

УДК 577.1+796/799

К ВОПРОСУ О РОЛИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ КАК МАРКЕРОВ ТРЕНИРОВАННОСТИ К ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Елаева Н.Л., Минаева Л.В., Батоцыренова Е.Г.,
Степанова С.В., Елаева М.Н., Кашуро В.А.

ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург,
e-mail: nataliaelaeva@yandex.ru

Целью работы явилось изучение содержания металлотионеинов и олигопептидов в плазме крови спортсменов после окончания недельного интенсивного микроцикла тренировочного бега. Исследование выполнено с участием 27 мужчин – спортсменов различной квалификации. Показано, что в крови спортсменов квалификации 1 разряда, КМС и МС уровень металлотионеинов достоверно снижен по сравнению с определяемым у спортсменов более низкой квалификации (2 разряд и без разряда). Отмечена положительная корреляция между индивидуальными значениями металлотионеинов и олигопептидов, измеренными в плазме крови спортсменов. Полученные результаты поддерживают представление о возможной роли металлотионеинов как маркеров тренированности к физической нагрузке.

Ключевые слова: металлотионеины, олигопептиды, плазма крови, спортсмены, бег

BY THE ROLE OF METALLOTHIONEIN AS MARKER IN PHYSICAL EXERCISE

Elaeva N.L., Minaeva L.W., Batotsyrenova E.G.,
Stepanova S.W., Elaeva M.N., Kashuro W.A.

FSBSI «Institute of Toxicology» FMBA of Russia, Saint-Petersburg,
e-mail: nataliaelaeva@yandex.ru

The aim was to study the content of metallothionein and oligopeptides in the blood plasma of runners after a week intensive training cycle of the run. The study performed involving 27 men athletes of different qualifications. It is show that metallothionein concentration significantly reduced in the blood athlete's skill rank 1, the candidate for the master of sports and the master of sports compared with the athletes lower qualifications (rank 2 and no discharge). Show a positive correlation between the individual metallothionein values and oligopeptides measured in plasma of athletes. The results support the idea of a possible role of metallothionein as marker in physical exercise.

Keywords: metallothionein, oligopeptides, blood plasma, athletes, run

В последние десятилетия усиливается интерес к так называемым стрессовым белкам, в частности, к металлотионеинам, индукция синтеза которых отмечена в ответ на целый ряд воздействий. Функции металлотионеинов разнообразны, и наши представления об этих функциях расширяются по мере изучения самих металлотионеинов. Первоначально данным белкам отводилась, главным образом, ведущая роль в регуляции гомеостаза таких эссенциальных металлов, как цинк и медь, а также в связывании и детоксикации конкурентных с ними тяжелых металлов, прежде всего кадмия, ртути и свинца. Металлотионеины, благодаря высокому содержанию цистеина в своем аминокислотном составе, могут противодействовать развитию оксидативного стресса и повреждению клеток. В связи с этим в качестве стрессовых белков металлотионеины рассматриваются как «мусорщики свободных радикалов» [1].

С другой стороны, длительная индукция синтеза металлотионеинов вызывает антиапоптотический эффект, приводя к развитию

так называемой апоптотической толерантности, что потенциально может явиться основой туморогенеза. Действительно, повышенная экспрессия металлотионеинов отмечается в карциномах в отличие от доброкачественных опухолей [2]. Учитывая появляющиеся данные об ингибировании тяжелыми металлами процесса фолдинга белков, есть предпосылки для приписывания металлотионеинам влияния и на этот процесс через деингибирование [3]. Как известно, влияние на фолдинг белков оказывают белки теплового шока, также являющиеся стрессовыми белками.

В качестве стрессовых белков металлотионеины участвуют в ответной реакции организма на физическую нагрузку. В исследованиях, проведенных на крысах, а также при изучении биохимических параметров в организме людей, выявляются достоверные изменения в уровне экспрессии генов и концентрации металлотионеинов в крови, моче и мышцах при физической нагрузке [4, 5].

