (битирозины, триптофанилы и конъюгаты лизина с продуктами ПОЛ). Активность флуоресценции битирозинов определяли при λ 325 нм возбуждения и регистрации 415 нм, триптофанилов – при λ 295 возбуждения и регистрации 325 нм, конъюгатов лизина – при λ 365 возбуждения и регистрации 440 нм [8].

Велоэргометрия проводилась на программно-аппаратном комплексе «Интеркард-4» перед началом эксперимента и на следующий день после последнего приема льняного масла. Увеличение нагрузки проводили каждые 3 минуты, пробу останавливали при достижении субмаксимального уровня ЧСС, рассчитанной по формуле: $\text{ЧСС} = \text{ЧСС в покое} + K (215 - \text{возраст} - \text{ЧСС в покое})$, где K – коэффициент поправки для спортсменов (0,9).

Математическое моделирование осуществлялось с использованием пакета прикладных статистических программ R 3.2.4. Построение байесовской сети доверия производили на основании гибридного алгоритма ММНС (Max-Min Hill Climbing) на основе пакета bnlearn. Силу ребер полученной графической вероятностной модели считали значимой при $p < 0,05$. Для тестирования гипотезы о нормальности закона распределения исследуемых признаков использовали критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения для корреляционного анализа применялся критерий Пирсона, в случае распределения,

отличного от нормального – критерий Спирмена. Отличия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Возраст и пол не оказывали статистически значимого влияния на анализируемые показатели, что позволило объединить обследованных в группу.

Результаты. Полученная в результате исследования графическая вероятностная модель (рисунок 1) показывает, что состояние липидного бислоя и показатели окислительной модификации белков тесно взаимосвязаны и существенно отличаются до и после приема льняного масла.

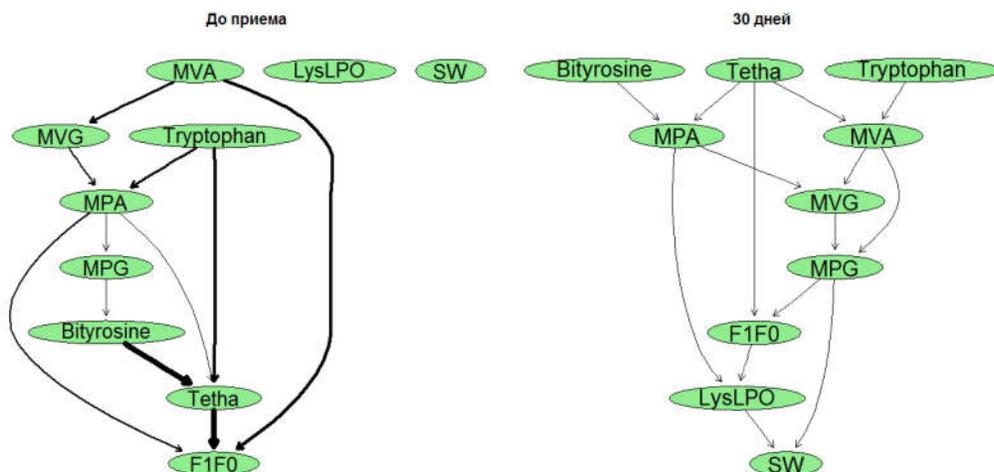


Рисунок 1 – Графическая вероятностная модель взаимосвязи физико-химических свойств мембран эритроцитов и окислительной модификации белков до приема льняного масла и по прошествии 30 дней

Примечание: MVA, MVG – микровязкость аннулярного и общего липидного пула, соответственно; MPA, MPG – микрополярность аннулярного и общего липидного пула, соответственно; Tryptophan – интенсивность флуоресценции окисленных триптофановых радикалов; LysLPO – интенсивность флуоресценции конъюгатов лизина; Bityrosine – интенсивность флуоресценции радикалов битирозина; Tetha – глубина погружения белка в бислой; F1F0 – количество доноров 1-го рода в молекуле белка; SW – суммарная работа, выполненная на велоэргометре

До приема льняного масла распространение влияния осуществляется от микровязкости аннулярного липидного пула (MVA) на микровязкость общего липидного пула (MVG), который, в свою очередь, вместе с окисленными триптофанами оказывает влияние на микрополярность аннулярного (MPA) и затем общего липидного пулов (MPG). В дальнейшем влияние оказывается на битирозины, через них на глубину погружения белка в липидный слой (Tetha) и количество доноров первого рода в белковых молекулах (F1F0), отражающим «развернутость» макромолекулы белка. При этом показатель лизиновых конъюгатов (LysLPO) и суммарная работоспособность (SW) не вовлечены в полученную модель.

Таким образом, учитывая отсутствие в модели суммарной работоспособности, можно заключить, что изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов и их перекисная модификация имеют

конечной точкой воздействия конформационные изменения белков и, вероятно, носят адапционный характер.

