

**Методические рекомендации по по применению протеомных
технологий для выявления особенностей адаптации организма спортсменов
к физическим нагрузкам**

Москва 2013

СОДЕРЖАНИЕ

| | Стр. |
|--|------|
| Введение..... | 3 |
| 1. Протеомные технологии в биомедицинских исследованиях..... | 5 |
| 2. Методы оценки уровня белков и пептидов в крови и скелетных мышцах спортсменов..... | 9 |
| 3. Основные белки, уровень которых изменяется под влиянием тренировок на выносливость либо силовых упражнений..... | 23 |
| Заключение..... | 31 |

Введение

В последние годы для поиска новых маркеров для анализа изменений функционального состояния организма человека все чаще используют постгеномные методы анализа, среди которых протеомные технологии занимают ведущие позиции. Одним из подходов контроля организма спортсмена, подвергающейся интенсивным физическим нагрузкам, является оценка комплекса белков и пептидов, отвечающих за реализацию той или иной физиологической функции, находящихся в кровяном русле, в ходе физической нагрузки и при выходе из нее (периоде восстановления) и в сравнении с профилем человека, не занимающегося спортом.

Выявление различий в величине экспрессии белков при исследовании различных образцов в динамике, на различных тренировочных этапах микро и мезоциклов, при восстановительных мероприятиях и т.д, позволяют анализировать отдельные клеточные функции и сигнальные пути, вовлеченные в адаптационные процессы к физическим нагрузкам, а также, в ряде случаев, информация подобного рода позволяет обнаружить потенциальные биологические маркеры различных патологий и более полно описать процессы, происходящие в организме спортсмена на молекулярном уровне.

Протеомный анализ позволяет также решать такие частные задачи, как выявление реакции организма на физические нагрузки, оценка уровня тренированности, адекватности применения фармакологических и других восстанавливающих средств, роли энергетических метаболических систем в мышечной деятельности, воздействия климатических факторов и др.

Таким образом, разработка методических рекомендаций по применению протеомных технологий для выявления особенностей адаптации организма спортсменов к физическим нагрузкам позволит существенно повысить эффективность подготовки спортсменов.

1. Протеомные технологии в биомедицинских исследованиях

Среди постгеномных наук протеомика занимает особое место, поскольку эта дисциплина в основном имеет дело с инвентаризацией и идентификацией участников конечной стадии передачи информации в клетке - белками и пептидами. Несмотря на последние достижения в идентификации белков и пептидов *de novo*, основой протеогеномной инвентаризации являются аннотированные геномы и продукты трипсинолиза белков, полученные *in vitro*. За пятнадцать лет существования термина "протеомика" достигнут значительный прогресс как в самих технологиях идентификации белков, их количественного определения, методов стандартизации протеомных исследований, так и в геномных технологиях, которые, без сомнения, служат основой для развития протеомики и пептидомики.

Протеомные технологии используются повсеместно: в спортивной медицине, сельскохозяйственной и промышленной биотехнологии, клеточной инженерии, криминалистике, микробиологии, палеонтологии и других областях естествознания. В последнее время биомедицинские исследования устойчиво вышли на первое место по числу публикаций и объемам финансирования в развитых странах мира. В каком-то смысле протеомика человека, поиск новых белковых и пептидных маркеров различных физиологических состояний спортсменов либо их патологий представляет неотъемлемую часть более общего процесса изучения молекулярных основ спортивной успешности и патогенеза профессиональных заболеваний спортсменов и разработки эффективных методов спортивного отбора, а также коррекции тренировочного процесса и предпатологических состояний. Неудивительно, что с развитием протеомных технологий и так называемых методов "трансляционной медицины" связывают быстрый переход от медицины вообще к персонализации и профилактике для каждого конкретного индивидуума.

Современные технологии биомедицинской протеомики и пептидомики

Пептидомика в ее современном виде, безусловно, является частью протеомики. Поскольку эта дисциплина имеет аналогичную или идентичную методическую базу, ее можно рассматривать как раздел протеомики, анализирующий белки малой массы (<10 кДа), а также весь набор продуктов их протеолитической деградации *in vivo* и *in vitro*. Как и белки, пептиды часто имеют достаточно специфичные функции, являясь гормонами, нейромедиаторами, цитокинами или факторами роста.

Некоторые пептиды, являясь продуктами ферментативной деградации белков в организме, часто служат индикаторами нормальных или патологических процессов, что может быть использовано при выявлении новых маркеров ранних стадий заболевания или медиаторов патологического процесса. В каком-то смысле, современные технологии пептидомики и протеомики направлены на разработку этих новых "полей" с целью нахождения отдельных индикаторных пептидов или белков и их идентификации, а также поиску алгоритмов для выявления и последующего использования эффективных комбинаций различных маркеров белково-пептидной природы для диагностики. В основном пептиды могут возникать следующими способами: деградацией белков протеолитическими ферментами внутри- и внеклеточной локализации, а также расщеплением препробелков и непосредственным синтезом.

Биоактивные пептиды играют ключевую роль как медиаторы трансдукции сигнала в респираторной, сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной и иммунной системах. Идентификация новых биологически активных пептидов происходит постоянно по мере совершенствования методов их анализа.

Фрагменты деградации белков, в том числе "специфических", попадают в различные биологические жидкости организма человека (кровь,

моча, ликвор, лимфа) и являются объектом пристального изучения современной пептидной химии.

Анализ белков и пептидов (top/down-proteomics) условно можно разделить на несколько стадий, каждая из которых имеет ряд существенных ограничений и поэтому часто вызывает трудности при интерпретации результатов. Технологии включают несколько этапов и состоят из сбора материала (часто существенным является источник получения, длительность и условия хранения и многие другие факторы, оговариваемые заранее), пробоподготовки, разделения сложных многокомпонентных смесей, детекции пептидов, их идентификации (структуры пептидов), количественного анализа.