Низкая молекулярная масса металлотионеинов и высокая реактивность в ответ на

различные стрессовые факторы дают основания предполагать, что металлотиионеины могут являться одним из источников олигопептидных компонентов при развитии эндогенной интоксикации.

Целью настоящей работы явилось изучение содержания металлотиионеинов и олигопептидов в плазме крови спортсменов после интенсивного тренировочного бега.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено с участием 27 мужчин-спортсменов (бег на длинную дистанцию) и было проведено непосредственно после завершения недельного интенсивного микроцикла тренировки.

Субъектами первой группы исследуемых являлись 12 бегунов квалификацией 2 разряд или без разряда. Во вторую группу были включены 19 спортсменов квалификацией 1 разряд или кандидат в мастера спорта (КМС). В третьей группе были представлены 6 мастеров спорта (МС).

Металлотиионеины плазмы крови определяли иммуноферментным методом. Иммуноферментный анализ осуществляли с помощью набора для количественного определения тотальных металлотиионеинов в крови человека производства фирмы Cusabio (Китай), содержащего планшеты с иммобилизованными антителами. Измерения проводили на полуавтоматическом иммуноферментном микропланшетном анализаторе Immunochem 2100 (High Technology, США). Уровень металлотиионеинов определяли по калибровочной кривой стандартных образцов, построенной в логарифмических координатах.

Для определения пула олигопептидов (ОП) в крови использовали метод М.Я. Малаховой [6]. Суть метода состоит в осаждении крупномолекулярных частиц плазмы крови и эритроцитов 15%-м раствором трихлоруксусной кислоты с последующим определением олигопептидов в кислоторастворимом супернатанте по методу Лоури в модификации М.Я. Малаховой. Статистическую обработку данных производили по методу Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице представлены результаты определения содержания металлотиионеинов в плазме крови спортсменов, отнесенных к трем вышеописанным группам.

Для первой группы спортсменов, имеющих 2 разряд или не имеющих разряда,

уровень металлотиионеинов в плазме крови составил $7,1 \pm 0,5$ нг/мл. У второй группы спортсменов с квалификацией 1 разряд или КМС количество металлотиионеинов в крови после аналогичных тренировок было достоверно ниже – $5,1 \pm 0,69$ нг/мл. В третьей группе у мастеров спорта был отмечен уровень металлотиионеинов, равный $5,0 \pm 0,7$ нг/мл, который достоверно не отличен от определенного для второй группы спортсменов. Ранее нами было показано, что в плазме крови людей средней степени тяжести уровень металлотиионеинов при использовании этого же иммуноферментного анализа составляет $10,4 \pm 1,1$ нг/мл [7]. Таким образом, для спортсменов всех групп содержание металлотиионеинов в плазме крови ниже лабораторной нормы. В литературе имеются экспериментальные данные о том, что в отличие от нетренированных животных, у которых интенсивный (длительный) бег вызывает повышение уровня металлотиионеинов, в группе крыс с хронической нагрузкой бегом наблюдается снижение количества этих белков [8].

Указанные данные могут в определенной мере объяснять снижение содержания металлотиионеинов в крови квалифицированных спортсменов, наиболее выраженное во 2 и 3 группах.

Как известно, основной причиной снижения работоспособности спортсменов является метаболическое утомление. Феномен метаболического утомления соответствует клинко-лабораторному синдрому эндогенной интоксикации.

На основании расчета корреляции уровня молекул средней массы и индекса адаптации недавно было показано, что накопление среднемолекулярных пептидов в крови спортсменов свыше 0,79 г/л плазмы является диагностическим критерием высокого риска срыва адаптации к физическим нагрузкам у спортсменов в условиях тренировочного процесса [9].

