

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА СЛЮНЫ НА НАПРАВЛЕННОСТЬ БИФЕРМЕНТНОГО БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

© 2024 г. В.В. Малышева*, Л.В. Степанова*, А.М. Вышедко*, Л.В. Бельская**, Е.А. Сарф**,
З. Халджанова*, О.А. Коленчукова*, ***, ****, В.А. Кратасюк*, *****

*Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

**Омский государственный педагогический университет, наб. им. Тухачевского, 14, Омск, 644099, Россия

***Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФИЦ
«Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН»,
ул. Партизана Железняка, 3г, Красноярск, 660022, Россия

****Красноярский государственный аграрный университет», 660049, Красноярск, пр. Мира, 90, Россия

*****Институт биофизики СО РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

#E-mail: slyudmila@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 15.01.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Исследована слюна спортсменов с анаэробной (легкоатлеты) и аэробной (пловцы) физической нагрузкой. Слюна отобрана до (состояние физического покоя) и после тренировки. Определено, что физические нагрузки достоверно повышали концентрацию общего белка в слюне и водородный показатель (рН) слюны спортсменов. Активность каталазы в слюне достоверно повышена лишь после аэробной физической нагрузки в отличие от анаэробной. Биолюминесцентный показатель слюны достоверно повышен для спортсменов, занятых аэробной физической нагрузкой по сравнению с анаэробной. Значимое влияние на усиление светоизлучения в биолюминесцентной биферментной реакции способны оказывать такие биомаркеры слюны, как концентрация лактата и общего белка, активность каталазы, концентрация ионов кальция, калия, магния и содержание амидов группы IV. Содержание амидов группы IV и комплекса олигосахаридов, полисахаридов, фосфатазы, фосфолипидов в слюне спортсменов, занятых анаэробной физической нагрузкой, способны сильнее ингибировать биолюминесцентное свечение, чем концентрация триеновых конъюгатов и содержание амидов группы II в слюне спортсменов, занимающихся аэробной физической нагрузкой. Таким образом, в слюне спортсменов, занятых аэробной или анаэробной физической нагрузкой, выявлены значимые биомаркеры физиологического состояния организма, которые способны оказывать влияние на интегральный ответ биолюминесцентного ферментативного биотеста. Изменение интегрального биолюминесцентного показателя слюны в зависимости от вида физической нагрузки для спортсмена может быть использовано в спортивной медицине для профилактики физических перегрузок.

Ключевые слова: ферментативный биолюминесцентный биотест, биохимический анализ, ИК-Фурье-спектроскопия, слюна, аэробная и анаэробная физическая нагрузка, спортивная медицина.

DOI: 10.31857/S0006302924030215, EDN: ODHJJJ

Основными факторами, влияющими на изменение функционального состояния спортсменов, являются вид и уровень двигательной активности и в частности ведущий механизм ее энергообеспечения: анаэробный (без участия кислорода) или аэробный (с потреблением кислорода). Вопрос об особенностях регуляции функциональ-

ного состояния организма в процессе адаптации к физическим нагрузкам анаэробной и аэробной направленности в настоящее время изучен недостаточно [1].

В настоящее время современная наука активно занимается разработкой новых интегральных неинвазивных технологий для оценки функционального состояния организма. Слюна хорошо подходит в качестве неинвазивного биологиче-

Сокращение: ИК — инфракрасный.

ского материала для обследования состояния организма спортсмена во время физической нагрузки разной интенсивности. Показано, что при физической нагрузке изменяется не только биохимический состав слюны (содержание органических и неорганических и минеральных компонентов), а также уровень гормонов и ферментов [2–6].

Анализ слюны имеет ряд преимуществ: неинвазивный сбор биоматериала, длительное хранение, доступность методов лабораторного анализа [7–10] и малый объем проб для таких методов, как спектроскопические методы, капиллярный электрофорез, кристаллографический метод, хемилюминесцентный и иммунный анализ [11–15]. Связь между биохимическим составом слюны и физиологическим состоянием организма обуславливает ее диагностический потенциал.

