

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_

подпись      инициалы, фамилия

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология  
06.06.01.07 Биофизика

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА  
ТЕСТИРОВАНИЯ СЛЮНЫ  
В ОЦЕНКЕ УРОВНЯ ТРЕНИРОВАННОСТИ СПОРТСМЕНОВ

Научный руководитель \_\_\_\_\_ к.б.н. Степанова Л.В.

Студент ББ12-01Б №041204287 \_\_\_\_\_ Колесник О.В.

Красноярск 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. СЛЮНА – ИНДИКАТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА .....	5
1.1 Физико-химический состав слюны .....	5
1.2 Изменение физико-химического состава слюны при физической нагрузке на организм .....	7
1.3 Методы тестирования слюны для определения функционального состояния организма .....	10
1.3.1 Физико-химические методы тестирования слюны.....	10
1.3.2 Билюминесцентный метод тестирования слюны .....	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	18
ГЛАВА 3. БИОЛЮМИНЕСЦЕННОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СЛЮНЫ В ОПРЕДЕЛЕНИИ УРОВНЯ ТРЕНИРОВААННОСТИ СПОРТСМЕНА .....	21
3.1 Остаточное свечение билюминесцентной системы как показатель тренированности .....	21
3.2 Взаимосвязь между показателями функционального состояния организма спортсмена и изменением остаточного свечения биферментной системы в условиях физических нагрузок .....	23
3.3 Определение уровня тренированности спортсмена по изменению остаточного свечения биферментной системы при физических нагрузках .....	29
ВЫВОДЫ.....	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	34

## ВВЕДЕНИЕ

Постоянно возрастающие нагрузки в тренировочном процессе спортсменов обуславливают необходимость ускорения процессов восстановления работоспособности спортсменов в разные периоды их подготовки к соревнованиям. Наблюдения за текущим состоянием здоровья спортсменов проводят систематически с помощью стандартных спортивных и медицинских тестов [1, 2].

Ежегодно технологии лабораторной и функциональной диагностики дополняются альтернативными методиками, основанные на тестировании биологических жидкостей, которые позволяют безболезненно и в короткие сроки проводить оценку физического состояния спортсмена. Так, слюна может выступать в качестве биологической жидкости для анализа различных маркёров, таких как антиоксидантный статус, гормоны, антитела и т.д., которые отвечают за определенное функциональное состояние организма спортсмена [3]. Преимуществом слюны в сравнении с кровью является ее динамичность в отражении ежедневных изменений в организме и применение ее биохимических показателей в целях неинвазивной диагностики, а также легкая доступность во время тренировочного процесса [4].

Одним из методов эффективного экспрессного лабораторного диагностирования влияния физической нагрузки на организм спортсмена может служить биолюминесцентное тестирование слюны. Метод основан на изменении (уменьшение или увеличение) интенсивности свечения биолюминесцентных ферментативных систем в ответ на добавление анализируемых образцов. Биолюминесцентные ферментативные биотесты хорошо разработаны для определения загрязнения и качества водной среды и почвы [5, 6]. Предварительные исследования показали, что эти методы можно использовать также для мониторинга биохимических изменений в слюне, как во время физических нагрузок, так и в период восстановления спортсмена [7].

Однако, хотя и было показано, что физическая нагрузка влияет на результаты биолюминесцентного анализа, но не были выявлены закономерности и факторы этого эффекта, такие как, например, спортивная квалификация испытуемых спортсменов. Поэтому целью настоящего исследования явилось использование биолюминесцентного ферментативного тестирования слюны в определении уровня тренированности спортсменов.

Задачи исследования:

- 1) выявить влияние слюны спортсменов на свечение биолюминесцентной биферментной системы;
- 2) выявить влияние показателей функционального состояния спортсмена на изменение остаточного свечения биферментной системы;
- 3) проанализировать изменение интенсивности свечения биферментной системы в присутствии слюны спортсменов разной спортивной квалификации при разных физических нагрузках.

## ГЛАВА 1. СЛЮНА – ИНДИКАТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

Слюна является сложным фильтратом плазмы крови, в силу чего отражает состояние динамического постоянства внутренней среды организма. В то же время она может весьма значительно меняться по составу, физико-химическим и биологическим свойствам при воздействии самых разных стимулов, то есть является индикатором реактивности организма [8]. Поэтому по составу и свойствам слюны можно оценить процессы, протекающие в организме при разных физических состояниях. Так, при занятии спортом наблюдается уменьшение рН и как следствие изменение кислотно-щелочного равновесия, что может свидетельствовать об окислительном процессе, происходящем в сократительных мышцах [9].

### 1.1 Физико-химический состав слюны

Смешанная слюна состоит на 97–99% из воды, на 1–3% из сухого остатка, из которого 1% – органические вещества, а оставшаяся часть представлена неорганическими соединениями. Объём компонентов десневой жидкости в смешанной слюне здоровых пациентов составляет всего 0,5%. Секрет слюнных желез содержит воду, ионы и белки [10].

Реакция слюны слабощелочная. Кислотно-основное состояние (рН) слюны является важнейшим показателем гомеостаза органов полости рта. Данный показатель колеблется в интервале 6,4 – 7,4 и подвержен суточным ритмам: в утренние часы рН слюны ниже, чем в вечерние. рН слюны зависит от многих факторов: характера питания, особенностей метаболизма организма, возраста, гигиенического состояния полости рта, а также состава и буферной емкости слюны. Существенное влияние ацидофильных микроорганизмов полости рта на рН слюны определяется их способностью образовывать в

процессе жизнедеятельности органические кислоты, оказывающие деминерализующее действие на эмаль зубов. К буферным системам слюны, участвующим в регуляции кислотно-основного равновесия, относят бикарбонатный, фосфатный и белковый. При этом на долю бикарбонатного буфера приходится 80% буферной емкости слюны. Буферные свойства слюны обеспечивают нейтрализацию кислот, вырабатываемых патогенными микроорганизмами, а также играют определенную роль в нейтрализации кислого содержимого желудка.

Слюна имеет мицеллярное строение. Ядро мицеллы содержит фосфат кальция, вокруг которого расположены ионы гидрофосфата ( $\text{HPO}_4^{4-}$ ), а затем диффузионный слой, содержащий ионы кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Наружный слой мицеллы составляет водно-белковая оболочка. Устойчивость мицелл слюны в большой степени зависит от её pH. Изменение pH в кислую и щелочную стороны нарушает стабильность мицелл слюны. При pH ниже критической величины (pH=6,4) слюна из минерализующей становится деминерализующей жидкостью. При смещении реакции слюны в щелочную сторону создаются предпосылки для образования зубного камня. Продолжительное употребление сладких напитков (кофе с сахаром, клубничный йогурт) способствует деминерализации эмали, особенно у лиц со сниженной секрецией слюны. У лиц с лабильной буферной системой pH слюны может восстанавливаться до исходного уровня за несколько минут [11].

Иммуноглобулины являются важными специфическими факторами защиты слюны. IgA, IgG и IgM влияют на микрофлору полости рта, препятствуя адгезии бактерий или препятствуют бактериальному метаболизму (в данном случае IgA играют преобладающую роль). Муцины – гликопротеины, производимые подчелюстной и подъязычными слюнными железами, а также другими многочисленными мелкими слюнными железами. Физиологическая роль муцинов (MG1 и MG2) – защита клеток, смазка, защита от обезвоживания, поддержание вязко-упругости в выделениях. Лизоцим – противомикробный фермент, способность которого заключается в расщеплении химических связей

в бактериальной клетке. Он может лизировать некоторые виды клеток гидролизом гликозидных связей в клеточной стенке [12].

Реологические свойства слюны способствуют облегчению движения языка, губ и слизистой оболочки полости рта во время глотания, жевания и разговора.

Вязкость слюны определяется консистенцией секрета, вырабатываемого слюнными железами. В течение первых 2-х лет жизни ребёнка в околоушных железах вырабатывается в основном слизистый секрет, а с 3 до 75 лет – белковый. К 80 годам у человека из околоушных слюнных желез снова начинает превалировать слизистый секрет [10].

Таким образом, человеческая слюна состоит на 98% из воды и 2% других соединений, таких как электролиты, растворённые анионы и микроэлементы, органические вещества (аминокислоты, белок и его фракции (альбумин, глобулины)), витамины, слизь, антибактериальные соединения, а также различные ферменты (амилаза, лактаза и т.д.) [13]. Среди многочисленных функций слюны выделяют солубилизацию пищевых веществ и продуктов, смазку мягких тканей, образование болюса, облегчение жевания и очищение от бактерий. Все вышеперечисленные функции связаны с физической характеристикой слюны и отдельных компонентов – текучестью [14].

Изменение физико-химического состава и свойства слюны может свидетельствовать о процессах, происходящих в организме при разном физическом состоянии организма.

## 1.2 Изменение физико-химического состава слюны при физической нагрузке на организм

В последние годы проведено большое количество исследований состояния иммунной системы спортсменов в процессе физических нагрузок с использованием слюны в качестве тест-объекта. Так, достаточно существенно менялась секреция иммуноглобулина А (IgA) у бегунов на разные дистанции, у

футболистов, у теннисистов, при силовых упражнениях. Снижение секреции IgA наблюдали в слюне участников сверхмарафона (160 км), причем у 25% супермарафонцев этот пониженный уровень сохранялся в течении 2-х недель.