Масс-спектрометрическое профилирование эукариотических клеток и тканей (масс-спектрометрическая визуализация)

На протяжении последних десяти лет исследователи разрабатывали масс-спектрометрические методы, предназначенные для визуализации клеток и тканей организма человека и лабораторных животных. Определенный прогресс в этой области наметился тогда, когда времяпролетные масс-спектрометры стали комплектоваться лазерами с диаметром лазерного пучка менее 50 мкм. В настоящее время эта величина не превышает 10 мкм, что сопоставимо с линейными размерами клетки, прикрепленной на подложке.

Таким образом, имеется возможность получать масс-спектры с единичных клеток или их небольших скоплений при исследовании патологических и нормальных тканей или их фрагментов. Такая технология выглядит многообещающей, поскольку позволяет рассчитывать на снятие ограничения при исследовании ранних стадий развития опухолевого процесса.

Известно, что современные методы микродиссекции могут выделить для анализа несколько тысяч или десятков тысяч клеток, что недостаточно

для применения традиционных методов протеомного анализа. Каприоли и соавт. полагают, что прямая масс-спектрометрическая детекция позволит идентифицировать маркеры непосредственно в клетках-мишенях.

Следует отметить, что методы прямого масс-спектрометрического профилирования клеток и тканей человека и лабораторных животных используются не только в протеомных и пептидомных исследованиях, они также позволяют проводить эффективный мониторинг распределения фармакологических средств в организме человека и животных и получать спектры липидов, изучая изменения липидного профиля клеток в эксперименте или при характеристике патологических процессов.

Протеомный атлас

Одной из альтернатив существующим в настоящее время протеомным и пептидомным технологиям, является наличие международной инициативы по получению высокоспецифичных антител ко всем аннотированным белкам человека, предназначенных для иммуногистохимических, терапевтических и диагностических целей. Эта инициатива получила название *«Протеомный атлас»*. Разработаны и внедрены высокопроизводительные автоматизированные системы клонирования и экспрессии белков и пептидов, получения поликлональных и моноклональных антител, а также методов их тестирования. К настоящему времени получено 8299 антител и рекомбинантных белков, предназначенных для диагностических целей. Как уже упоминалось выше, использование антител в качестве самостоятельного детектирующего агента либо в комбинации с масс-спектрометрическим определением продуктов взаимодействия антиген-антитело позволяет существенно повысить чувствительность протеомных технологий.

Одной из отличительных особенностей проведения биомедицинских исследований с использованием протеомных и пептидомных технологий является их сопряженность с геномными, транскриптомными и

метаболомными методами исследования и использование системную подхода для поиска оптимальных комбинаций биомаркеров.

Такой системный анализ биообразцов налагает особые требования к планированию и выполнению процедур обследования пациентов, их информированного согласия, а также обеспечения качественной процедуры учета и хранения биообразцов, предназначенных для дальнейшего анализа. Указанные требования, безусловно, определяют одно из важнейших отличий современных биомедицинских исследований от ранних аналогов. Необходим адекватный менеджмент таких процедур с обеспечением максимальной активности врачебного и сестринского персонала клиник, адекватной патоморфологической характеристикой биообразцов и диагнозов, а также выбор соответствующих комплексных схем исследования в лаборатории для получения результатов.

2. Методы оценки уровня белков и пептидов в крови и скелетных мышцах спортсменов

Современные технологические подходы для анализа протеомных показателей

Для оценки протеома и метаболома любых биологических образцов необходимы специальные технологические подходы, опыт и знания. В настоящее время разработаны и широко применяется целый ряд количественных методов анализа, с применением масс-спектрометрических подходов, иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга, которые используются для количественного и качественного определения множеств белков в составе сложных смесей (Gerber S.A. et al., 2003; Ong S.E. et al., 2003).

Масс-спектрометрические технологии

В последние годы для поиска в плазме (сыворотке) крови новых маркеров для анализа изменений функционального состояния организма человека все чаще используют постгеномные методы анализа, среди которых масс-спектрометрические технологии занимают ведущие позиции. Универсальность метода позволяет его использовать в научных исследованиях в области спорта высших достижений для оценки специфических и интегральных показателей как биохимического, протеомно-метаболического (особенность метаболизма тканей, функционирования систем организма, контроль применения средств восстановления и запрещенных допинговых препаратов), так и генетического статусов (анализ нуклеиновых кислот, кодирующих геном человека).

По определению, масс-спектрометрия (масс-спектроскопия, масс-спектральный анализ) – это метод анализа вещества путем определения

массы (чаще, отношения массы к заряду m/z) и относительного количества ионов, получаемых при ионизации исследуемого вещества, или уже присутствующих в изучаемой смеси.

Следует отметить, что существующие на сегодняшний день технологические ограничения не позволяют анализировать напрямую такие сложные белковые смеси, каковыми являются, например, протеомы плазмы или сыворотки крови, включающие в себя более 100000 белков с различиями в относительном содержании, перекрывающими диапазон в 10-12 порядков величин (Anderson N.L. & Anderson N.G., 2002). Для решения этой проблемы используются различные методы фракционирования, позволяющие выделять из такой сложной смеси белков и пептидов относительно узкие и воспроизводимые по составу фракции, которые в дальнейшем анализируют масс-спектрометрией.

Основной подход к анализу сложных белковых смесей, используемый в подавляющем большинстве протеомных исследований в настоящее время, это так называемый подход «снизу-вверх» («bottom-up»), суть которого заключается в следующем: белковый препарат предварительно подвергают фракционированию с помощью различных хроматографических или электрофоретических методов, а, затем, полученные отдельные фракции подвергают химическому или ферментативному протеолизу (в подавляющем большинстве случаев в качестве протеолитического агента используется трипсин). Это приводит к образованию сложной по составу пептидной смеси, анализ отдельных компонентов которой позволяет «восстановить», исходя из структуры пептида, те белки, которые изначально присутствовали в исследуемой смеси.