В работе представлены результаты тестирования слюны спортсменов с помощью бактериального биолюминесцентного ферментативного биотеста [16–19], который позволяет определить влияние компонентов слюны на интенсивность свечения биферментной системы (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза), где результат оценивается интегрально по величине остаточного свечения [20, 21].

Для эффективного применения биолюминесцентного метода с целью контроля функционального состояния организма спортсмена необходимо оценить влияние каждого компонента слюны на биолюминесцентную реакцию, что ранее никем не изучалось. Биолюминесцентный анализ слюны позволит понять механизмы адаптации организма спортсмена к нагрузкам и разработать чувствительный персонифицированный метод профилактики физических перегрузок.

Таким образом, целью работы являлось определение значимых компонентов слюны — биомаркеров физиологического состояния организма у спортсменов с анаэробной или аэробной направленностью физических нагрузок, способных оказывать влияние на интегральный ответ биолюминесцентного ферментативного биотеста.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования. В исследовании принимали участие студенты Сибирского государственного университета физической культуры и спорта, которые профессионально занимались спортом ($n = 50$). Тестируемые спортсмены находились в возрасте 21–25 лет.

Спортсмены были разделены на две группы в зависимости от вида физической нагрузки: аэробный вид нагрузки (пловцы) ($n = 25$) и анаэробный вид нагрузки (легкоатлеты) ($n = 25$).

В качестве биологического материала для исследования использовали слюну спортсменов. Нестимулированная слюна отбиралась до (контрольный образец) и после (экспериментальный образец) тренировки путем самостоятельного сплевывания в стерильную пробирку в количестве 2 мл. Нативную слюну центрифугировали в течение 10 мин при 7000 об/мин (центрифуга Model 5810g, Eppendorf, Германия). Супернатант замораживали и хранили в морозильной камере при температуре -18°C . Для анализа использовали размороженную слюну.

Реактивы и приборы. Количественные показатели биохимического состава слюны определяли по общепринятым стандартным методикам, адаптированным к слюне, с использованием наборов реагентов для лабораторной диагностики («Вектор-Бест», Новосибирск).

Содержание общего белка (г/л) определяли спектрофотометрическим методом по реакции с пирогалловым красным, содержание лактата (ммоль/л) — ферментативным методом, активность каталазы (мкат/л) — по методу М.А. Королюка, активность супероксиддисмутазы (усл. ед.) — по уменьшению скорости реакции автоокисления адреналина [22]. Содержание субстратов для процессов липопероксидации (диеновых конъюгатов (нмоль/мл), триеновых конъюгатов (нмоль/мл) и оснований Шиффа (нмоль/мл)) определяли спектрофотометрическим анализом по методу И.А. Волчегорского [23].

Концентрацию ионов аммония (NH_4^+), калия (K^+), натрия (Na^+), магния (Mg^{2+}) и кальция (Ca^{2+}) определяли при помощи спектрофотометрического детектирования на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Санкт-Петербург).

ИК-Фурье-спектрометрию проводили на высушенных образцах слюны. Образцы слюны объемом 50 мкл высушивали в течение 30 мин на подложке из селенида цинка в термостате при 37°C . Инфракрасные (ИК) спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» («Симекс», Новосибирск) в диапазоне $500\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. Запись спектров проводили с числом сканов 32 с разрешением 4 см^{-1} . Измерение фона (воздуха) проводили для каждого обработанного образца. Пики, соответствующие колебаниям CO_2 , удаляли с помощью опции «генерация прямых» в программе ZaiR 3.5 («Симекс», Новосибирск). Для каждого образца сравнивали три спектра. Результаты были представлены в виде усредненного спектра. На ИК-спектрах поглощения всех образцов определяли интенсивность полос поглощения аминов группы А, I, II, III, IV; фосфолипидов; тиоцианатов; нуклеиновых кислот; метиленовые группы боковых цепей олигос-

ахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов; метиленовых группы боковых цепей аминокислот, липидов, белков.