Уровень IgA в слюне оказался различным в команде пловцов и даже в какой-то мере коррелировал с уровнем их физической подготовки. Отмечалось определенное достоверное снижение количества IgA в слюне велосипедистов при нагрузке, с последующим возвращением к норме. Принятие кофеина перед интенсивной нагрузкой вызывает повышенную секрецию IgA во время тренировки [15].

Подробно изучено циклическое изменение спектра стероидных гормонов в слюне регбистов, волейболистов, гандболистов и дзюдоистов, как во время соревнования, так и в процессе недельного восстановительного периода. Во время соревнования, как у мужчин, так и у женщин наблюдалось существенное увеличение уровня кортизола и тестостерона в слюне [16].

Уровень гормонов в слюне явился тестом в анализе психологического состояния хоккеистов при играх дома и на выезде. Уровень тестостерона и кортизола перед домашней игрой был выше по сравнению с выездной. Психологические измерения указали на то, что игроки были более уверенными в себе, играя в домашней обстановке, а также имели более высокую соматическую и когнитивную тревожность при игре на поле противников [17].

Широко представлены в литературе изменения других биохимических показателей слюны у спортсменов. Здесь наибольший интерес представляет обнаруженная высокая степень корреляции между содержанием лактата в слюне и в крови испытуемых во время бега на различные дистанции (от 400 м до 30 км), во время теннисных соревнований, а также при нагрузках высокой мощности. Выявлено, что хорошо подготовленные спортсмены имеют показатели лактата очень низкие (2 ммоль/л) и могут не изменяться при физических нагрузках [18, 19].

Важными показателями состояния организма спортсмена во время марафонского забега являются повышенный уровень таких биохимических



показателей слюны, как минеральный состав, содержание гексозамина и свободной сиаловой кислоты, активность амилазы и пероксидазы [20]. Определение активности амилазы, являющейся одним из основных ферментов слюны, часто проводят при биохимическом тестировании. Отмечено, что активность антиоксидантных ферментов слюны (супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы) коррелирует с уровнем свободных сиаловых кислот в слюне.

Исследования, выполненные на кафедре биохимии СПбГУФК им. П.Ф. Лесгафта, выявлено заметное повышение содержания мочевины в слюне тяжелоатлетов после стандартной тренировки [15].

Определено, что в процессе тренировки изменяется содержание основных компонентов ротовой жидкости: уменьшение концентрации ионов кальция, увеличение концентрации ионов фосфат-ионов, растёт содержание белка. В группе бадминтонистов и волейболистов происходило подщелачивание слюны, а у футболистов – подкисление. После физической нагрузки в слюне также выявлено снижение концентрации глюкозы, которая не восстанавливалась до первоначального состояния, что свидетельствовало о значительных энергетических затратах спортсменов [21].

Таким образом, состояние организма спортсмена при физических нагрузках можно оценить по изменению таких биохимических показателей слюны, как иммуноглобулин А, стероидные гормоны, лактата, активность амилазы и пероксидазы, минеральный состав. Выявлены достоверные корреляции снижение иммуноглобулин А и увеличение стероидных гормонов, увеличение активности амилазы и пероксидазы, увеличение минерального состава с ростом физической нагрузки на организм. По концентрации лактата и её изменению можно определять уровень тренированности спортсмена и величину физической нагрузки на организм.

### 1.3 Методы тестирования слюны для определения функционального состояния организма

Исследование слюны относят к неинвазивному методу и проводят для оценки возрастного и физиологического статуса, выявления функционального состояния организма при физических нагрузках на организм, выявления соматических заболеваний, патологии слюнных желёз и тканей полости рта, генетических маркёров, мониторинга лекарственных средств. С появлением новых количественных методик для лабораторных исследований чаще используют смешанную слюну. Преимуществом использования слюны по сравнению с плазмой крови является ее неинвазивный сбор, что делает удобным диагностирование; отсутствие у пациента стресса при проведении процедуры получения слюны; возможность использовать простые приборы и приспособления для сбора слюны; отпадает необходимость присутствия врача и среднего медицинского персонала при заборе слюны; существует возможность повторного и неоднократного получения материала для исследований; слюна может определённое время сохраняться на холоде до проведения исследований [22].

#### 1.3.1 Физико-химические методы тестирования слюны

Среди физико-химических методов тестирования слюны широко распространён хемилюминесцентный анализ, основанный на измерении интенсивности свечения (люминесценции) органических соединений в составе слюны при их возбуждении различными видами энергии.

Методом  $H_2O_2$ -люминолзависимой хемилюминесценции слюны оценивают антиоксидантный статус организма. Выявлено снижение скорости работы антиоксидантной системы у спортсменов в период максимальной физической нагрузки, что свидетельствует об интенсивной работе внутренних резервов организма. Спортсменам высшей квалификации свойственно

снижение интенсивности обеззараживания продуктов свободнорадикального окисления при высокой скорости реакции [23].

Достаточно широко распространен также спектрометрический анализ слюны по выявлению изменения биохимического состава слюны (макро- и микроэлементов, белков, липидов и аминокислот) при интенсивных физических нагрузках. Анализируя спектры взаимодействия слюны с излучением, определяют качественное и количественное изменения ее биохимического состава. К примеру, выявлено увеличение уровня белка у спортсменов после нагрузки с тенденцией к возвращению на базовый уровень в течение отдыха [24].

К наименее значимым физико-химическим методам тестирования слюны в спортивной практике относят метод двумерного электрофореза, основанный на разделении белков по заряду, молекулярной массе; кристаллографический (тезиграфический) метод, основанный на изменении формы кристаллов кристаллообразующим веществом при добавлении к нему слюны. Данные методики позволяют выявить изменения структуры слюны и ее биохимический состав при разных видах физической нагрузки на организм. Результаты исследований данными методиками хорошо коррелируют с другими физико-химическими методами. К примеру, методом двумерного электрофореза выявлено, что кратковременная нагрузка высокой интенсивности приводит к изменению белковых составляющих слюны, что подтверждает спектральный анализ [4]. Однако, в связи с трудоемкостью, малоинформативностью и длительностью проведения анализа, данные методы практически не используют при тестировании слюны.

В настоящее время быстро и широко вошли в спортивную медицину методы иммунного анализа, в частности иммуноферментный метод. Это можно объяснить наиболее чувствительности метода к выявлению ферментов, отвечающих за состояние перетренированности, которое является одной из проблем спортивной медицины.

Количественное изменение стероидных гормонов в слюне, таких как кортизол и тестостерон, определяемое на иммуноферментных наборах позволяет рассчитать индекс анаболизма (ИА) по формуле

$$ИА = \frac{C_T}{C_K} \times 100\%$$

где  $C_T$  – количество тестостерона,  $C_K$  – количество кортизола.

Индекса анаболизма (ИА) позволяет определить степень «равновесия» между анаболическими и катаболическими процессами. Систематические мышечные нагрузки приводят к возникновению ряда адаптационных реакций нейроэндокринной системы, в результате которых происходят изменения активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой структуры, что отражается на уровне гормонов кортизола и тестостерона в слюне. При этом количественный состав изменений этих гормонов зависит от объема тренировочных занятий, интенсивности, типа физических упражнений, а также некоторых психологических факторов. Понижение ИА после физической нагрузки более чем на 30% свидетельствовало о преобладании в организме анаболического процесса над катаболическим [25, 26, 27].

Методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа показано резко выраженное различие в показателях гормонального статуса у студентов-спортсменов и студентов, не занимающихся спортом, в зависимости от спортивной нагрузки: увеличение концентрации кортизола на 55% наблюдали у студентов 1 курса, 72% – студентов 3 курса, 85% – студентов 5 курса [28].

Таким образом, в настоящее время существует множество физико-химических методов тестирования слюны. Наибольшее применение в спортивной практике имеют методы хемилюминесцентного и спектрометрического анализов белкового, ферментного и гормонального

состава слюны. Это можно объяснить наиболее чувствительности методов к выявлению изменения функционального состояния организма спортсмена во время тренировочного процесса. Физико-химические методы, основанные на выявлении изменения структуры слюны и ее общего биохимического состава при различных физических нагрузках, используют реже. Это вызвано малой информативностью для оценки физического состояния организма спортсменов во время тренировок и длительностью проведения анализа.

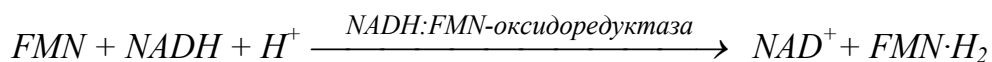
### 1.3.2 Билюминесцентный метод тестирования слюны

В последнее время активно стало развиваться тестирование объектов с использованием билюминесцентного свечения. С практической точки зрения наиболее важными считали билюминесцентные системы бактерий и светляков. В настоящее время в связи с развитием методов генной инженерии и получением рекомбинантных организмов появилась возможность широкого использования в билюминесцентном анализе люцифераз из светляков и других светящихся организмов. По простоте и числу анализируемых веществ билюминесцентные тесты сходны со спектрофотометрическими, но по чувствительности превосходят их на два-три порядка и отличаются экспрессностью [29].

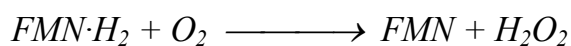
Химической основой свечения бактерий является ферментативное окисление люциферазами восстановленного флавинмононуклеотида ( $\text{FMN}\cdot\text{H}_2$ ) и длинноцепочечного алифатического альдегида ( $\text{RCHO}$ ) кислородом воздуха. Все бактериальные люциферазы – флавин-зависимые монооксигеназы.