Для этого обычно используют времяпролетную масс-спектрометрию с усиливаемой поверхностью лазерной десорбцией-ионизацией (SELDI-TOF MS, surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry) (Merchant M., Weinberger S.R., 2000). Суть этого метода

заключается в использовании в качестве масс-спектрометрической мишени селективных поверхностей избирательно связывающих наборы белков на основе адсорбционных, электростатических или специфических аффинных взаимодействий. Фракционирование сложных смесей биологических молекул происходит прямо на поверхности масс-спектрометрической мишени, которую после процедуры связывания целевых веществ с поверхностью и отмывки от примесей помещают в масс-спектрометр для анализа. Масс-спектры образцов, полученных в динамике или по сравнению с контрольной группой, сравнивают между собой при помощи специализированного программного обеспечения с привлечением методов математической статистики. В литературе описаны примеры успешного применения этого метода для выявления различий между сывороткой крови пациентов с раком желудка (Su Y. Et al., 2007), прямой кишки (Smith F.M. et al., 2007), простаты (Skytt A. et al., 2007), гепатоклеточной карциномы (Kanmura S. et al., 2007), эндометрия (Zhu L.R. et al., 2006) и других видов онкологических заболеваний (Wang J.X. et al., 2006; Zhang H. et al., 2006) и сывороткой крови здоровых людей.

В последнее время активно используется другой метод выделения из плазмы и сыворотки крови репрезентативных наборов пептидов при помощи высокопроизводительных, легко поддающихся автоматизации способов фракционирования на основе различных вариантов хроматографии с последующей регистрацией выделенных пептидов времяпролетной MALDI масс-спектрометрией (de Noo M.E. et al., 2006; Shin S. et al., 2007). Эта технология обладает рядом преимуществ по отношению к SELDI. Во-первых, фракционирование на модифицированной поверхности масс-спектрометрической мишени SELDI менее чувствительно, чем фракционирование в объеме. Это свойство обусловлено значительно меньшей площадью поверхности плоской масс-спектрометрической мишени для SELDI, на которой происходит разделение (обогащение) образца. Во-

вторых, разрешение и чувствительность масс-спектрометров для SELDI значительно уступают таковым современных MALDI масс-спектрометров, что накладывает дополнительные ограничения на проведение высококачественного и чувствительного масс-спектрометрического анализа. Наконец, специфичность и селективность определения в сыворотке крови маркеров соответствующих заболеваний методом SELDI редко достигают 90% (как правило, эти значения находятся в диапазоне 80-85%) (Skytt A. et al., 2007; Wang J.X. et al., 2006), в то время как при фракционировании сыворотки крови на магнитных микрочастицах или микроколонках эти величины приближаются к 95-97% (de Noo M.E. et al., 2006; Ebert M.P. et al., 2006).

Несмотря на успешность применения подобного подхода, до недавнего времени считалось, что именно «сложность» получаемых пептидных смесей не позволяет получить полную информацию о протеоме вследствие значительных различий в концентрационной представленности отдельных белков в сложной смеси, поскольку количество пептидов, а также интенсивность пиков их ионов в суммарном масс-спектре, полученных при протеолитическом расщеплении «мажорных» белков, значительно превосходит количество и интенсивность пиков ионов пептидов, относящихся к «низкопредставленным» белкам исследуемой смеси, определение которых, по этой причине затруднено, а подчас невозможно.

До определенной степени данное ограничение динамического диапазона масс-спектрального оборудования можно устранить, добиваясь лучшего разделения белков и/или пептидов перед масс-спектральным анализом, тем самым «снижая» концентрационный разброс в пределах каждой из исследуемых фракций, однако введение дополнительных стадий фракционирования может приводить к значительным потерям исследуемого материала, а также к известным сложностям, связанным с

воспроизводимостью результатов эксперимента, что особенно важно при количественном анализе.

Таким образом, стандартный подход, используемый при анализе, заключается в попытке проанализировать с помощью тандемной масс-спектрометрии всех пептидов, полученных при протеолизе исследуемого препарата. Альтернативной стратегией уменьшения сложности смеси является выявление одного или нескольких уникальных («протеотипических») пептидов, которые позволяют однозначно идентифицировать белок, из которого они происходят.

Различают несколько вариантов количественного анализа протеомных данных. Так, в методе «анализа без использования специальных меток» («label-free methods») оценивается соотношение интенсивности сигнала иона пептида интереса в масс-спектре между различными анализами. Далее, полученные данные нормализуются и, на их основании делается вывод об относительном количестве белка-интереса в смеси. При использовании методов, использующих различные типы мечения («label-based approaches»), анализируемые белки инкубируют с изотопными метками, которые позволяют идентифицировать их «происхождение» после протеолиза, далее оба набора смешивают, подвергают протеолизу и анализируют как описано выше (Flory M.R. et al., 2002). Следует отметить, что данный метод также позволяет определять не только относительное, но и абсолютное количество белков интереса, путем внесения радиоактивно-меченых синтетических пептиды из этих белков в качестве внешнего стандарта (Kirkpatrick D.S. et al., 2005).

Каждый из описанных здесь подходов количественной протеомики имеет свои преимущества и недостатки: так, использование радиоактивных меток позволяет определять абсолютную концентрацию белков, и не требует нормализации данных, однако здесь имеются ограничения связанные с

достоверностью определения белков (часто для модификаций используются редко встречающихся в белках аминокислоты, например Cys), что приводит к тому, что белок в эксперименте определяется по единственному пептиду, а это, как известно, не может являться достоверным определением (для достоверного определения белка, необходимо, чтобы было определено два и более пептида, входящие в состав его последовательности). «Безметочная» количественная протеомика лишена этого недостатка, однако с ее помощью невозможно абсолютное определение концентрации белка.

Также хочется отметить, что метод анализа свободных жирных кислот несет свои ограничения, сама оценка проводится методом газо-жидкостной хроматографии и биологический материал после забора должен доставляться в течение 2-х часов в лабораторию для анализа. Так как спектр свободных жирных кислот нестабилен и подвержен быстрому разрушению.

Основное достоинство технологий, основанных на масс-спектрометрии, - универсальность, но в современной лабораторной диагностике наряду с данными методами для определения одних и тех же анализов используются другие конкурентно способные технологии. В зависимости от клинической задачи, материальных возможностей и возможностей персонала, выбор может быть остановлен на других биотехнологических подходах, таких как иммуноферментный анализ и иммуноблотинг.