Количественное содержание металлотиионеинов и олигопептидов в плазме крови спортсменов-мужчин разной квалификации*

показатель	1 группа	2 группа	3 группа	P1-2	P2-3	P1-3
МТ (нг/мл)	$7,1 \pm 0,5$ n = 12	$5,1 \pm 0,6$ n = 19	$5,0 \pm 0,7$ n = 6	< 0,05	> 0,05	< 0,05
ОП (г/л)	$0,539 \pm 0,018$ n = 12	$0,559 \pm 0,028$ n = 19	$0,590 \pm 0,060$ n = 6	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Примечание. * 1 группа – без разряда или 2 разряд, 2 группа – 1 разряд и кандидаты в мастера спорта, 3 группа – мастера спорта.

В связи с этим в нашей работе было проведено изучение уровня олигопептидов в крови спортсменов-бегунов. В таблице отражены результаты определения, из которых следует, что различий в количестве олигопептидов в плазме крови спортсменов всех трех групп не выявлено, но их средний уровень несколько превышает

нашу лабораторную норму (0,42–0,48 г/л) и соответствует литературным данным о более высоких «нормальных значениях» этого показателя для спортсменов (0,51–0,55 г/л). Однако лишь у одного спортсмена количество олигопептидов плазмы крови превышало указанное критическое значение 0,79 г/л.

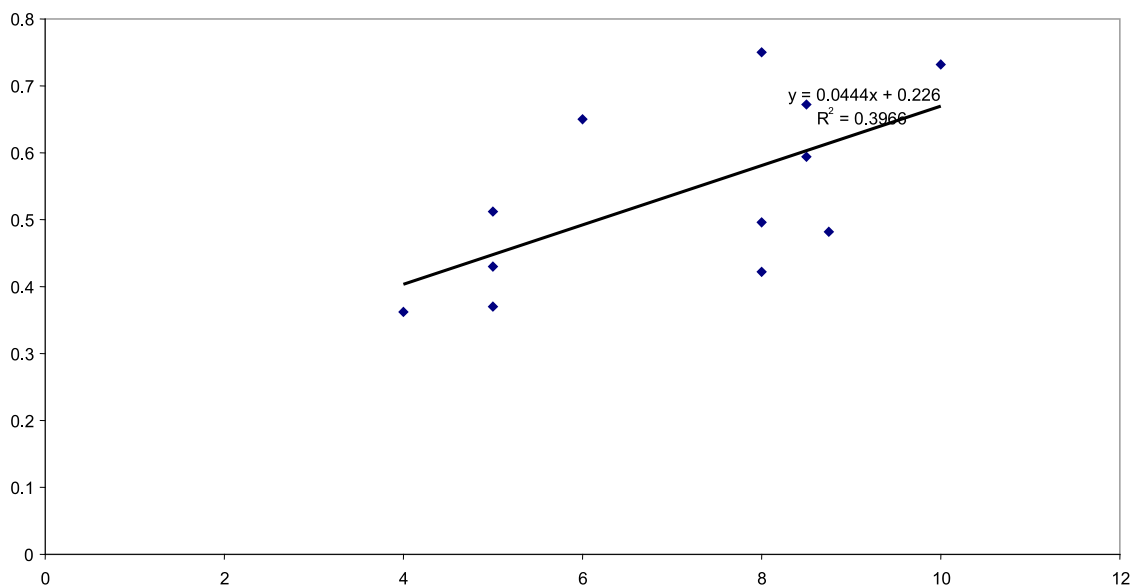


Рис. 1. Корреляция содержания металлотioniонин и олигопептидов в плазме крови спортсменов 2 разряда и не имеющих разряда. По оси абсцисс – концентрация металлотioniонин в плазме крови (нг/мл), по оси ординат – концентрация олигопептидов (г/л). $R = 0,63$ $P < 0,01$