Исходные реагенты реакции не могут существовать в бактериальной клетке в свободном виде, т.к.  $\text{FMN}\cdot\text{H}_2$  подвергается быстрому автоокислению, альдегид тетрадеканаль является ядом и не производится организмами. Поэтому бактерии имеют специальные ферментативные системы, способствующие восстановлению флавинмононуклеотида ( $\text{FMN}$ ) и карбоновой

кислоты. Восстановление FMN в бактериях происходит в реакции, катализируемой ферментом NADH:FMN-оксидоредуктазой:



Время, требуемое для одного каталитического цикла моноферментной биолюминесцентной системы намного больше, чем время жизни одного из субстратов реакции – FMN·H<sub>2</sub>, который автокаталитически окисляется кислородом менее чем за 1 сек:

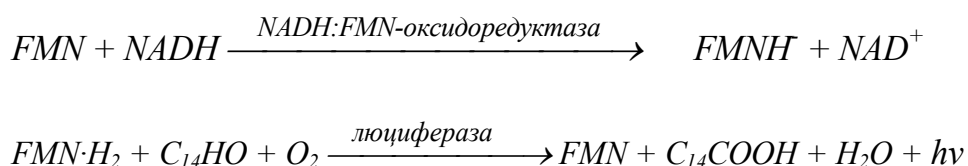


Поэтому в условиях запуска реакции одной порцией предварительно восстановленного FMN фермент успевает совершить всего один оборот. Наблюдается люминесцентная вспышка, затухающая по экспоненте реакция протекает в нестационарном режиме.

Второй субстрат – RCHO подвержен медленному неферментативному окислению, и скорость окисления зависит от температуры и начальной концентрации. При комнатной температуре раствор альдегида, используемый для измерения биолюминесценции, стабилен в течение 8 часов. Неферментативное окисление альдегида в отличие от FMN·H<sub>2</sub> не оказывает влияния на ход люминесцентной реакции, поскольку его скорость значительно меньше скорости ферментативного окисления. Все бактериальные люциферазы проявляют биолюминесцентную активность с альдегидами, длина цепи которых от восьми до шестнадцати углеродов. Существует предположение, что сродство альдегида к люциферазе обусловлено гидрофобными взаимодействиями между каждым участком алифатической цепи альдегида и гидрофобными группами фермента. Поэтому с увеличением длины углеродной цепи альдегид прочнее связывается с люциферазой. Это обеспечивает большую

эффективность превращения химической энергии в световую. Однако эту гипотезу нельзя считать всеобъемлющей, поскольку не для всех люцифераз соблюдается монотонная связь параметров билюминесцентной реакции с длиной цепи альдегида. Специфичность люцифераз к альдегидам проявляется в том, что другие алифатические длинноцепочечные соединения (кетоны, кислоты, спирты) не обнаруживают с люциферазой билюминесцентной активности, хотя не исключено, что они реагируют с ней без излучения [30, 31].

Любые ферменты, катализирующие синтез субстратов люциферазы, могут образовывать с ней сопряженную ферментную систему. Одной из таких является сопряженная ферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза, осуществляющая следующую цепь ферментативных реакций:



В результате первой реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой, происходит восстановление FMN с помощью восстанавливающего реагента – восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (NADH). При этом NADH переходит в окисленную форму (NAD<sup>+</sup>), передавая молекуле FMN протон и два электрона, с образованием депротонированной формы восстановленного флавина (FMN·H<sup>-</sup>).

Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является билюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин (FMN·H<sup>-</sup>) и алифатический альдегид (C<sub>14</sub>OH) окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина (FMN), жирная кислота (C<sub>14</sub>COOH) и испускается квант света. При проведении билюминесцентной реакции с использованием химически восстановленного FMN·H<sub>2</sub> наблюдается длительное свечение, обусловленное множественными оборотами фермента.

Вмешательство в любую часть метаболизма бактериальной клетки, которое влияет на выделение любого компонента бактериологической биолюминесценции, будет отмечено уменьшением светового излучения. Токсины или тестируемое вещество, влияющие на биолюминесцентную реакцию, катализаторами для которых служат ферменты, будут обнаружены.

Биолюминесцентное тестирование подходит для проверок, т.к. процедура проста, быстро выполняема, дешевая, используют малое количество образца и процесс легко автоматизировать. Однако при использовании теста на светящихся бактериях для воспроизводимости результатов необходимо контролировать состояние используемых в биотесте бактерий. Так, на фотобактерии могут влиять параметры анализируемой среды – температура, рН, жесткость воды и растворённый кислород [31].

Система, состоящая из смеси двух ферментов: бактериальной люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы получила наиболее широкое применение в биохимических и клинических лабораторных анализах [32].

К примеру, степень эндотоксикоза при различных заболеваниях проверяют по уменьшению интенсивности свечения биолюминесцентной биферментной системы в ответ на добавление слюны испытуемых. Для этого максимальную интенсивность свечения в каждом случае сопоставляют с контрольным образцом, дающим максимальное свечение, и определяют величину ингибирования свечения. Это значение и используют в качестве показателя степени эндотоксикоза [33, 34, 35, 36, 37].

Биолюминесцентная биферментная система используется также в качестве датчика для измерения различных дегидрогеназ. В присутствии субстрата лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в биферментной системе определяют его активность по интенсивности биолюминесцентного свечения. Добавление слюны в данную биохимическую реакцию позволяет применять ее для тестирования слюны на содержание лактата [38].

Таким образом, биолюминесцентным методом тестирования можно проводить эффективное экспрессное лабораторное диагностирование на



токсичность и оценку состояния организма. Предварительные исследования показали, что билюминесцентный метод может быть использован также для выявления биохимических изменений в слюне спортсменов, как во время физических нагрузок, так и в восстановительный период. Метод также позволяет оптимизировать тренировочный процесс, предупреждать перегрузки для достижения спортсменами рекордных результатов [7]. Для разработки методики билюминесцентного тестирования слюны спортсменов необходимо выявить закономерности и факторы, влияющих на тренировочный процесс, такие как, например, зависимость от спортивной квалификации испытуемых спортсменов и другие. Учитывая простоту анализа и возможность многократного проведения тестирования, билюминесцентное тестирование слюны представляет практический интерес для оценки функционального состояния спортсмена, как во время тренировки, так и во время соревнований.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 27 студентов-спортсменов (экспериментальная группа) и 10 студентов, не занимающихся спортом (контрольная группа). Спортсмены профессионально занимались футболом (10 студентов-спортсменов), спортивным ориентированием (17 студентов-спортсменов) и имели спортивные разряды кандидата в мастера спорта (КМС), мастера спорта (МС), заслуженный мастер спорта (ЗМС), присвоенной им согласно международной спортивной квалификации. Исследуемые были в возрасте от 20 до 30 лет.

Исследования проводили в течение 5 дней с возрастающей физической нагрузкой. Тренировочный график состоял из короткой скоростно-силовой нагрузки (1, 2 и 3 тренировочные дни), длительной объемной нагрузки (4-ый тренировочный день) и восстановительного дня (5-ый тренировочный день). Экспериментальная группа тренировалась согласно тренировочному плану, контрольная группа – на занятиях по физической культуре. На тренировках с продолжительностью 90 минут исследуемые получали одинаковую физическую нагрузку.

Функциональное состояние организма определяли по фактической жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), частоте сердечного сокращения (ЧСС) и ортостатической пробе. ФЖЕЛ определяли по максимальному объему воздуха, выдыхаемого из легких после максимального вдоха. Измерения проводили на спиромере до тренировок. Отклонение ФЖЕЛ от должного ЖЕЛ (ДЖЕЛ) составляло не более  $\pm 15\%$ . ДЖЕЛ рассчитывали по формулам Болдуина, Курнана и Ричардсона:

$$\begin{aligned} \text{для мужчин ДЖЕЛ} &= (27,63 - 0,112V) \cdot H, \\ \text{для женщин ДЖЕЛ} &= (21,78 - 0,101 V) \cdot H, \end{aligned}$$

где В - возраст в годах, Н - рост в см.

ЧСС измеряли за минуту до и после тренировок. Активную ортостатическую пробу испытуемые проводили самостоятельно: утром после сна, лежа на спине, считали пульс за 1 минуту, далее, встав и отдохнув стоя одну минуту, считали пульс в положении стоя за 1 минуту, затем вычисляли разницу между первым и вторым измерением пульса.

Материалом исследования служила слюна. Сбор слюны проводили до и после тренировочных дней. Для сбора слюны использовали пенициллиновые флаконы. Образцы слюны хранили в холодильнике при  $-4^{\circ}\text{C}$ . Перед исследованием слюны центрифугировали в течение 15 минут при частоте 5000 об/мин на центрифуге (EppendorfCentrifuge 5810 r, Германия) и использовали надосадочную жидкость.

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием комплекта реактивов – лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов (КРАБ) (лаборатория нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, Красноярск). Один флакон лиофилизованного препарата содержал 0,4 мг/мл люциферазы (L) EC 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *E.coli* и 0,18 ед. активности NADH:FMN-оксидоредуктазы (R) EC 1.5.1.29 (*Ph. leiognathi*).