Водородный показатель (рН) слюны определяли на лабораторном рН-метре «Эксперт-рН (микро)» («Эконикс-Эксперт», Москва).

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием многокомпонентного иммобилизованного реагента «Энзимолум» (НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск), который содержал фермент люциферазу из рекомбинантного бактериального штамма *Escherichia coli* и НАДН:ФМН-оксидоредуктазу из бактериальной культуры *Vibrio fischeri*, а также субстраты — 0.05 М калий-фосфатный буфер (рН 6.8–7.0), 0.4 мМ буферный раствор никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) (рН 6.8–7.0) (Sigma, США), 0.0025% спиртовой раствор тетрадеканала (C_{14}) (Sigma, США), совместно иммобилизованные в высушенный крахмальный гель. Катализатором биолюминесцентной реакции служил 0.5 мМ водный раствор флавиномононуклеотида (Serva, Германия).

Биолюминесцентное свечение регистрировали в сине-зеленой области (длина волны 470 нм) на портативном люцинометре «Люмишот» (НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск).

Методика биолюминесцентного тестирования слюны включала в себя проведение контрольного и экспериментального измерений.

Для проведения контрольного измерения в кювету последовательно вносили один реагент, 300 мкл буфера, 10 мкл водного раствора флавиномононуклеотида. Экспериментальное измерение проводили со слюной, когда 40 мкл буфера заменяли на 40 мкл слюны, т.е. в кювету последовательно вносили один реагент, 260 мкл буфера, 40 мкл слюны и 10 мкл водного раствора флавиномононуклеотида. Регистрировали максимальную интенсивность свечения.

Измерения каждого образца слюны выполняли в трех повторностях. Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения (T , %) (интегральный биолюминесцентный показатель) как отношение средних максимальных интенсивностей свечения экспериментального измерения (I) к контролю (I_0), умноженного на 100%:

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

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft, США). Описание выборки производили с помощью подсчета моды (Mo) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [C25–C75]. Различия между зависимыми группами оценивали по критерию Вилкоксона, между независимыми груп-

пами — по критерию Манна–Уитни, корреляционный анализ — по критерию Спирмена. Многофакторный анализ проведен с использованием дисперсионного анализа (ANalysis Of VAriance (ANOVA)). Уровень статистической значимости считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ компонентного состава слюны показал, что физическая нагрузка достоверно повышала рН ($p < 0.001$) и концентрацию общего белка ($p < 0.001$), понижала активность каталазы ($p = 0.02$) по сравнению с показателями до нагрузки (табл. 1). Интенсивность полос поглощения ИК-спектров для различных функциональных групп амидов, сахаров, аминокислот и фосфолипидов до и после физической нагрузки достоверно не различалась (табл. 2).

В настоящее время не выявлено оптимального набора биохимических показателей для определения степени влияния физической нагрузки на организм человека, поскольку различные системы и органы по-разному могут реагировать на физическую нагрузку. Однако известно, что временное изменение показателя рН может быть вызвано интенсивными тренировками в условиях гипоксии. Концентрация общего белка может быть повышена в силу больших физических нагрузок, вследствие большей интенсивности обменных процессов. Ввиду того, что при любой физической нагрузке потребление кислорода в органах возрастает, уровень свободнорадикальных процессов повышен. Вследствие этого может происходить усиленное образование продуктов перекисного окисления липидов, снижающее активность антиоксидантной системы, в частности, активность каталазы [24, 25], что наблюдалось в наших экспериментах.

Результаты биолюминесцентного тестирования слюны всех обследуемых спортсменов ($n = 50$) не показали достоверных различий между биолюминесцентным показателем до и после физической нагрузки, тогда как в состоянии физического покоя наблюдали повышение величины остаточного свечения ($T = 148.7$ [75.1–183.5]%) и понижение — после нагрузки ($T = 79.8$ [68.8–135.1]%). Современные исследования отмечают изменения компонентного состава слюны после воздействия физической нагрузки [24, 25, 27], однако влияние компонентов слюны на биолюминесцентную биферментную систему не представлено и не ясны причины изменения биолюминесцентного показателя.

