

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ В БИОХИМИИ СПОРТА

Д.О. Горлов¹, Н.В. Жужукин¹, И.В. Кузнецов¹, Е.В. Литвинов²

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова» г. Воронеж, Россия

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
технический университет»
г. Воронеж, Россия

Аннотация: Тема, связанная с использованием аналитических возможностей клинической химии в биохимии спорта, является достаточно актуальной, тем что, благодаря ей произошла оптимизация тренировок, а также исследования помогли улучшить слежку за здоровьем спортсменов, что в наше время очень важно. Данная научная статья посвящена исследованию физических, химических принципов анализа биологических жидкостей человека, которые могут значительно расширить методический арсенал биохимии спорта и спортивной фармакологии. Работа содержит обзор литературы биохимии спорта и клинической биохимии, примеры, а также новые возможности в исследовании белков органов и белков мышечной ткани. Результаты исследования показывают оптимизацию тренировок, диагностики состояния спортсменов и предотвращения проблем со здоровьем.

Ключевые слова: аналитические возможности, исследование, здоровье.

PROSPECTS FOR USING THE ANALYTICAL CAPABILITIES OF CLINICAL CHEMISTRY IN SPORTS BIOCHEMISTRY

D.O. Gorlov¹, N.V. Zhuzhukin¹, I.V. Kuznetsov¹, E.V. Litvinov²

¹ Voronezh State University of Forestry and Technologies
named after G.F. Morozov, Voronezh, Russia

² Voronezh State Technical University,
Voronezh, Russia

Abstract: The topic related to the use of the analytical capabilities of clinical chemistry in sports biochemistry is quite relevant, in that thanks to it, training has been optimized, and research has also helped improve monitoring of the health of athletes, which is very important in our time. This scientific article is devoted to the study of the physical and chemical principles of the analysis of human biological fluids, which can significantly expand the methodological arsenal of sports biochemistry and sports pharmacology. The

work contains a review of the literature of sports biochemistry and clinical biochemistry, examples, as well as new opportunities in the study of organ proteins and muscle tissue proteins. Study results show optimization of training, diagnosis of athletes' condition and prevention of health problems.

Keywords: analytical capabilities, research, health.

Биохимия спорта и клиническая биохимия представляют собой родственные научно-практические дисциплины, разделы биохимии человека. Обе дисциплины опираются на информацию о состоянии организма человека, получаемую в результате исследований биологических материалов. Поэтому интересы этих дисциплин в сфере аналитики очень близки. Представляется, что спортивная биохимия, биохимический контроль в спорте могут значительно выиграть, используя те аналитические возможности, которыми располагает клиническая биохимия (раздел прикладной биохимии человека, обеспечивающий клиническую медицину лабораторной диагностической информацией).

В качестве примера таких возможностей клинической биохимии, которые могут представить реальный интерес для биохимии спорта, можно указать на некоторые материалы, представленные на международных форумах по клинической химии, состоявшихся в последние годы (V Международный коллоквиум. Перспективы биологии, 1982; V Европейский конгресс по клинической химии, ВНР, 1983).

Новые возможности в исследовании белков органов, и в частности белков мышечной ткани, предоставляет метод двунаправленного электрофореза, позволяющий разделять и характеризовать тысячи индивидуальных белков [1]. Для идентификации белков необходимо иметь очищенные белки, аналогичные исследуемым; антитела к ним, фиксированные на нитроцеллюлозе; использовать иммуно-преципитацию и метод систематического выделения белков, обладающий высокой разрешающей способностью. Реализация метода требует создания банка поливалентных и моноклональных антител против батареи человеческих белков из различных тканей.

Применение двунаправленного электрофореза для изучения изопротеинов сократительных белков мышц позволяет показать, что соотношение различных видов сократительных белков-миозина, актина, тропонина, тропомиозина индивидуально.