Для приготовления реакционной смеси использовали 80 мкл 0,05 М калий – фосфатного буфера (pH 6,8-7), 5 мкл раствора КРАБа, 10 мкл 0,032% раствора тетрадеканала (Merck, Германия), 50 мкл 0,07 мМ раствора NADH (Sigma, США), 10 мкл 0,16 мМ раствора FMN (Serva, Германия).

Биолюминесцентное тестирование проводили на планшетном люминометре (TriStarLB 941, Германия). В ячейку планшета последовательно вносили реакционную смесь с добавлением 40 мкл буфера (контрольное измерение) слюны или 40 мкл надосадочной жидкости слюны (экспериментальное измерение) и регистрировали максимальную величину интенсивностей контрольного ( $I_0$ ) и экспериментального ( $I$ ) свечения биферментной реакции.

Величину ингибирования слюны свечения биферментной системы определяли по значению остаточного свечения, вычисляемой по формуле

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\%.$$

Тренировочный эффект на организм оценивали по разнице остаточного свечения биферментной системы после и до тренировочной нагрузки.

Дополнительно с биолюминесцентным тестированием слюны сотрудники лаборатории определяли содержание в ней лактата калориметрическим методом. Результаты исследования были предоставлены для корреляционного анализа с величиной остаточного свечения.

Измерения проводили в трех повторностях. Расчеты проводили с использованием программы Statistica Version 10 (StatSoft Inc., США). Статистическая обработка показателей функционального состояния организма проводили с использованием критерия Стьюдента, изменения данных показателей и изменение остаточного свечения во время тренировок – подсчетом медианы и интерквартильного разброса (С<sub>25</sub>-С<sub>75</sub> перцентили). Межгрупповые различия оценивали по критерию Вилкоксона (t<sub>B</sub>), корреляционную связь – по критерию Спирмена и считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% (p<0,05). Для оценки взаимосвязи между остаточным свечением биферментной системы и показателями функциональной активности организма применяли множественный регрессионный анализ.

## ГЛАВА 3. БИОЛЮМИНЕСЦЕННОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СЛЮНЫ В ОПРЕДЕЛЕНИИ УРОВНЯ ТРЕНИРОВААННОСТИ СПОРТСМЕНА

### 3.1 Остаточное свечение билюминесцентной системы как показатель тренированности

Билюминесцентное тестирование слюны показало, что ингибирование свечения билюминесцентной биферментной системы до тренировок было наибольшим в экспериментальной группе (рис.1). После тренировок значение остаточного свечения незначительно снижена для контрольной группы и не измена для экспериментальной группы.

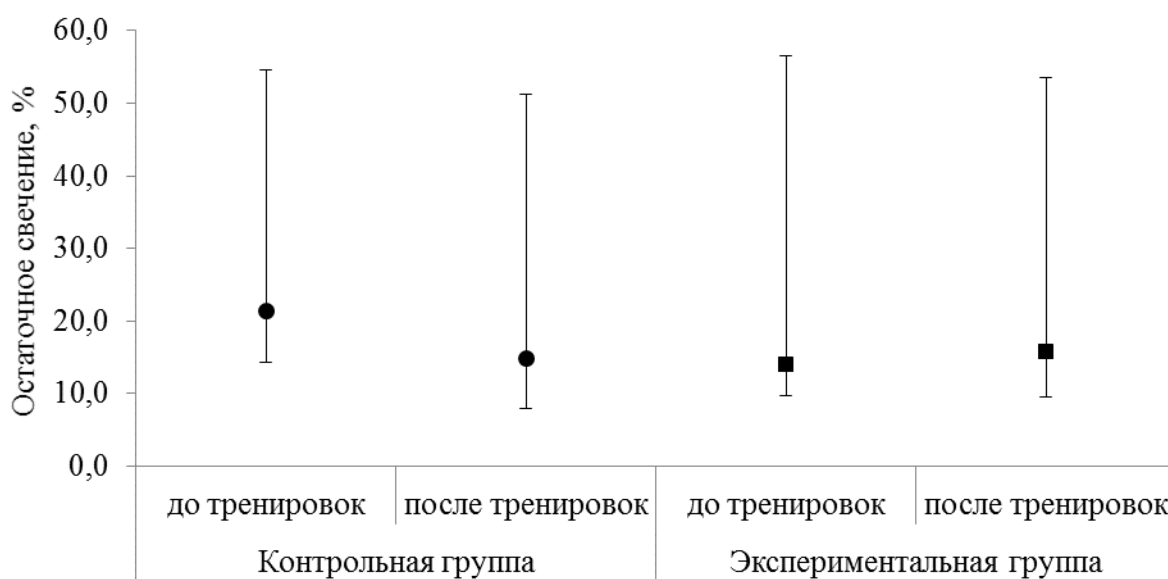


Рисунок 1 – Изменение остаточного свечения биферментной системы в присутствии слюны испытуемых контрольной и экспериментальной групп до и после тренировок

До тренировок слюна контрольной группы на 3,5% меньше ингибирует свечение биферментной системы, чем в экспериментальной группе, после тренировок – на 1,2% сильнее ингибирует по сравнению с экспериментальной группой. Достоверного различия между значениями остаточного свечения экспериментальной и контрольной группы до и после тренировок не выявлено.

Слюна спортсменов со спортивной квалификацией КМС до и после тренировок не изменяла свечение биферментной системы (рис.2). Слюна высококвалифицированных спортсменов после тренировок меньше ингибировала свечение биферментной системы, чем до тренировок.

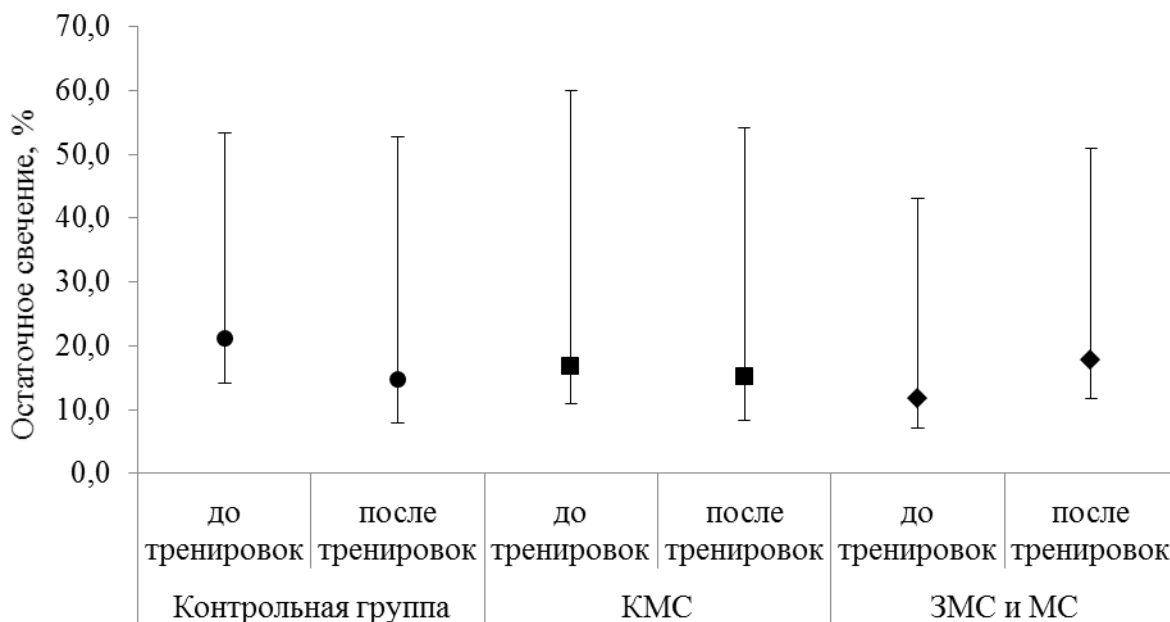


Рисунок 2 – Изменение остаточного свечения биферментной системы в присутствии слюны контрольной группы и экспериментальной группы с разными квалификациями до и после тренировок

Достоверного различия между значениями остаточного свечения высококвалифицированных спортсменов и спортсменов с квалификацией КМС до и после тренировок не выявлено. Однако при увеличении выборки статистических данных билюминесцентный метод тестирования слюны может быть пригоден для выявления тренированного спортсмена от начинающего по величине ингибирования свечения биферментной системы.

### 3.2 Взаимосвязь между показателями функционального состояния организма спортсмена и изменением остаточного свечения биферментной системы в условиях физических нагрузок

Усредненные показатели функционального состояния организма испытуемых, измеренные во время тренировочного процесса, представлены в табл.1.

Контрольная группа имела низкие показатели ФЖЕЛ по сравнению с экспериментальной (табл.1). Достоверно повышенные показатели ФЖЕЛ спортсменов вызваны высокими функциональными возможностями системы дыхания и является результатом их хорошей физической подготовленности.

Таблица 1 – Показатели функционального состояния организма студентов, не занимающихся спортом, и спортсменов разной квалификации до и после тренировок

Испытуемые группы	ФЖЕЛ, л	Ортостатическая проба	ЧСС в покое, уд/мин	ЧСС после тренировки, уд/мин
Контрольная группа	3,3±1,2*	10,0±4,8*	79,6±8,9*	130±12,8*
Экспериментальная группа со спортивным разрядом КМС	4,5±1,3* **	15,1±4,6* **	66,1±4,9* **	142±11,6*
Экспериментальная группа со спортивным разрядом МС, ЗМС	5,6±1,2* **	21,2±7,3* **	62,0±4,1* **	147±8,4*

Примечание: \* статистически значимое различие между показателями экспериментальных групп и контрольной группой при  $p < 0,05$ ; \*\* статистически значимое различие между показателями экспериментальных групп со спортивными разрядами КМС и МС, ЗМС при  $p < 0,05$ .