Одним из подходов контроля биологической системы (организма спортсмена), подвергающейся интенсивным физическим нагрузкам, является оценка протеомного профиля: всего комплекса белков и пептидов, находящихся в кровяном русле, в ходе физической нагрузки и при выходе из нее (периоде восстановления) и в сравнении с профилем неспортивного человека. Выявление различий в величине экспрессии белков при исследовании различных образцов в динамике, на различных тренировочных этапах микро и мезоциклов, при восстановительных мероприятиях и т.д.,

позволяют анализировать отдельные клеточные функции и метаболические пути, вовлекающиеся в адаптационные процессы к изнурительным нагрузкам (Wright M.E. et al., 2003; Durr E. et al., 2004), а также, в ряде случаев, информация подобного рода позволяет обнаружить потенциальные биологические маркеры различных патологий и более полно описать процессы, происходящие в организме спортсмена на молекулярном уровне. В настоящее время разработано и используется в практике исследовательских работ несколько подходов определения всего комплекса белков в составе таких сложных биологических жидкостей, как плазма крови.

Выбор оптимального клинического материала для исследования протеома

Большая часть исследований протеомики с использованием клинического материала в качестве образцов исследовала плазму или сыворотку крови. Доступность образцов крови для различных анализов делает использование плазмы и сыворотки идеальными кандидатами для идентификации биомаркеров в клинических исследованиях. Другие биологические жидкости, такие как спинномозговая или синовиальная, и тканевые биоптаты (в отношении исследований функциональных особенностей мышечных тканей имеют наибольшую ценность) могут содержать другие белки, и в некоторых аспектах изучения более показательные, но процедура забора несет большие ограничения: более инвазивная и нуждается в участии профессионального врача. Надо отметить, что динамика разброса белков от разных заборов может колебаться в 9 раз, когда как клеточные белки (тканевые биопсии) имеют разброс всего в 5-6 раз.

С другой стороны, плазма может сама содержать тканевые белки, которые могут высвободиться в кровоток вследствие тканевого повреждения.

Биологический материал моча, наименее инвазивный, но и наименее показательный. Изучение метаболитов в моче дает очень слабый выход, все показатели не новые, стандартно изучаемые в рамках углубленного медицинского обследования (УМО), максимум предложен в таблице 1.

Таблица 1. Метаболические изменения в моче после физических нагрузок (по Enea et al., 2010)

| Metabolites | $\delta^1\text{H}$ (ppm) and multiplicity | Excretion ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) | | | | Main statistical effects | | |
|--------------|---|---|-------------|------------|-------------|--------------------------|-----------|-------------|
| | | Untrained | | Trained | | Exercise | Group | Interaction |
| | | Before | 30min after | Before | 30min after | | | |
| Lactate | 1.33 (d) | 0.44±0.05 | 122.1±13.87 | 0.48±0.07 | 77.41±20.08 | ↑ $p<0.003$ | | |
| Alanine | 1.48 (d) | 0.31±0.05 | 0.86±0.11 | 0.36±0.08 | 0.92±0.20 | ↑ $p<0.002$ | | |
| Acetate | 1.93 (s) | 0.11±0.02 | 0.67±0.17 | 0.20±0.04 | 0.40±0.07 | ↑ $p<0.0003$ | | $p<0.05$ |
| Acetoacetate | 2.34 (s) | 0.30±0.07 | 0.29±0.06 | 0.43±0.12 | 0.36±0.07 | | | |
| Pyruvate | 2.37 (s) | 0.07±0.01 | 0.54±0.12 | 0.09±0.01 | 0.56±0.30 | ↑ $p<0.03$ | | |
| Succinate | 2.39 (s) | 0.09±0.02 | 0.54±0.22 | 0.10±0.01 | 0.46±0.15 | ↑ $p<0.01$ | | |
| Creatinine | 3.05 (s) | 9.27±1.15 | 9.79±0.82 | 13.00±1.11 | 13.59±1.65 | | $p<0.008$ | |
| Malonate | 3.11 (s) | 0.64±0.13 | 1.50±0.74 | 0.82±0.30 | 0.96±0.44 | | | |
| TMAO | 3.20 (s) | 0.68±0.18 | 0.66±0.15 | 0.70±0.19 | 0.53±0.10 | | | |
| Hipurate | 7.56 (t) | 1.74±0.38 | 1.24±0.24 | 2.34±0.55 | 2.02±0.44 | | | |
| Hypoxanthine | 8.20 (d) | 0.06±0.01 | 2.86±0.44 | 0.10±0.02 | 2.28±0.71 | ↑ $p<0.0002$ | | |

The data were adjusted for diuresis and are expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$
s singlet, *d* doublet, *t* triplet, ↑ significant increase

Успехи молекулярной биомедицины, несмотря на индустриальный прорыв, все еще сдерживаются рамками технологических ограничений, на текущий момент анализ плазмы при этом имеет ряд ограничений.

Первое, невозможен прямой информативный анализ таких сложных белковых смесей, каковыми являются, например, протеомы плазмы или сыворотки крови. Поэтому, сегодня на первое место, выходят исследования пептидов и низкомолекулярных белков в диагностических биосредах, как маркеров функциональных отклонений биологических систем.

Второе, присутствие в плазме альбумина в высоких концентрациях, несомненно, маскирует изменения паттерна других белков, присутствующих в малых количествах.

Этот лимит относится к тотальному количеству белка, который может быть задействован в анализе (не менее фемтограмма на микрограмм альбумина). Белки низких концентраций часто могут находиться за уровнем чувствительности для протеиновой детекции стандартными технологиями, когда альбумин и иммуноглобулины составляют 60-90% всех белков плазмы. Удаление альбумина в настоящий момент стало рутинной задачей, и позволяет увеличить детекционную чувствительность белков низких концентраций. Селективное истощение может сильно усилить визуализацию белков с молекулярными параметрами (pI, mass) сходными с удаленными протеинами. Технологии для удаления альбумина часто базируются на свойствах белков на специфическом связывании с красителями или на более специфическом связывании с антителами. Но применение таких методик должно быть обдуманным, так как такое истощение плазмы для альбумина или иммуноглобулинов может привести к истощению других белков, особенно тех, в которых присутствуют конформационные изменения.