Анализ корреляционных взаимосвязей между компонентным составом слюны и величиной остаточного свечения выявил, что повышение усредненного биолюминесцентного показателя в состо-

Таблица 1. Компонентный состав образцов слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Биохимический и кислотно-щелочной показатель	До физической нагрузки (<i>n</i> = 50)	После физической нагрузки (<i>n</i> = 50)
Концентрация лактата, ммоль/л	2.4 [1.7–3.6]	3.0 [1.9–5.0]
Концентрация общего белка, г/л	0.4 [0.2–0.6]	0.6 [0.5–0.9] (<i>p</i> < 0.001)
Активность каталазы, мкат/л	430236 [326340–488844]	427572 [352980–568764] (<i>p</i> = 0.02)
Активность супероксиддисмутазы, усл. ед.	134.2 [60.5–173.7]	121.1 [63.2–205.3]
Концентрация диеновых конъюгатов, нмоль/мл	3.9 [3.7–4.0]	3.9 [3.8–4.0]
Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	1.3 [1.2–1.5]	1.3 [1.2–1.5]
Концентрация оснований Шиффа, нмоль/мл	0.5 [0.4–0.5]	0.4 [0.4–0.5]
Концентрация ионов аммония (NH ₄ ⁺), ммоль/л	0.1 [0–0.1]	0.1 [0.1–0.1]
Концентрация ионов калия (K ⁺), ммоль/л	9.7 [6.7–10.7]	9.2 [7.6–11.0]
Концентрация ионов натрия (Na ⁺), ммоль/л	10.3 [6.7–18.5]	8.5 [6.3–11.1]
Концентрация ионов магния (Mg ²⁺), ммоль/л	0.2 [0.2–0.2]	0.3 [0.2–0.3]
Концентрация ионов кальция (Ca ²⁺), ммоль/л	1.0 [0.7–1.2]	1.1 [0.9–1.2]
pH	6.9 [6.6–7.2]	7.1 [7.0–7.3] (<i>p</i> < 0.001)

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентов.

Таблица 2. Интенсивность полос поглощения ИК-спектров слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Интенсивность поглощения ИК-спектров, %	До физической нагрузки (<i>n</i> = 50)	После физической нагрузки (<i>n</i> = 50)
Амид группы А	20.0 [7.34–24.0]	18.6 [11.5–34.4]
Амид группы I	15.8 [1.40–31.6]	8.4 [1.40–31.6]
Амид группы II	30.2 [20.0–47.0]	29.8 [20.0–40.0]
Амид группы IV	65.9 [64.2–69.8]	68.4 [64.2–72.6]
Метиленовые группы липидов слизистой оболочки полости рта	40.0 [32.6–54.4]	44.2 [33.0–53.0]
Тиоцианаты	87.4 [84.6–93.0]	87.4 [84.6–91.6]
Метиленовые группы боковых цепей аминокислот, липидов, белков	48.4 [38.6–55.0]	47.0 [40.0–60.0]
Фосфолипиды	76.0 [76.0–80.0]	78.5 [78.5–78.6]
Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)	45.9 [38.6–50.2]	48.4 [37.2–54.9]
Олигосахариды, полисахариды, фосфатазы, фосфолипиды	89.7 [89.7–93.0]	91.3 [88.8–94.4]

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентов.

янии физического покоя обратно взаимосвязано с концентрацией триеновых конъюгатов ($r = -0.4$, $p = 0.05$) и показателем pH слюны ($r = -0.4$, $p = 0.05$), его понижение после нагрузки – с концентрацией триеновых конъюгатов ($r = -0.5$, $p = 0.05$) и ионов магния ($r = 0.4$, $p = 0.05$).