Величина ортостатической пробы наименьшая в контрольной группе и возрастает в экспериментальных группах с ростом спортивной квалификации (табл.1.). Низкие показатели ортостатической пробы контрольной группы

свидетельствовали о наличии хорошего адаптационного потенциала к нагрузкам. Показатели ортостатической пробы экспериментальной группы превышены от уровня восстановления. Видимо, организм спортсменов испытывал большие тренировочные нагрузки, после которых не успевал восстанавливаться (табл. 1, рис. 3).

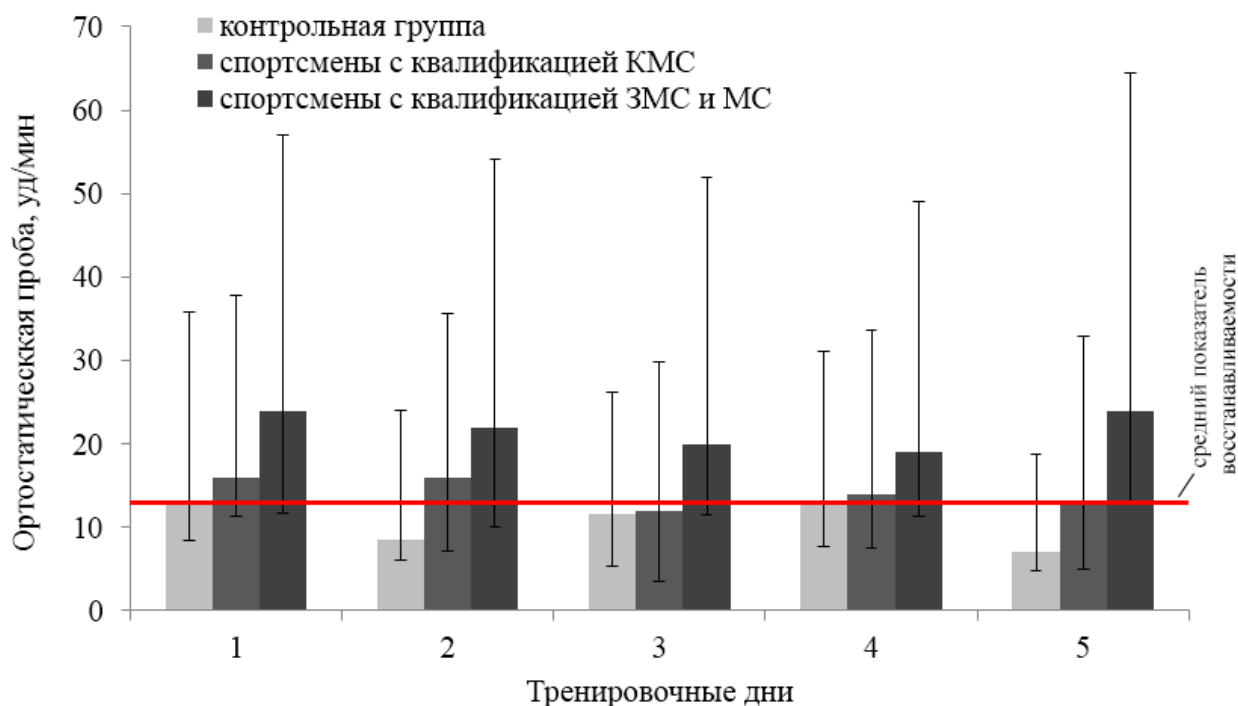


Рисунок 3 – Изменение ортостатической пробы контрольной группы и экспериментальной группы с разными квалификациями во время тренировочных дней

Показатели ЧСС в покое выше в контрольной группе по сравнению с экспериментальной, что характеризует низкую физическую подготовленность контрольной группы. Известно, что квалифицированные спортсмены имеют низкие показатели ЧСС в покое [2, 39, 18]. Однако после физической нагрузки показатели ЧСС возрастали у всех испытуемых, но значения ЧСС у спортсменов были выше. Возможно, что нетренированные студенты, достигая высоких для себя показателей ЧСС, самопроизвольно снижали нагрузку. Спортсмены же тренировались на грани возможностей, испытывая и преодолевая большие нагрузки на организм.



Таким образом, показатели функционального состояния организма спортсменов различимы от нетренированных студентов в показателях ФЖЕЛ и ЧСС в покое, а также в достижении высоких значения ЧСС после тренировок, что характеризует их хорошую физическую подготовленность. Наибольшие по величине показатели выявлены у спортсменов высшей квалификации, что указывает на их высокий уровень тренированности.

Ежедневные наблюдения функционального состояния организма испытуемых позволили выявить достоверные различия в ортостатической пробе и в изменении концентрации лактата в слюне между контрольной и экспериментальной группами во время скоростно-силовых тренировок (2-ой и 3-ий тренировочные дни), а также достоверно высокие изменения ЧСС в экспериментальной группе в тренировочный день с наибольшей физической нагрузкой (4-ый тренировочный день) (табл. 2).

Спортсмены экспериментальной группы, разделенные по спортивным квалификациям, имели одинаковый характер изменения параметров в зависимости от физической нагрузки, но с разными по величине показателями.

Концентрация лактата в слюне спортсменов независимо от спортивной квалификации в первые три дня снижена и повышена в последние дни. В контрольной группе концентрация лактата возрастала во всех тренировочных днях (рис. 4). Как известно, пониженная концентрация лактата в слюне свидетельствует о низкой нагрузке на организм, повышенная – о высокой физической нагрузке [18]. Следовательно, контрольная группа ежедневно испытывала достаточную физическую нагрузку на организм. Для спортсменов всех квалификаций физическая нагрузка на организм была возрастающей в течение 3-х дней и наибольшей в 4-ый тренировочный день.

Таблица 2 – Изменения показателей функционального состояния организма и концентрации лактата в слюне по тренировочным дням среди спортсменов и нетренированных студентов

Дни тренировок	Измеряемые показатели			Достоверность различий
		Экспериментальная группа	Контрольная группа	
1 день	Изменение концентрации лактата, моль/л	-1,3 [-2,4; 2,1]	1,4 [-0,6; 1,6]	p>0,05
	Изменение ЧСС, уд/мин	60 [4,2; 97,1]	56 [41,8; 86,3]	
	Ортостатическая проба	21 [6,2; 32,6]	13 [4,6; 22,9]	
2 день	Изменение концентрации лактата, моль/л	-0,9 [-2,7; 2,8]	0,3 [-1,7; 2,2]	p<0,05
	Ортостатическая проба	20 [9,4; 31,2]	8,5 [2,5; 15,5]	p>0,05
	Изменение ЧСС, уд/мин	64 [-9,9; 110]	49 [-53,3; 88,2]	
3 день	Изменение концентрации лактата, моль/л	-0,1 [-1,7; 2]	0,3 [-0,2; 1,1]	p<0,05
	Ортостатическая проба	18 [8; 31]	11,5 [6,3; 14,6]	p>0,05
	Изменение ЧСС, уд/мин	84 [5,4; 104,6]	60,5 [56,5; 81,1]	
4 день	Изменение ЧСС, уд/мин	96 [5,7; 126,8]	67 [38; 87,5]	p<0,05
	Изменение концентрации лактата, моль/л	0,6 [-1,7; 3,6]	1,6 [-0,7; 3,4]	p>0,05
	Ортостатическая проба	18 [6; 30]	13 [5,4; 18]	
5 день	Изменение ЧСС, уд/мин	48 [-7,2; 83,2]	58 [62,3; 95,6]	p>0,05
	Изменение концентрации лактата, моль/л	0,4 [-2,5; 4,2]	0,4 [-0,3; 2,2]	
	Ортостатическая проба	18 [8; 39,1]	7 [2,3; 11,8]	

Изменения ЧСС во время тренировочных дней происходило так, что максимально высокое значение достигалось у высококвалифицированных спортсменов в четвёртый день, у спортсменов со спортивными разрядами КМС - в третий тренировочный день (рис.5). Видимо, в эти тренировочные дни спортсмены испытывали высокую нагрузку на организм. Контрольная группа тренировалась с высокими для себя ЧСС во всех тренировочных днях.