Несмотря на перечисленные ограничения, плазма, в настоящее время занимает лидирующее место среди биологических жидкостей для исследований в области протеомных и метаболомных показателей.

Особенности пробоподготовки биологического материала спортсменов для исследований метаболомных и протеомных показателей

Для проведения комплексной оценки индивидуальных метаболомных, протеомных и генетических параметров, с целью разработки алгоритма оптимизации тренировочных процессов, направленной на повышение спортивной успешности, у спортсменов необходимо производить забор трех

биологических материалов: кровь, плазма, сыворотка в нескольких точках (на фоне тренировочного процесса).

Существует несколько комбинаций оптимальных точек для забора материала (в зависимости от изучаемых параметров), представленных в трех предложенных ниже схемах:

I схема, используется при оценке восстановительных способностей организма спортсмена при выходе из тренировочного процесса

Производится анализ динамики процессов в организме во время физической нагрузки и после ее выполнения, характер нагрузок рекомендуется циклический, умеренный (одинаковый у всех обследуемых спортсменов).

Три точки забора материала на фоне одного тренировочного процесса:

- 1 – перед тренировкой (исходное состояние);
- 2 – сразу после выполнения нагрузки (через 20 минут после окончания физических упражнений);
- 3 – состояние после нагрузки, через 2-4 часа после окончания физических упражнений

II схема, направлена на оценку функционального состояния спортсмена на фоне тренировочного цикла, во время всего тренировочного цикла рекомендуется одинаковый характер нагрузок.

Три точки забора материала от одного спортсмена в одинаковый промежуток времени после окончания тренировки (не менее 20 минут и не более 2-х часов после окончания) в разные дни тренировочного процесса, но через одинаковые суточные интервалы для всех спортсменов (забор три дня подряд, или через два на третий, или по любой удобной для Вас схеме, но одинаковой для всех).

III схема, реализуется при оценке функционального состояния спортсмена при разных физических нагрузках, тренировочный цикл с различной мощностью и продолжительностью физических нагрузок.

Три точки забора материала от одного спортсмена в одинаковый промежуток времени после окончания тренировки (не менее 20 минут и не более 2-х часов после окончания) в разные дни тренировочного процесса после различных по мощности и продолжительности физических нагрузках: умеренная, максимальная, субмаксимальная, или различные нагрузки не по мощности а по характеру выполнения упражнений (первый день плавание одним стилем, второй – другим, третий – комбинирование стилей, также могут варьировать дистанции), но для всех спортсменов схема нагрузок должна быть стандартна, как и должен быть стандартен суточный интервал забора материала.

Обследование спортсменов сборных команд Российской Федерации и их ближайшего резерва в рамках УМО должно проводиться в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (2003), все спортсмены, участвующие в исследовании, должны быть проинформированы и подписать информированное добровольное согласие на проведение исследования.

Забор материала

Исходным материалом для получения необходимых биологических образцов (кровь, плазма, сыворотка) традиционно является венозная периферическая кровь. Следует соблюдать следующие условия подготовки пациентов: пациент во время взятия сидит; курение, прием алкоголя и пищи непосредственно перед исследованием исключаются.

Взятие венозной крови у спортсменов во всех точках должно проводиться однотипно, наиболее оптимально произвести забор одинаково у всех обследуемых через одинаковый интервал после окончания физических нагрузок.

Основной способ взятия венозной крови для лабораторного исследования – пунктирование вены. Венозную кровь, как правило, забирают из локтевой вены. В случае необходимости ее можно получить из любой вены (запястья, тыла ладони, над большим пальцем и т.д.). При взятии крови из вены необходимо избегать: мест шрамов, гематом; вен, используемых для переливания растворов; ножных вен. При венепункции оптимально производить забор крови самотеком (что обеспечивает максимальную сохранность биологического материала) с использованием широкополосного жгута в одноразовые пластиковые системы (вакутейнеры), состоящие из контейнера с навинчивающейся на него одноразовой иглой и пробирки с плотно прилегающей пробкой, раствором антикоагулянта (или активатора свертывания) и вакуумом внутри.

Для получения биологических образцов: плазмы рекомендуется использовать 10 мл вакутейнеры, содержащие в качестве антикоагулянта 0,5М ЭДТА, рН 8,0 (Пробирка Вакуэт с ЭДТА (сиреневая крышка)), для сыворотки – 10 мл вакутейнеры с активатором свертывания крови и олефиновым гелем. Всего от одного спортсмена в каждой из точек - один вакутейнер с ЭДТА и один для получения сыворотки.

Содержимое пробирок с ЭДТА (венозная кровь с антикоагулянтом) необходимо тщательно, но аккуратно, не взбалтывая перемешать (образующаяся пена, влияет на качество исследования). Для этого пробирка с забранным материалом берется в правую руку и плавными качательными движениями справа налево в течение 1 минуты перемешивается. Далее, одна из пробирок с ЭДТА сразу же является образцом крови, для получения плазмы вторую пробирку с ЭДТА необходимо центрифугировать 10 минут с ускорением 1500 G (примерно 3000 об/мин) и перенести плазму в чистую сухую пробирку. Плазму необходимо отделить от клеток крови в течение 2 часов после забора.

Для получения максимально чистой сыворотки рекомендуется соблюдение трех условий:

1. После забора крови необходимо осторожно **однократно** перевернуть пробирку для более полного контакта крови с активатором свертывания;
2. Дождаться завершения процесса свертывания крови в течение 10-30 минут в соответствии с инструкцией для пробирок при комнатной температуре и вертикальном положении пробирки.
3. Центрифугировать пробирку со свернувшейся кровью не менее 10 минут с ускорением 1500 G (примерно 3000 об/мин) для максимального выдавливания сыворотки из сгустка.