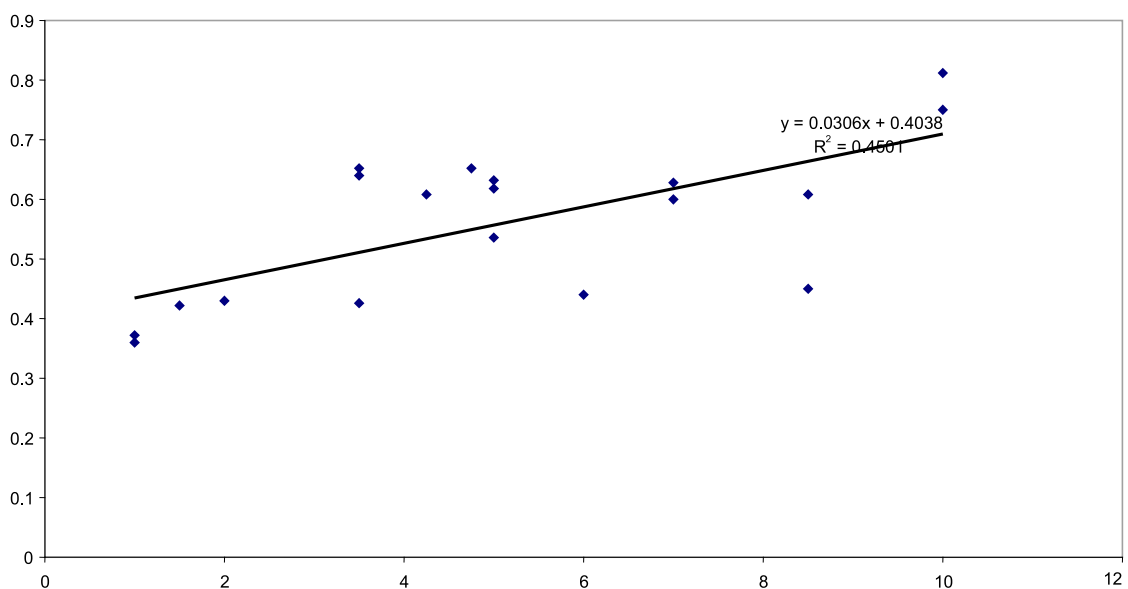


Рис. 2. Корреляция содержания металлотioniонин и олигопептидов в плазме крови спортсменов первого разряда и кандидатов в мастера спорта. По оси абсцисс – концентрация металлотioniонин в плазме крови (нг/мл), по оси ординат – концентрация олигопептидов (г/л). $R = 0,67$ $P < 0,01$

Следует отметить, что для представителей всех трех групп спортсменов выявлены значительные индивидуальные колебания количества как олигопептидов, так и металлотиионеинов. Очевидно, трудно было бы ожидать, что уровень металлотиионеинов будет прямо влиять на содержание олигопептидов в плазме крови, учитывая их количественное соотношение.

Однако известно, что физическая нагрузка большой интенсивности как стрессующий фактор может приводить и к повышению уровня металлотиионеинов и к сдвигу параметров эндогенной интоксикации. В связи с этим возникает вопрос о возможной корреляции между изменениями в содержании металлотиионеинов и олигопептидов плазмы крови.

Действительно, проведение сравнительного анализа показало наличие значимой положительной корреляции с $P < 0,01$ между индивидуальными уровнями металлотиионеинов и олигопептидов, определенными в плазме крови спортсменов (рис. 1–2). Эти результаты поддерживают гипотезу о том, что металлотиионеины, как стрессорные белки, могут вносить определенный вклад в олигопептидный баланс.

Следует подчеркнуть, что полученные в работе данные по определению уровня металлотиионеинов и олигопептидов в плазме крови спортсменов свидетельствуют об отсутствии реального риска срыва адаптации в условиях данных тренировочных режимов для всех 3 групп спортсменов. Вместе с тем выявленные различия в количестве металлотиионеинов в плазме крови спортсменов находятся в соответствии с полученными в условиях эксперимента на животных данными об изменении уровня этих белков в зависимости от степени тренированности. Дальнейшие исследования могут расширить наши представления о том, в какой степени актуален вопрос о роли металлотиионеинов как маркеров тренированности к физической нагрузке [10].

Выводы

1. В плазме крови спортсменов квалификации I разряд, КМС и МС уровень металлотиионеинов достоверно снижен по сравнению с зарегистрированным у спортсменов более низкой квалификации.