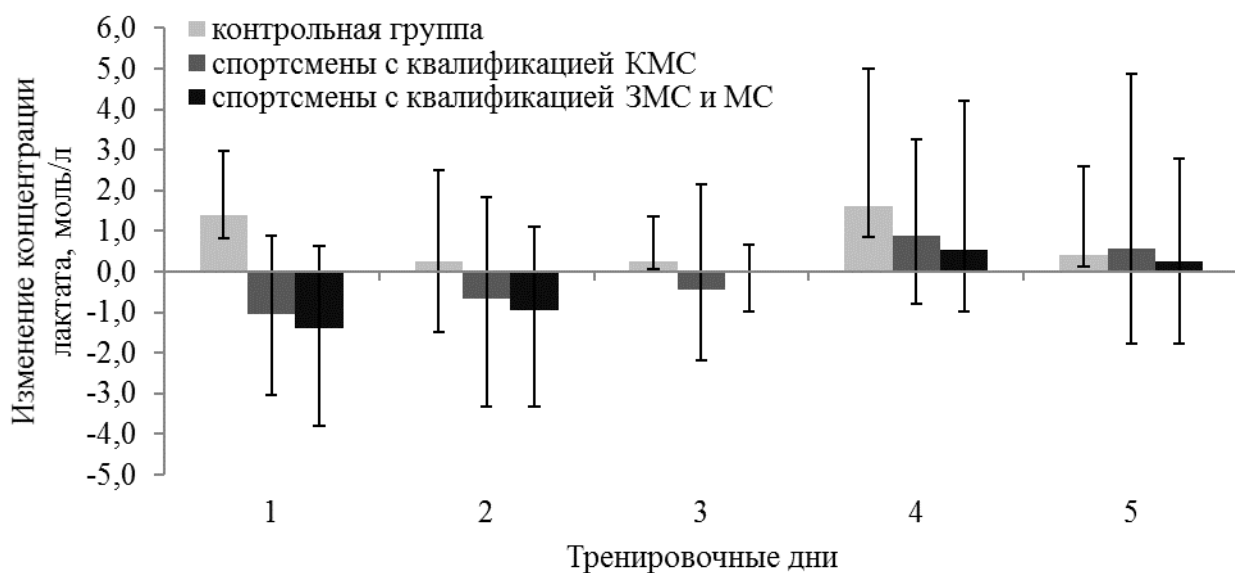


Рисунок 4 – Изменение концентрации лактата контрольной группы и экспериментальной группы с разными квалификациями во время тренировочных дней

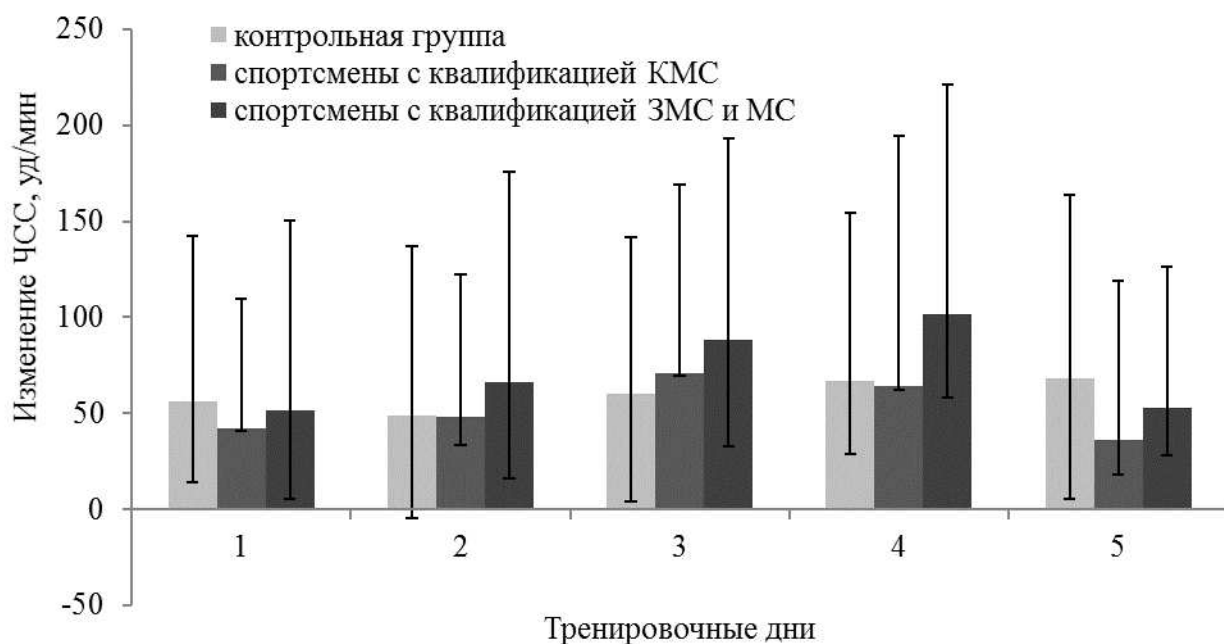


Рисунок 5 – Изменение ЧСС контрольной группы и экспериментальной группы с разными квалификациями во время тренировочных дней

Функциональная активность организма непосредственно связана с работой ее ферментативных систем, тем не менее, четкая взаимосвязь между

этими процессами в условиях систематических высоких физических нагрузок до настоящего времени не выявлена.

Определено, что зависимость остаточного свечения биферментной системы в присутствии слюны от функциональной активности организма для различного характера тренировочного процесса может быть описана уравнениями, включающими показатели функционального состояния и концентрацией лактата в слюне (табл. 3).

Таблица 3 - Зависимость остаточного свечения от показателей функциональной активности организма спортсменов и нетренированных студентов

Характер тренировок	Испытуемые	Уравнение регрессии	R <sup>2</sup>
Скоростно-силовая	Спортсмены всех квалификаций и нетренированные студенты	$T = 0,49(\text{ЧССд})+0,29(\text{Лд})-0,17(\text{ОП})$	0,24 (p=0,07)
	Спортсмены всех квалификаций	$T = -0,60(\text{ОП})+0,62(\text{ФЖЕЛ})+0,20(\Delta\text{ЧСС})$	0,46 (p=0,04)
Объемная	Спортсмены всех квалификаций и нетренированные студенты	$T = 0,66(\text{ОП})-0,11(\text{ЧССп})+0,13(\text{Лп})$	0,41 (p=0,01)
	Спортсмены всех квалификаций	$T = 0,39(\text{Лд})+0,35(\text{ФЖЕЛ})-1,1(\text{ОП})+0,36(\text{ЧССд})$	0,57 (p=0,04)

Примечание: Т – остаточное свечение после тренировки, ОП – ортостатическая проба, ЧССд – частота сердечных сокращений до тренировки, ЧССп – частота сердечных сокращений после тренировки, ΔЧСС – разница частоты сердечных сокращений после и до тренировки, ФЖЕЛ – фактическая жизненная емкость легких, Лд – концентрация лактата до тренировки, Лп – концентрация лактата после тренировки.

Исходя из представленных результатов можно полагать, что величина остаточного свечения биферментной системы в присутствии слюны квалифицированных спортсменов положительно зависит от показателей кислородозависимого дыхания и отрицательно - от уровня восстановления независимо от характера тренировок. Результаты совместных анализов

нетренированных студентов и спортсменов требует дополнительных исследований.

Таким образом, остаточное свечение биферментной системы в присутствии слюны спортсменов зависит от функциональной активности организма. Изменение величины остаточного свечения биферментной системы во время тренировок можно использовать в выявлении уровня тренированности спортсменов.

### 3.3 Определение уровня тренированности спортсмена по изменению остаточного свечения биферментной системы при физических нагрузках

Биолюминесцентное тестирование слюны на протяжении 5-ти тренировочных дней позволило выявить влияние тренировочной нагрузки на изменение остаточного свечения биферментной системы контрольной и экспериментальной групп (рис.6).

Изменение остаточного свечения биферментной системы в присутствии слюны контрольной группы и экспериментальной группы не отличалась в первый тренировочный день. В последующие 2-а тренировочных дня изменение остаточного свечения биферментной системы возрастала в обеих группах. Максимальное изменение остаточного свечения наблюдали 3-ий тренировочный день для контрольной группы и в 4-ый тренировочный день в экспериментальной группе. В последующие тренировочные дни изменение остаточного свечения понижалось.

По величинам максимального изменения остаточного свечения биферментной системы можно полагать, что экспериментальная группа испытывала большую физическую нагрузку на организм, чем контрольная.

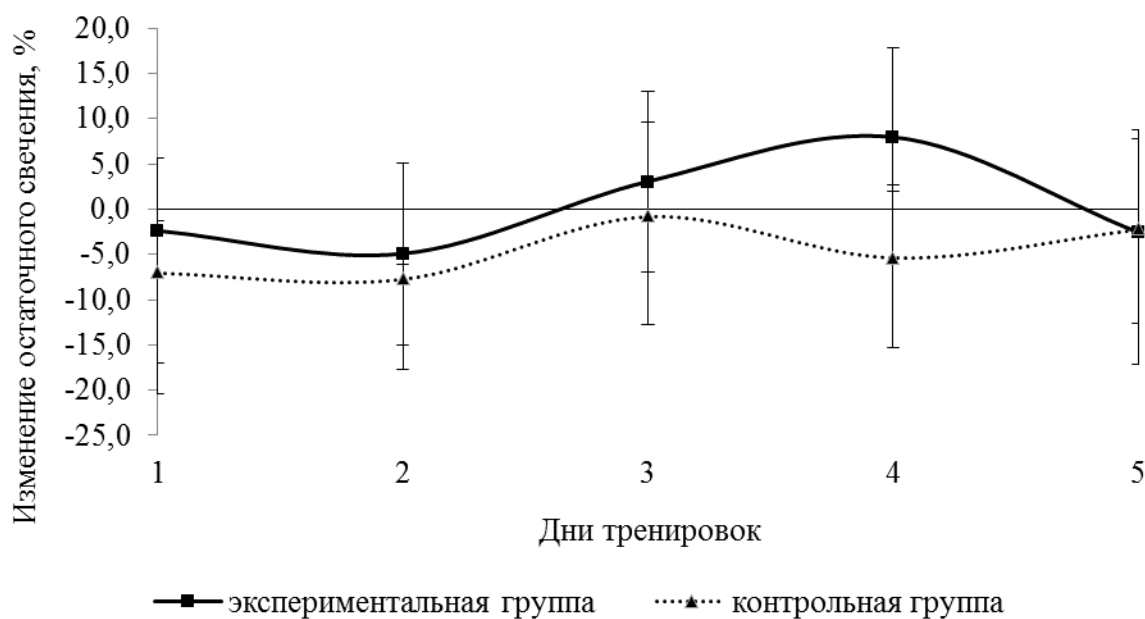


Рисунок 6 – Изменение остаточного свечения биферментной системы контрольной и экспериментальной групп по тренировочным дням

Биолюминесцентное тестирование слюны на протяжении 5-ти тренировочных дней также показало, что характер физической нагрузки по-разному влиял на изменение величины остаточного свечения. Величина остаточного свечения после тренировки уменьшалась при низкой физической нагрузке (1, 2 дни тренировок) и увеличивалась – при высоких нагрузках (3, 4 дни тренировок) (рис.7).