Для лучшего очищения сыворотки и более полного разграничения сыворотки и сгустка применяются специальные пробирки, содержащие биологически инертный олефиновый гель. Последний представляет собой тиксотропный кополимер, изменяющий свою вязкость в зависимости от приложенной к нему силы центрифугирования, поэтому после центрифугирования гель в виде тонкой полоски занимает промежуточное положение и служит разделительным барьером. Стабильность такого барьера гарантирована в течение 5-7 дней при хранении пробирки с кровью при комнатной температуре, поэтому отбор сыворотки в чистую пробирку из таких вакутейнеров не обязателен, но желателен из-за длительной транспортировки.

Пробирки с материалом необходимо маркировать (индивидуальный номер спортсмена, которому он будет соответствовать по базе данных, точка забора, дата забора, наименование биологического образца (плазму и сыворотку отобранные в чистые пробирки очень легко между собой перепутать). Этикетку необходимо либо наносить перманентным маркером, либо сверху заклеить прозрачным скотчем (это поможет сохранить надпись при транспортировке, хранении, заморозке/разморозке материала).

Условия транспортировки биологических образцов

Правильно собранный биологический материал должен быть своевременно доставлен в лабораторию. Оптимальные сроки сохранности биологических образцов крови, забранных и подготовленных описанным выше методом, составляет при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ - $+8^{\circ}\text{C}$ – 24 часа, *замораживание материала не допускается!* Сразу после забора биологические образцы хранятся в холодильнике (при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ ÷ $+6^{\circ}\text{C}$) и далее в специальных транспортных контейнерах в ледяной бане доставляются в лабораторию.

Во время транспортировки пробирки и контейнеры с кровью должны быть соответствующим образом защищены от вредного воздействия окружающей среды и погодных условий. При транспортировке биологических материалов должны строго соблюдаться правила техники безопасности, асептики и антисептики.

3. Основные белки, уровень которых изменяется под влиянием тренировок на выносливость либо силовых упражнений

Скелетные мышцы человека обладают высокой степенью пластичности в условиях стрессов различного характера (Booth et al., 2002; Hawley, 2002; Fluck and Hoppeler, 2003; Arkinstall et al., 2004; Zierath and Hawley, 2004). Пластичность мышечной ткани может выражаться в разной степени. Так, при воздействии длительных физических нагрузок у спортсменов, либо при регенерации поврежденных мышечных структур после травмы, в скелетных мышцах происходят глобальные перестройки (структурно-функциональное ремоделирование). С другой стороны, для поддержания позы или повседневных действий человека пластические процессы выражены минимально. Существуют и отрицательные пластические процессы, такие как атрофия скелетных мышц, обнаруживаемая с возрастом, при иммобилизации конечности либо при прекращении занятий спортом. Наблюдаемые типы мышечной пластичности контролируются главным образом генетическими факторами, влияние которых обозначается уже на самых ранних этапах эмбриогенеза.

При выполнении физических нагрузок аэробного, анаэробного или смешанного характера, при иммобилизации конечности, в состоянии детренировки, а также в условиях невесомости результирующие изменения в мышечных волокнах должны включать увеличение или уменьшение образования белков. В свою очередь, изменения количества и состава белков вызваны преобразованиями, происходящими на уровне ДНК и РНК мышечных волокон. Благодаря последним достижениям в области молекулярной биологии, сегодня стало возможным понять, каким образом и в какой степени в мышечных волокнах происходит генная экспрессия, лежащая в основе пластичности скелетных мышц.

К основным стрессорным факторам, модифицирующим экспрессию генов скелетных мышц и рядом расположенных структур (сателлитные клетки, эндотелий сосудов), и, соответственно, влияющим на пластичность скелетных мышц, следует отнести: 1) механическую нагрузку; 2) гормональные перестройки; 3) нейрональную активацию и 4) метаболические изменения.

Влияние *механической нагрузки* (растяжение мышечных волокон) на нервно-мышечный аппарат (по схеме: растяжение → выделение растворимых факторов из мышечного волокна или внеклеточного матрикса → активация системы вторичных мессенджеров в волокне → индукция «наиболее ранних генов» → транскрипция мышечных генов → гипертрофия мышечных волокон) опосредуется главным образом через интегрины и сигнальные пути, связанные с ними. Интегрины представляют собой белки, объединяющие внеклеточный матрикс с цитоскелетом. Растяжение мышечного волокна посредством интегринов запускает каскадную реакцию в сигнальных путях JNK–AP1 (Jun N-терминальная киназа – белок активатор 1) и mTOR–S6K (мишень рапамицина млекопитающих – S6 рибосомальная киназа), что приводит к активации «наиболее ранних генов», таких как, например, c-jun и c-fos (Sadoshima and Izumo, 1993). Эти гены, в свою очередь, контролируют транскрипцию мышечных генов в ядре (гены «мышечной гипертрофии» и мышечных ферментов, регуляторные гены, а также гены, кодирующие специальные белки, необходимые для трансформации мышечных волокон (например, миозины тяжелой и легкой цепей, тропонины и другие Ca^{2+} -связывающие белки)) (McComas, 1996).

Гормональные перестройки в скелетных мышцах могут происходить практически при любых типах мышечных нагрузок. Андрогены (тестостерон), гормон роста, инсулиноподобный фактор роста (ИФР1; IGF1), его сплайсированные формы, инсулин и витамин Д положительно влияют на рост и объем скелетных мышц (через специфические рецепторы запускается

экспрессия ряда генов), преимущественно за счет активации мышечных сателлитных клеток, в то время как миостатин, интерлейкины-1 и -6 (IL-1, IL-6), глюкокортикоиды, а также фактор роста опухолей (tumor necrosis factor; TNF) относятся к отрицательным регуляторам мышечной массы и сателлитных клеток (Hoppeler et al., 2007). Механизмы, запускающие атрофические процессы в мышцах связаны с убиквитин-опосредованной деградацией белков. При атрофии, например, было установлено увеличение экспрессии двух убиквитин-лигаз - MURF-1 и атрогина-1 (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001).