Оно связано и с соотношением быстрых и медленных волокон. Так, в частности, в быстрых и медленных волокнах неодинаковое число тяжелых цепей миозина. При некоторых видах патологии мышц происходят существенные изменения сократительных белков. Стимуляция мышц в течение 1, 4, 6 недель существенно меняет картину сократительных белков.

По-видимому, этот метод в будущем может существенно расширить информацию о белковом составе мышц не только при патологии, но и при оценке различных систем тренировки. Комплекс современных ультраструктурных и биохимических методов позволяет дать характеристику отдельного мышечного волокна, а также распределения и уровня активности саркоплазматических и митохондриальных ферментов. Исследование ферментов мышц может включать ряд этапов: 1) определение активности ферментов; 2) двунаправленное картирование белков и иммунологический их анализ с целью поиска неактивных белков; 3) приготовление активной информационной РНК из мышц с иммунологической характеристикой белка, новообразованного с ее помощью. Этот подход углубляет способы оценки состояния мышечной ткани, возможности ее адекватного развития и контроля за процессами гипертрофии соответствующих мышечных групп [4].

Проблема биохимической оценки состояния соединительной ткани одна из актуальных в биохимии спорта. При современных успехах теории и практики спортивной тренировки может быть очень быстро достигнут тренировочный эффект в развитии мышечной массы. Если при этом прочность соединительнотканых образований не увеличивается, то при резком сокращении мышц возможны растяжения, надрывы и разрывы. С этих позиций поиск биохимических путей оценки состояния соединительной ткани и воздействия на нее приобретает первостепенное значение.

Н. Greiling [7] было показано, что для каждого типа соединительной ткани (хряща, сухожилия и т. д.) характерно специфическое распределение макромолекул коллагена, протеогликанов, структурных гликопротеинов. От состава различных типов коллагена и протеогликанов зависят биомеханические свойства разновидностей соединительной ткани, а также клеточная структура и метаболизм.

Обращается внимание на возрастные изменения хрящей суставов, отличающиеся от их изменений при воспалительных заболеваниях (остеоартрите, ревматоидном артрите). Определение активности фермента эластазы и комплекса этого фермента и его ингибитора в плазме крови и синовиальной жидкости предлагают для дифференциации воспалительных от невоспалительных поражений суставов. Наряду с этим тестом для оценки состояния обмена коллагена рекомендуется исследование активности коллаген-пептидазы и лизилоксидазы в сыворотке крови, содержания продуктов разрушения коллагена проколлагенпептида и оскипролина в сыворотке.

Для определения активности эластазы гранулоцитов человека в комплексе с ингибитором альфапротеиназы может быть применен метод ферментсвязанного иммуноанализа. Изменения активности этого фермента существенны для скорости разрушения эластиновых волокон, от которых зависит эластичность тканей. Физические упражнения помогают поддерживать высокое содержание эластина в тканях.

Важно в том числе и для биохимии спорта, дальнейшее развитие высокопроизводительной жидкостной хроматографии. Использование гранулированной (340 мкм в диаметре) стандартной фазы и микроколонок (0,5-1,0 мкм в диаметре), микрокувет (5 мкм), высокочувствительных ультрафиолетовых, флюоресцентных, масс-спектрометрических детекторов, насосов высокого давления, микролитровых инъекторов, микропроцессоров создало современную технологию этого вида хроматографии, позволяющую проводить исследования широкого спектра веществ в биожидкостях при высокой точности анализа. Среди веществ, определяемых этим методом и представляющих интерес для спортивной биохимии, следует упомянуть катехоламины, аминокислоты, стероиды. Нижний предел чувствительности для аминокислот 400 фемтомолей (на каждую аминокислоту). По-видимому, метод определения катехоламинов, основанный на высокопроизводительной жидкостной хроматографии с амперометрической, кулометрической или флуорометрической детекцией, в ближайшее время заменит считавшийся наиболее чувствительным и специфичным радиоферментный одноизотопный метод [11].