Анализ изменения остаточного свечения биферментной системы в экспериментальной группе, разделенных по спортивным квалификациям, позволил выявить их разный тренировочный уровень.

Спортсмены высшей квалификации (ЗМС и МС) имели наибольшее изменение остаточного свечения биферментной системы в 4-ый тренировочный день. Изменение остаточного свечения у спортсменов с квалификацией КМС достигало максимума на 3-ий тренировочный день с меньшей величиной, чем в группе с высшей квалификацией. При этом максимальное изменение остаточного свечения ферментативной системы спортсменов высшей квалификации достоверно выше на 5,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению со спортсменами с квалификацией КМС. В контрольной группе наблюдали

низкую величину изменения остаточного свечения во всех тренировочных днях.

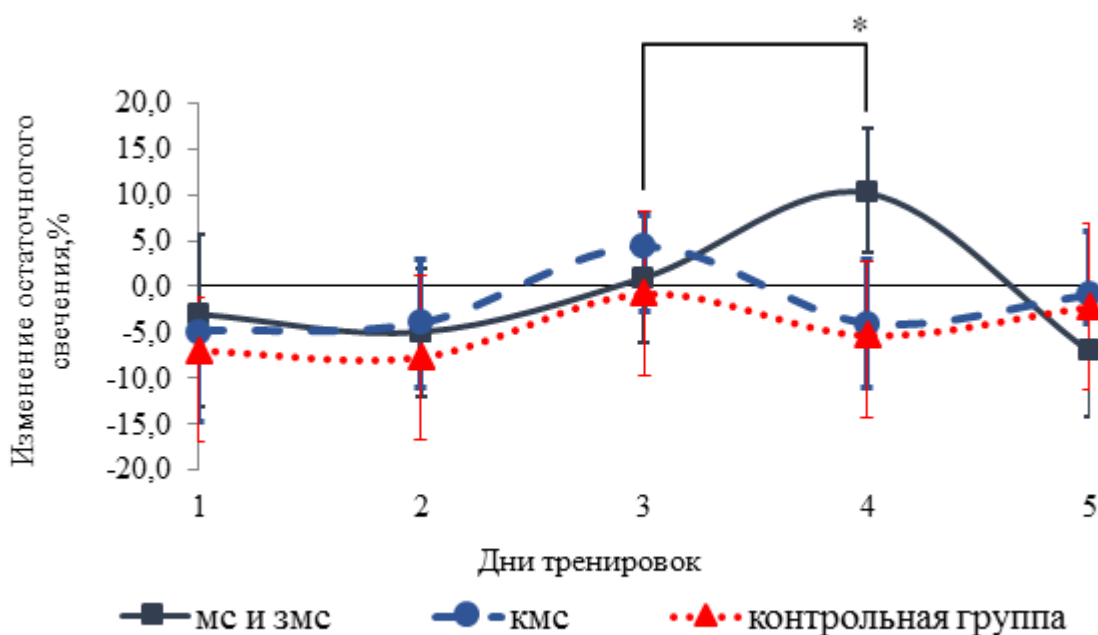


Рисунок 7 - Изменение остаточного свечения с увеличением физической нагрузки в контрольной группе и экспериментальной группе с разной спортивной квалификацией

Примечание: \* - статистически значимое различие в изменении остаточного свечения между высококвалифицированными и низкоквалифицированными спортсменами при  $p < 0,05$ .

Выявлено, что изменение остаточного свечения коррелирует с изменением ЧСС во всех группах (рис.8.), т.е. наибольшее значение изменения остаточного свечения соответствует высокому значению ЧСС. Следовательно, по максимальному изменению остаточного свечения можно определять уровень тренированности. Спортсмены высшей квалификации, имеющие наибольшее значение изменения остаточного свечения и высокое значение ЧСС, обладают высоким уровнем тренированности. Спортсмены со средней квалификацией обладают меньшим уровнем тренированности, т.к. максимальное значение изменения остаточного свечения биферментной

системы достигалось в середине тренировочного микроцикла и ниже, чем у высококвалифицированных спортсменов.

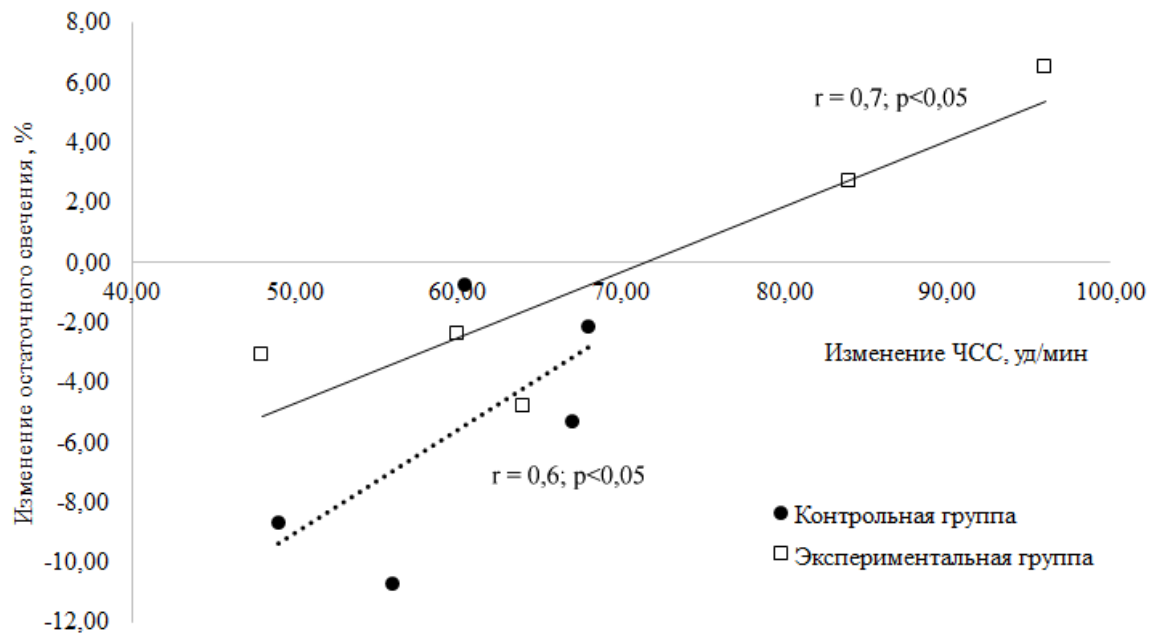


Рисунок 8 – Корреляция между изменением ЧСС и изменением остаточного свечения во время тренировочных дней в контрольной и экспериментальной группах

Таким образом, билюминесцентное ферментативное тестирование слюны позволяет определить уровень тренированности спортсмена по максимальному изменению остаточного свечения при большой нагрузке на организм.



## ВЫВОДЫ

1. Билюминесцентное ферментативное тестирование слюны может быть применимо для тестирования уровня тренированности спортсменов.
2. Слюна нетренированных студентов по сравнению со спортсменами сильнее ингибирует свечение биферментной системы до тренировки и меньше ее ингибирует после тренировки. При увеличении выборки статистических данных билюминесцентный метод тестирования слюны может быть пригодным для выявления различия между тренированным спортсменом и нетренированным.
3. По изменению остаточного свечения биферментной системы после тренировок можно определить характер физической нагрузки на организм спортсменов. Снижение величины остаточного свечения происходит при низкой физической нагрузке, возрастание – при высокой нагрузке.
4. Величина изменения остаточного свечения биферментной системы при больших нагрузках на организм позволяет выявить уровень тренированности спортсменов. Изменение остаточного свечения в день большой физической нагрузки на организм у высококвалифицированных спортсменов выше, чем у спортсменов со спортивным разрядом КМС, что характеризует их уровень тренированности высоким.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Громова, О. А. О роли магния в спортивной медицине / О. А. Громова, Е. Ю. Егорова, И. Ю. Торшин, А. Н. Громов, И. В. Гоголева // Русский медицинский журнал. Кардиология. – 2016. – №9. – С. 560–571.
2. Матвеев, Л. П. Теория и методика физической культуры (общие основы теории и методики физического воспитания; теоретико-методические аспекты спорта и профессио-нально-прикладных форм физической культуры) : учебник / Л. П. Матвеев. – Москва : Физкультура и спорт, 1991. – 543 с.
3. Бельская, Л. В. Кристаллизация биологических жидкостей – перспективы использования при диагностике. / Л. В. Бельская, О. А. Голованова, В. Г. Туманидзе, Е. С. Шукайло // Бутлеровские сообщения. – 2010. – №15. – С. 52.
4. Бельская, Л. В. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов. / Л. В. Бельская, О. А. Голованова, В. Г. Туманидзе, Е. С. Шукайло // Омский научный вестник. – 2011. – №6. – С. 175.
5. Esimbekova, E. N. Disk-shaped immobilized multicomponent reagent for bioluminescent analyses: Correlation between activity and composition / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, I. G. Torgashina // Enzyme and Microbiological Technology. – 2007. – Volume 40, Issue 2. – С. 343–346.
6. Kratasyuk, V. A. Polymer immobilized Bioluminescent systems for biosensors and bioinvestigations / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // The PBM Series. – 2003. – С. 307–343.
7. Гриценко, Е. В. Билюминесцентный контроль тренировочного процесса / Е. В. Гриценко, С. В. Бородулин, В. О. Бытев, В. А. Кратасюк // Сборник материалов 7 Всероссийской конференции по гомеостазу, апрель. – 1996. –С. 232–233.