Нейронная активация является необходимым условием для осуществления нормального мышечного сокращения. Как известно, в процессе сокращения мышечного волокна в нем происходят следующие преобразования: генерация потенциала действия (ПД) → распространение ПД по Т-системе → электрическая стимуляция зоны контакта Т-системы и саркоплазматического ретикулума, активация ферментов, образование инозитолтрифосфата, повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Далее ионы Ca^{2+} взаимодействуют с тропонином, что приводит к освобождению активных центров на актиновых филаментах, взаимодействию миозиновой головки с актином, вращению головки и развитию эластической тяги. Сам процесс сокращения заключается в скольжении нитей актина и миозина относительно друг друга, уменьшении размера саркомера, развитии напряжения или укорочение мышечного волокна.

С адаптационной точки зрения, флюктуации внутриклеточного кальция приводят к активации Ca^{2+} /CaMK (кальмодулин-зависимые киназы) и CN-NFAT (кальциневрин и ядерный фактор Т-активированных клеток) сигнальных путей. В частности, CaMKII влияет на экспрессию генов, вовлеченных в митохондриальный биогенез, окислительное фосфорилирование, а также экспрессию специфических миофибриллярных

белков (Chin, 2004), в то время как кальциневрин активирует NFAT белки, что приводит к их транслокации в ядро и запуску экспрессии генов, ответственных за сокращение мышечных волокон (тропонин, тяжелые цепи миозина) и гипертрофию скелетных мышц (и миокарда) (Chin et al., 1998; Molkentin et al., 1998; Hogan et al., 2003).

Метаболические изменения возникают в ответ на сдвиги в энергетическом балансе скелетных мышц и миокарда, их pH, температуре и кислородном напряжении. Центральная роль в чувствительности мышечной ткани к таким изменениям отведена АМФ-активированной киназе (АМПК), сиртуину (SIRT1), ядерным рецепторам, активированным пролифераторами пероксисом (PPAR), коактиваторам PPAR γ (PPARGC1A и PPARGC1B) и фактору, индуцируемому гипоксией (HIF) (Gilde and Van Bilsen, 2003; Reznick et al., 2006; Winder et al., 2006; Mason and Johnson, 2007; Muoio and Koves, 2007; Cantó et al., 2009).

Экспрессия белков в скелетных мышцах в зависимости от вида физической нагрузки. Тренировки, направленные на развитие выносливости либо скоростно-силовых качеств, представляют собой разные по стимулам внешние воздействия, которые приводят к специфическим структурным и метаболическим сдвигам в скелетных мышцах. Так, при тренировке на выносливость повышается способность мышц к окислению липидов и углеводов, увеличивается содержание миоглобина, гликогена и триглицеридов в мышечных волокнах, увеличиваются размеры и количество митохондрий, количество капилляров, приходящихся на одно мышечное волокно, повышаются способности митохондрий к окислительному ресинтезу АТФ, увеличивается использование липидов как энергетического топлива, происходит избирательная гипертрофия медленных мышечных волокон, а также незначительная трансформация быстрых мышечных волокон в медленные; в итоге повышаются аэробные возможности

организма. С другой стороны, тренировочные занятия, направленные на развитие силы, мощности или скорости, оказывают незначительное влияние на аэробные возможности. Адаптация к спринтерской и силовой тренировке происходит за счет значительного увеличения площади анатомического поперечника скелетных мышц, повышения содержания креатинфосфата и гликогена, а также гликолитических способностей, улучшения буферных свойств мышц и снижения митохондриальной плотности, что приводит к повышению силы и способности к выполнению физических упражнений высокой интенсивности (Моган и др., 2001).

Однократная физическая нагрузка приводит к изменению экспрессии сотен генов, и, соответственно, белков, которая приходит к исходному уровню через некоторое время (секунды, минуты, часы) (Pilegaard et al., 2000; Mahoney et al., 2005; Yang et al., 2005; Schmutz et al., 2006). Долговременную адаптацию к тренировкам различной направленности, по-видимому, можно рассматривать как ответ организма на совокупность однократных физических нагрузок, которые приводят к глобальным изменениям в системе регуляции генной экспрессии (Fluck, 2006). В некоторых исследованиях было установлено наличие стойкой экспрессии сотен генов у спортсменов и добровольцев в ответ на длительные физические нагрузки аэробного и анаэробного характера (табл. 2-3) (Roth et al., 2002; Patti et al., 2003; Wittwer et al., 2004; Hittel et al., 2005; Timmons et al., 2005; Stepto et al., 2009).

В таблицах 2-3 обозначены более 250 белков, концентрация которых повышена либо понижена в латеральной головке четырехглавой мышцы бедра квалифицированных спортсменов (стаж занятий более 8 лет), тренирующих качества выносливости (велососсе) и силы (силовое троеборье), в состоянии покоя (не менее 24 часов отдыха после тренировок) по сравнению с контролем (Stepto et al., 2009).

Таблица 2. Белки, концентрация которых повышена у квалифицированных спортсменов, тренирующих качества выносливости и силы, в состоянии покоя по сравнению с контролем (по: Stepto et al., 2009).

| Функциональная группа | Символы белков |
|---|--|
| Структура, развитие и сокращение скелетных мышц | CHI3L1, CLEC3B, COL11A2, KCNMB3, LMO7, MRCL3 (B) , PEX12, PPP1R12A, PRKG1, SPRR1A, SSPN, UTRN (C) |
| Энергетический метаболизм | ALOX15B, ARSF, AMY1A, ARPP-19, BPGM, CBR3, CYP3A7, CYP4B1, DLAT, GALE, GOT1 (B) , LDHB (B) , ME1, SGPL1 |
| Митохондриальные белки | ACSL6, ATP5F1 (B) , BCKDHB, FXN, MDH1 (B) , MTCP1, MTRR, MTX1, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB8, SDHB, UQCRB |
| Иммунный ответ | APLN, ATP6V0A2, CCL22, CCL26, CCRL1, CD1A, CD8A, CSF2RA, GPX3, PF4, TGFBI (B) |
| Метаболизм белков | AIP (C) , APBA3, GZMM, KLK11, MSRA, PALM2-AKAP2, PTS, SERPINB8, SOLH, SULT1C1, SURF5, MAG, UCHL3 (C) |
| Клеточный цикл и пролиферация | CDC2L2, CDK2, DNAJA2, ENPEP, ESM1, NEK1, PDCD5, PMS2, RARRES1, S100A2, TGFBR2, WDR45 |
| Транспортные белки | CLTB (B) , CNGB1, NBEA, NUP155, SCFD1, SLC15A3, SLC16A7 (B) , SLC4A7, SLC6A12 |
| Ангиогенез | EPAS1 (B) , FIGF, FLT4, SH2D2A |
| Сигнальная трансдукция | ARHGAP6 (C) , CALCR (C) , FSTL3, GPR34, GRB7, HMHA1, HUNK, ITSN2, LIFR, NRAS, P2RY5, PLA2R1, PLEKHG6, PRR5, PTPN4, PTPO, PTPRE, RAB33A, RAPGEF5, SOS2, STAC, TEK |
| Транскрипция и трансляция | APOBEC1, ATF1, EIF3S1 (C) , HOXD8, KCNIP3, KRR1, LDB2, LMO4 (C) , NRF1, PER3, PMS2L1, REV1L, ROD1, RORA, SIRT6 (C) , SKIV2L2, SOX12, TCF21, TCF4, TRPS1, ZNF187 |
| Развитие и функции | AGRIN, EFNB2 (B) , GBX2, NEDD1 (C) , NOVA1, |