Новая технология рециклирования ферментов при измерении результатов с помощью билюминометрии позволяет при использовании микроколичеств биожидкости определять пикограммы веществ, в том числе андрогенов (тестостерона и андростендиона) и эстрогенов. Не уступая в чувствительности радиоиммуноанализу, новый метод более прост и требует меньше времени.

В перспективе этот принцип приемлем для исследования в биожидкостях веществ, используемых в качестве допинга.

Продолжается развитие методов исследования метаболитов, имеющих важное значение для оценки эффекта физических упражнений. Разработан ферментный метод одновременного определения лактата и пирувата в одной и той же депротенизированной пробе крови на центрифужном биохимическом анализаторе Кобас-Био. Получаемые данные сохраняют линейность до уровня, превышающего верхний предел референтных величин в 8 раз при определении пирувата и в 6 раз лактата. Коэффициент вариации внутри серии 1,7-1,8%; между сериями 3,5-3,9%. Метод относительно прост и удобен для экстренного и рутинного применения [5]. Создание электрода для определения лактата с помощью иммобилизованной лактатоксидазы открывает возможности автоматизации этого анализа, весьма часто применяемого в биохимии спорта.

Привлекает внимание возможность использования нетравматических методов для обследования спортсменов. С этих позиций особенно ценен метод ядерно-магнитного резонанса. Ткань, помещенная в статическое магнитное поле и облученная электромагнитными импульсами, реагирует импульсами этой же частоты, зависящими от плотности протонов. Среди атомов, активных в отношении ядерно-магнитного резонанса, используется и ^{31}P [7]. Спектр изотопа фосфора позволяет получить представление о распределении этого элемента между различными формами органических и неорганических фосфатов. Эта информация важна для наблюдения за динамикой энергетически важных веществ *in vivo*, т. е. в работающей мышце. В частности, можно уловить снижение содержания креатинфосфата, аденозинтрифосфата при нарушении питания мышц.

Результаты недавних исследований ряда спортивных биохимиков [3,6] подтверждают практическую ценность этого метода для изучения обмена соединений фосфата в мышцах рук и ног при выполнении тестовой нагрузки.

Большие возможности для быстрого и достаточно точного биохимического исследования крови человека открывает дальнейшее развитие методов и средств, основанных на реакциях на твердой фазе, в частности диагностических полосок.

Новый вариант этих реакций - ARIS (система иммуноанализа с реактивацией апофермента) позволяет, основываясь на реактивации апофермента глюкозооксидазы с включением дополнительной реакции с пероксидазой, обеспечить определение лекарственного вещества теофиллина, результаты которого хорошо коррелируют ($r=0,983$) с методом высокопроизводительной жидкостной хроматографии. Дальнейшее развитие этого принципа может привести к совершенствованию методов экспресс-определения различных лекарственных средств, в том числе и применяемых в качестве допинга.

Использование пленки из стекловолокна в качестве верхнего разделительного слоя диагностической полоски для отделения клеток крови от плазмы позволит исключить необходимость центрифугирования крови перед количественным исследованием компонентов химического состава крови [10]. Измерительными инструментами для таких диагностических полосок служат отражательные фотометры, в частности «Сералайзер» и «Рефлотрон», позволяющие измерять окраску полоски с помощью интегрирующей сферы при различных длинах волн для анализа разных веществ (глюкозы, гемоглобина, ферментов). Разработка этой технологии для круга компонентов, представляющих интерес в биохимии спорта, может оказать революционизирующее влияние на осуществление биохимического контроля в спорте, упростить его проведение и унифицировать его результаты вне зависимости от условий проведения (тренировка, соревнование и т. п.).

Для спортивной фармакологии перспективно современное развитие лабораторных методов определения лекарств в биожидкостях с помощью гомогенного иммуноферментного анализа (ЕМІТ), для которого разработаны готовые аналитические формы и автоматические устройства. Правда, эта технология в настоящее время ориентирована преимущественно на те лекарства, которые имеют

токсикологическое значение, однако принципиально возможна разработка соответствующих готовых иммуноферментных препаратов, рассчитанных на определение веществ, интересующих спортивных фармакологов [2].