2. Количество олигопептидов в плазме крови спортсменов разных групп не имеет достоверных различий.

3. Отмечена положительная корреляция между индивидуальными значениями ме-

таллотиионеинов и олигопептидов, определенными в плазме крови спортсменов.

Список литературы

1. Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Pantoli L. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. // *Cell Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 46. – P. 407–417.
2. McCluggage W.G., Strand K., Abdulkadir A. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer and cancer chemotherapy. // *Int. J. Gynec. Cancer.* – 2002. – Vol. 121. – P. 62–65.
3. Sandeep K. Shama, Goloubinoff R., Christen P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. // *Biochemical and biophysical research communication.* – 2008. – Vol. 372. – P. 341–345.
4. Feder M.S., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response. // *Ann. Rev. Physiol.* – 1999. – Vol. 61. – P. 243–282.
5. Fink A.L. Chaperone-mediated protein folding. // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79. – P. 425–449.
6. Малахова М.Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации. Пособие для врачей. СПб. Издательство МАПО, 1995-2.
7. Елаева Н.Л., Иваненко А.А., Великова В.Д., Кашуро В.А., Малов А.М., Соколян Н.А. Сравнительный анализ концентрации металлотиионеинов в плазме крови людей при использовании двух разных методов определения. // *Токсикологический вестник.* – 2013. – № 4. – С. 12–15.
8. Roshan D., Jolazadeh T., Hosseinzadeh M., Myers J. Effect of acute and chronic exercise on cardiac metallothionein in rat. // *Gaz. Med. Ital. Arch. Sci. Med.* – 2012. – Vol. 171. – P. 693–701.
9. Стаценко Е.А., Ковкова А.В., Нехай Е.В. Разработка нового маркера тренированности у спортсменов. // *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры.* – 2012. – № 3. – С. 42–45.
10. Wochynski Z., Sobiech K.A., Milnerowicz H., Novak P. Can metallothionein be considered a diagnostic marker in physical exercise? // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2003. – № 5. – P. 641–645.

References

1. Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Pantoli L. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. // *Cell Mol. Biol.* 2000. Vol. 46. pp. 407–417.
2. McCluggage W.G., Strand K., Abdulkadir A. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer and cancer chemotherapy. // *Int. J. Gynec. Cancer.* 2002. Vol. 121. pp. 62–65.
3. Sandeep K. Shama, Goloubinoff R., Christen P. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. // *Biochemical and biophysical research communication.* 2008. Vol. 372. pp. 341–345.
4. Feder M.S., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response. // *Ann. Rev. Physiol.* 1999. Vol. 61. pp. 243–282.
5. Fink A.L. Chaperone-mediated protein folding. // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79. pp. 425–449.
6. Malahova M.Ja. Metod registracii jendogennoj intoksikacii. Posobie dlja vrachej. SPB. Izdatel'stvo MAPO, 1995-2.
7. Elaeva N.L., Ivanenko A.A., Velikova V.D., Kashuro V.A., Malov A.M., Sokoljan N.A. Sravnitel'nyj analiz koncentracii metallothioneinov v plazme krvi ljudej pri ispol'zovanii dvuh raznyh metodov opredelenija. // *Toksikologicheskij vestnik.* 2013. no. 4. pp. 12–15.
8. Roshan D., Jolazadeh T., Hosseinzadeh M., Myers J. Effect of acute and chronic exercise on cardiac metallothionein in rat. // *Gaz. Med. Ital. Arch. Sci. Med.* 2012. Vol. 171. pp. 693–701.
9. Stacenko E., A. Kovkova A.V., Nehaj E.V. Razrabotka novogo markera trenirovannosti u sportsmenov. // *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury.* 2012. no. 3. pp. 42–45.
10. Wochynski Z., Sobiech K.A., Milnerowicz H., Novak P. Can metallothionein be considered a diagnostic marker in physical exercise? // *Adv. Clin. Exp. Med.* 2003. no. 5. pp. 641–645.