| | |
|---|---|
| нейронов | PCDH12, SYP |
| Другие функции (некоторые не определены) | ARMCX1, ASMTL, BEST1, CAST, CCDC19, CCDC95, CYB5D2, JPH3, REEP2, SCHIP1, SDF4, TBC1D22A, VSIG2, ZDHHC2, LOC651370, LOC90925, FANCF (B) , C12orf32, CDSN (C) |

Примечание: полужирным шрифтом выделены белки, которые в значительной степени экспрессируются у спортсменов, занимающихся шоссейными велогонками (B) или силовым троеборьем (C).

Таблица 3. Белки, концентрация которых понижена у квалифицированных спортсменов, тренирующих качества выносливости и силы, в состоянии покоя по сравнению с контролем (по: Stepto et al., 2009).

| Функциональная группа | Символы белков |
|---|---|
| Структура, развитие и сокращение скелетных мышц | ACHE, CACNA1H, DLK1, KIF2A, KRT31, LCP1, MATN3, MYO10, PLXNA3, TBCC |
| Энергетический метаболизм | CHKA, LCAT |
| Митохондриальные белки | CYP27A1 |
| Иммунный ответ | BMP2, BMP6, CCL4L2, CTSG, IL2RB, PLP2 |
| Метаболизм белков | ACY1, DHFR, PPIF, PSMA5, RPL31, RPL35A, RPL7A, RPS14, RPS7, SEC61G, SLPI, UBE1L, UBE2L3 |
| Клеточный цикл и пролиферация | IL4R, MUTYH, MYC, NUPR1, PAPPА, PCNA, PTMS |
| Транспортные белки | ABCF2, ARF3, CNGB1, KCNN3, KPNA1, NPC1, PITPNA, SCAMP2, SLC9A1, TCOF1, VPS45A |
| Ангиогенез | RNH1 |
| Сигнальная трансдукция | ARHGAP29, CEACAM5, CSNK2A2, GTPBP2, |

| | |
|---|---|
| | ITSN2, LENG4, LHB, LRPAP1, PDPK1, PKN3, PLCB2, PRKCA, RGS4, STAC, YES1 |
| Транскрипция и трансляция | CBFA2T2, CBX5, EMG1, GATA4, GIPC1, GTF2E2, GTF3C2, HIST1H2AM, HIST1H4C, HOXB7, NUDT1, POLE2, PPIH, RAD51AP1, RFC4, RHOT1, SMARCC1, TAF1, ZNF525 |
| Развитие и функции нейронов | NR4A1 |
| Другие функции (некоторые не определены) | ACRV1, DSP, FAM82B, HEMGN, ICAM2, KRT20, PDPN, RABAC1, RDH5, STRA13, TKT, FAM86A, C6orf130 |

В этом исследовании было установлено, что уровень экспрессии белков, ответственных за митохондриальный биогенез, окисление жиров и углеводов, положительно коррелирует с показателями МПК у стайеров, в то время как уровень экспрессии белков мышечных белков коррелирует с показателями силы у троеборцев.

Можно видеть, что между спортсменами противоположных групп имеются различия в экспрессии, по меньшей мере, 20 белков. Очевидно, что картина профиля генной и белковой экспрессии будет меняться в зависимости от времени забора биопробы; можно предположить, что в результате детренировки после продолжительных занятий физическими упражнениями, экспрессия генов и белков в скелетных мышцах спортсменов придет к исходному уровню. Однако, ввиду индивидуальных различий (высокой либо низкой предрасположенности к занятиям видами спорта), исходные уровни генной и белковой экспрессии в скелетных мышцах могут различаться между спортсменами и контрольной группой.

Заключение

Одним из подходов контроля организма спортсмена, подвергающейся интенсивным физическим нагрузкам, является оценка комплекса белков и пептидов, отвечающих за реализацию той или иной физиологической функции, находящихся в кровяном русле, в ходе физической нагрузки и при выходе из нее (периоде восстановления) и в сравнении с профилем человека, не занимающегося спортом.

Выявление различий в величине экспрессии белков при исследовании различных образцов в динамике, на различных тренировочных этапах микро и мезоциклов, при восстановительных мероприятиях и т.д, позволяют анализировать отдельные клеточные функции и сигнальные пути, вовлеченные в адаптационные процессы к физическим нагрузкам, а также, в ряде случаев, информация подобного рода позволяет обнаружить потенциальные биологические маркеры различных патологий и более полно описать процессы, происходящие в организме спортсмена на молекулярном уровне.

Протеомный анализ позволяет также решать такие частные задачи, как выявление реакции организма на физические нагрузки, оценка уровня тренированности, адекватности применения фармакологических и других восстанавливающих средств, роли энергетических метаболических систем в мышечной деятельности, воздействия климатических факторов и др. Таким образом, использование информации о количественных и качественных характеристиках протеома спортсмена позволяет существенно повысить эффективность подготовки и восстановления спортсменов.