8. Постнова, М. В. Ротовая жидкость как объект оценки функционального состояния организма человека / М. В. Постнова, Ю. А. Мулик, В. В. Новочадов, А. Б. Мулик, Н. О. Назаров, Д. М. Фролов // Вестник ВолГУ. Сер. 3. Экономика. Экология. – 2011. – №1, том 3. – С. 246–253.
9. Редуто, К. В. Барьерная функция слюны / К. В. Редуто // Актуальные проблемы современной медицины 2007: материалы Международной науч. конф. Студентов и молодых ученых. – 2007. – Ч. 2. – С. 459–460.
10. Вавилова, Т. П. Слюна. Аналитические возможности и перспективы : монография / Т. П. Вавилова, О. О. Янушевич, И. Г. Островская. – Москва : БИНОМ, 2014. – 312 с.
11. Тарасенко, Л. М. Биохимия органов полости рта: учебное пособие / Л. М. Тарасенко, К. С. Непорада. – Полтава, 2008. – 70 с.
12. Gianobile W. V. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions / W. V. Gianobile, T. Beikler, J. S. Kinney, C. A. Ramseier, T. Morelli, D. T. Wong // *Periodontology* 2000. – 2009. – Vol. 50. – С. 52–64.
13. Соколова, О. А. Саливадиагностика как метод наблюдения за динамикой развития заболевания у больных с патологией кроветворной системы / О. А. Соколова, А. М. Аванесов // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2010. – №3, том 12. – С. 389.
14. Rathnayake, N Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases / N. Rathnayake, S. Akerman, B. Klinge, N. Lundegren, H. Jansson, Y. Tryselius, T. Sorsa, A. Gustafsson // *PLoS One*. – 2013. – Volume 8, Issue 4. – С. 5.
15. Михайлов, С. С. Слюна как объект биохимического контроля в спорте / С. С. Михайлов, Е. В. Розенгарт // *Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта*. – 2008. – №6. – С. 57–61.
16. Edwards, D. A. Intercollegiate soccer: Saliva cortisol and testosterone are elevated during competition, and testosterone is related to status and social

connectedness with teammates / D. A. Edwards, K. Wetzel, D. R. Wyner // *Physiology & Behavior*. – 2006. – №87. – С. 135–143.

17. Carré, J. Pre-competition hormonal and psychological levels of elite hockey players: Relationship to the 'home advantage' / J. Carré, C. Muir, J. Belanger, S. K. Putnam // *Physiology & Behavior*. – 2006. – №89. – С.392–398.

18. Ясен, П. ЧСС, лактат и тренировки на выносливость / П. Ясен. – Пер. с англ. – Мурманск : Тулома, 2006. – 160 с.

19. Karatosun, H. Blood and saliva lactate levels during recovery from supramaximal exercise / H. Karatosun, C. Cetin, M. L. Baydar // *Saudi. Med. J.* – 2005. – Vol. 26, №11. – С. 1831–1832.

20. Ljungberg, G. Saliva and marathon running / G. Ljungberg, T. Ericson, B. Ekblom, D. Birkhed // *Scandinavian Journal of medicine & science in sports*. – 1997. – №7. – С. 214–219.

21. Чиканова, Е.С. Биожидкости и фракталы: количественный критерий самоорганизации капли / Е. С. Чиканова, В. Б. Федосеев, О. А. Голованова // *Вестн. Ом. Ун-та*. – 2015. – №4. – С. 45–49.

22. Вавилова, Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта : учебное пособие / Т. П. Вавилова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 208 с.

23. Vinnik Yu. S. The clinical aspects of chemiluminescent analysis use / Yu. S. Vinnik, A. A. Savchenko, O. V. Peryanova, O. V. Teplyakova, S. V. Yakimov, E. Yu. Teplyakov, O. S. Meshkova // *Siberian medical review*. – 2006. – №3. – С. 3–6.

24. Хаустова, С.А. Определение биохимических показателей слюны с помощью Фурье-спектроскопии средней ИК области /М. Ю. Шкурников, Е. С. Гребешок, В. Г. Артюшенко, А. Г. Тоневицкий // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2009. – №148. – С. 597–600.

25. Диденко, С.Н. Особенности гормонального статуса юных гандболистов/С.Н. Диденко, Г. Д. Алексанянц // *Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта*. – 2014. – №4. – С. 42–46.

26. Banfi, G. Usefulness of Free Testosterone/Cortisol Ratio during a Season of Elite Speed Skating Athletes / G. Banfi, M. Marinelli, G. S. Roi, V. Agape // *Int J Sports Med.* – 1993. – Volume 14, №7. – С. 373–379.
27. Chang, C. K. Responses of saliva testosterone, cortisol, and testosterone-to-cortisol ratio to a triathlon in young and middle-aged males / C.K. Chang, H.F. Tseng, H.F. Tan, Y. D. Hsuuw, J. Lee-Hsieh // *Biology of Sport.* – 2005. – Volume 22, №3. – С. 227–235.
28. Черкасов, Д.В. Сравнительный анализ содержания кортизола в слюне у студентов вуза с различной спортивной подготовкой / Д. В. Черкасов, А. В. Гулин // *Вестник ТГУ.* – 2011. – т. 16, вып. 2. – С. 517–519
29. Экологическая биофизика. Учебное пособие в 3 т. Под ред. И. И. Гительзона, Н. С. Печуркина. Т. 1. Фотобиофизика экосистем / И. И. Гительзон, В. А. Кратасюк, В. Н. Лопатин и др. – Москва: Логос, 2002. – 328 с.
30. Немцева, Е. В. Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий / Е. В. Немцева, Н. С. Кудряшева // *Успехи химии.* – 2007. – 76 (1). – С. 101–112.
31. Кудряшева, Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа : учебное пособие / Н. С. Кудряшева, В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск : Краснояр. гос.ун-т., 2002. – 154 с.
32. Руководство по биолюминесцентному тестированию на токсичность [Электронный ресурс] : Практическое руководство. – Москва. – Режим доступа: [http://www.pribori.com/lumitesteria/reagent-20/bio\\_tox.html](http://www.pribori.com/lumitesteria/reagent-20/bio_tox.html)
33. Воеводина, Т. В. Биолюминесцентный метод оценки степени тяжести состояния больных с выраженной эндогенной интоксикацией организма / Т.В. Воеводина, О.Е. Нифантьев, А.Н. Ковалевский, В.Р. Шульц, В. А. Кратасюк // *Лабораторное дело.* – 1990. – №9. – С.23–25.
34. Esimbekova, E. N. Application of enzyme bioluminescence in ecology / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, O. Shimomura // *Advances in Biochemical Engineering.* – 2014. – Vol. 144. – С. 67–109.

35. Esimbekova, E. N. Bioluminescent method to determine non-specific endotoxicosis in therapy / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, V. V. Abakumova // Luminescence. – 1999. – №14. – С. 197–198.
36. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2015. – Volume 18, Issue 10. –С. 952–959.
37. Voevodina, T. V. Bioluminescent technique to analyse degree of endotoxication / T. V. Voevodina, A. N. Kovalevskii, V. A. Kratasyuk, V. R. Schultz, O. E. Nifantsev // In: Proceeding of the First International School "Biological Luminescence", Wroclaw, Poland, June 20–23, 1989, World Scientific Publishing Co. – 1990, Singapore, –С.573–581.
38. Davies, R. H. Lactate assay based on bacterial bioluminescence: enhancement, dry reagent development, and miniaturization / R. H. Davies, J. W. Corry, J. D. Andrade // Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications / Singapore. – 2002. – С. 441–442.
39. Шварц, В. Б. Медико-биологические аспекты спортивной ориентации и отбора / В. Б. Шварц, С. В. Хрущев. – Москва : Физкультура и спорт, 1984. – 153 с.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

*Вкрашан*

подпись      инициалы, фамилия

« 20 » июня 20\_\_ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология  
06.06.01.07 Биофизика

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА  
ТЕСТИРОВАНИЯ СЛЮНЫ  
В ОЦЕНКЕ УРОВНЯ ТРЕНИРОВАННОСТИ СПОРТСМЕНОВ

Научный руководитель

*Веев*

к.б.н. Степанова Л.В.

Студент ББ12-01Б №041204287

*Колесник*

Колесник О.В.

Красноярск 2017