Наряду с классическим гетерогенным (ELYSA) и гомогенным (EMIT) иммуноферментным анализом намечается развитие новых вариантов гомогенного неизотопного иммуноанализа для выявления лекарств в крови. В их числе флюоресцентный поляризационный иммуноанализ, субстрат-меченый флюоресцентный иммуноанализ, иммуноанализ с нефелометрическим торможением. В будущем значение этих разновидностей неизотопного иммуноанализа для рутинных исследований концентрации лекарств в крови [8] ввиду быстроты и простоты их выполнения будет все возрастать. Получило промышленную основу производство моноклональных антител, что очень важно для широкого выпуска готовых аналитических форм, применяемых в иммуноферментном и других вариантах неизотопного иммуноанализа.

Показана возможность применения метода иммуноферментного анализа для исследования природных и синтетических стероидов в плазме и слюне человека [9]. Специфичность и чувствительность метода можно повысить, используя иммуноадсорбцию на твердой фазе. Связывание антисыворотки с твердой фазой может быть ускорено за счет применения твердой фазы с магнитными частицами и простого магнитного устройства. Большая пропускная способность методов в сочетании с чувствительностью порядка 10 пикограмм на пробирку и менее делает его пригодным для клинических и фармако-клинических исследований проб плазмы и слюны. Слюна, содержащая свободные биологически активные фракции природных и синтетических стероидов, является биологической жидкостью, которая может быть получена нетравматическим путем (чтобы собрать 3 мл слюны, достаточно 10 мин). Метод представляется перспективным для биохимии спорта в качестве средства экспресс-определения природных гормонов, регулирующих реакцию организма в ответ на физическое напряжение, и синтетических стероидов.

Таким образом, современная клиническая аналитика, продолжающая бурно развиваться за счет освоения ряда новых физических, химических и биологических принципов анализа, располагает широким кругом эффективных методов

исследования биологических жидкостей человека, которые могут значительно обогатить методический арсенал биохимии спорта и спортивной фармакологии.

Список литературы

1. Anderson N. G. In: *Biologie prospective*, v. 1, Paris, 1983, 69-73.
2. Be gaud B., Pe- re J. C. et al. In: *Biologic prospective*, v. 2, 1191-1196.-3. Chance B. et al. In: *Biochemistry of exercise. Intern. Series on Sport Sciences*, v. 13, Champaign, 1983, 895-908.
4. Dreyfus J. C. et al. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.
5. Fr a sca- tore S. et al. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.
6. Gollnick P. D. In: *Biochemistry of Exercise*, Champaign, 1983, 909-921.
7. Greiling H. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.
8. Oclle- rich M. et. al. In: *Biologie prospective*, v. 2, Paris, 1983, 1169-1173.
9. Riad - Fahmy D. et al., *ibidem*, v. 1, 291-296.
10. Werner W. et al. *Ibidem*, v. 1, 525-528.
11. Wisser H., Knoll E. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.

References

1. Anderson N. G. In: *Biologie prospective*, v. 1, Paris, 1983, 69-73.
2. Be gaud B., Pe- re J. C. et al. In: *Biologic prospective*, v. 2, 1191-1196.-3. Chance B. et al. In: *Biochemistry of exercise. Intern. Series on Sport Sciences*, v. 13, Champaign, 1983, 895-908.
4. Dreyfus J. C. et al. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.
5. Fr a sca- tore S. et al. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.
6. Gollnick P. D. In: *Biochemistry of Exercise*, Champaign, 1983, 909-921.
7. Greiling H. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.
8. Oclle- rich M. et. al. In: *Biologie prospective*, v. 2, Paris, 1983, 1169-1173.
9. Riad - Fahmy D. et al., *ibidem*, v. 1, 291-296.
10. Werner W. et al. *Ibidem*, v. 1, 525-528.
11. Wisser H., Knoll E. In: *Abstract volume 5th European Congress of Clinical Chemistry*, Budapest, 1983.