После приема льняного масла на первые позиции влияния выходят битирозины (Bityrosine), глубина погружения белковых молекул в билипидный слой (Tetha) и трипотфанилы (Tryptophan), оказывающие непосредственное влияние на микрополярность (MPA) и микровязкость (MVA) аннулярных липидных пулов. Следует отметить, что после приема льняного масла конечной точкой влияния является суммарная работоспособность (SW), реализующаяся под непосредственным влиянием лизиновых конъюгатов (LysLPO) и микрополярности общего липидного пула (MPG).

Таким образом, можно заключить, что как до, так и после приема льняного масла значительное влияние на адаптацию к физической нагрузке имеют процессы окислительной модификации белков, однако после приема льняного масла их влияние переходит на более высокий уровень и направлено на конечную суммарную работоспособность. Вероятно, в обоих случаях следует осторожно относиться к применению антиоксидантов.

Проведенный анализ главных компонент до приема льняного масла (рисунок 2 А), показал, что микровязкость аннулярного и общего липидных пулов связана функциональной зависимостью и коррелирует с количеством битирозинов. Глубина погружения белковых молекул в бислой (Tetha) связана с работоспособностью спортсменов (SW) и обратно пропорционально зависит от количества доноров 1-го рода (F1F0). Работоспособность незначительно возрастает с ростом микрополярности обоих липидных пулов (MPA и MPG).

После приема льняного масла картина изменяется.

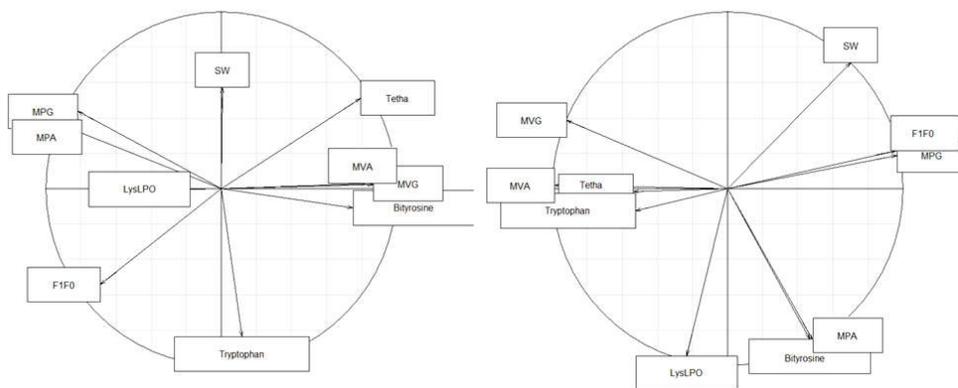


Рисунок 2 – Анализ главных компонент показателей физико-химических свойств мембран эритроцитов и окислительной модификации белков до (А) и после (В) приема льняного масла

Отмечаются изменения во взаимосвязи микровязкости аннулярного и общего липидных пулов, высокая коллинеарность между микрополярностью аннулярного слоя и количеством битирозина, а также

крайне высокая согласованность в изменении микрополярности общего липидного пула, работоспособности и количества доноров 1-го рода.

Заклучение. На основании полученных данных можно заключить, что физико-химические свойства мембран в значительной степени зависят от их перекисной модификации. У спортсменов, находящихся на стандартном рационе, изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов и их перекисная модификация не оказывают прямого влияния на суммарную работоспособность и определяются в незначительной степени лишь при анализе главных компонент. У принимавших льняное масло спортсменов изменяется структура взаимодействий физико-химических свойств мембран и участие в этом процессе перекисной модификации, имеющие конечной точкой влияния суммарную работоспособность, что также подтверждается анализом главных компонент. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости внимательного отношения к бесконтрольному употреблению антиоксидантов у спортсменов циклических видов спорта.

Список литературы

1. Осочук, С. С. Окислительная модификация белков и липидов мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта / С. С. Осочук, А. Ф. Марцинкевич // Вестник БГУ. Серия 2. – 2015. – № 2. – С. 47–52.
2. Физико-химические свойства мембран эритроцитов спортсменов циклических видов спорта / С. С. Осочук, А. Ф. Марцинкевич // Вестник ВГМУ: ежеквартальный научно-практический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 25–31.
3. Lee, A. G. Lipid-protein interaction in biological membranes: a structural perspective / A. G. Lee // Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes. – 2003. – Vol. 1612. – P. 1–40.
4. Бутусова, В. Н. Структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран при дислипотеинемиях : автореф. дис. ... канд. мед. наук / В. Н. Бутусова. – Новосибирск, 2007. – 24 с.
5. Новгородцева, Т. П. Состав свободных и эстерифицированных жирных кислот крови при формировании метаболического синдрома / Т. П. Новгородцева, Ю. К. Караман, Н. В. Жукова [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2012. – Т. 32, № 2. – С. 61–66.
6. Осочук, С. С. Увеличение работоспособности спортсменов циклических видов спорта льняным маслом / С. С. Осочук, А. Ф. Марцинкевич, М. П. Королевич // Состояние здоровья: медицинские, социальные и психолого-педагогические аспекты: VII Междунар. науч.-практ. интернет-конференция / Забайкал. гос. ун-т; отв. ред. С. Т. Кохан. – Чита : Забайкал. гос. ун-т, 2016. – С. 315–320.
7. 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, No. 1. – P. 119–130.
8. Добрецов, Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.