Известно, что организм в состоянии физического покоя содержит приблизительно поровну свободных радикалов и антиоксидантов. Физические нагрузки нарушают равновесие, активных форм кислорода становится больше, возникает окислительный (или оксидативный) стресс. Ве-

роятно, триеновые конъюгаты, которые являются вторичным продуктом перекисного окисления липидов [24, 25], способны оказывать влияние на активность ферментов биолюминесцентной реакции независимо от функционального состояния организма спортсмена. Определено, что ионы магния необходимы для активности одного из фермента биотеста — люциферазы [26]. Следовательно, корреляционный анализ не позволил выявить значимых компонентов слюны, способных влиять на изменение биолюминесцентного показателя после физической нагрузки.

Многофакторный анализ выявил основные компоненты слюны, способные значимо оказывать влияние на результат биолюминесцентного тестирования (табл. 3). Содержание тиоцианатов (продукты обмена серосодержащих соединений, входящие в состав антимикробной защиты) и концентрация триеновых конъюгатов (вторичный продукт первичных продуктов перекисного окисления липидов) могли оказывать наибольшее воздействие на биолюминесцентную ферментативную реакцию. Наименьшее воздействие, предположительно, оказывали содержание комплекса олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов и амида группы II (производные кислородсодержащих кислот, в которых гидроксильная группа кислотного остатка заменена аминогруппой и участвует в полипептидных цепях), а также концентрация лактата. После физической нагрузки содержание амида группы IV в слюне незначительно повышалось, однако его значимое воздействие не выявлено. При этом в состоянии физического покоя (до физической нагрузки) содержание амида группы IV могло оказывать значимое воздействие на биолюминесцентную реакцию.

Известно, что кислотность NH-групп в амиде группы IV выше, чем в амидах других функциональных групп [11, 12, 23]. Возможно, что кислотность явилась возможной причиной не значимого влияния амида группы IV на результат биолюминесцентного тестирования слюны, собранной после физической нагрузки.

Известно, что физическая нагрузка по механизму энергообеспечения организма может быть аэробной и анаэробной направленности и потому способна вызывать изменения разных компонентов слюны [24, 25]. Сравнение отдельных компонентов слюны показало, что в состоянии физического покоя количественные значения биохимических показателей слюны спортсменов, занимающихся аэробной и анаэробной физической нагрузкой, достоверно не различались (табл. 4).

Активность каталазы достоверно повышалась после аэробной нагрузки ($p_{1,2} < 0.001$), и ее значение было достоверно высоким при анаэробной

физической нагрузке ($p_{3,4} < 0.001$) в отличие от аэробной (табл. 4). Достоверно повышены концентрация общего белка ($p_{1,2} = 0.006$ (после аэробной нагрузки), $p_{3,4} < 0.001$ (после анаэробной нагрузки)) и показатель pH ($p_{1,2} < 0.001$ (после аэробной нагрузки), $p_{3,4} = 0.006$ (после анаэробной нагрузки)) в слюне после обоих видов физической нагрузки по сравнению с состоянием физического покоя.

Результаты спектроскопического тестирования слюны показали, что занятия аэробной физической нагрузкой достоверно понижали содержание амидов групп A и IV в слюне ($p_{1,2} = 0.03$ и 0.007 соответственно) и повышали содержание нуклеиновых кислот ($p_{1,2} = 0.02$), комплекса олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов ($p_{1,2} = 0.02$) по сравнению с состоянием физического покоя (табл. 5).

Занятия анаэробной физической нагрузкой достоверно повышали содержание амидов групп I и II в слюне ($p_{3,4} = 0.004$ и 0.01 соответственно) и понижали содержание метиленовых групп белков, аминокислот, липидов ($p_{3,4} = 0.04$) по сравнению с состоянием физического покоя.

Следовательно, анаэробная физическая нагрузка, в отличие от аэробного вида, снижала активность антиоксидантной системы и содержание групп белков, аминокислот, липидов в слюне, что характеризовало высокую физическую активность организма спортсмена [24, 25].

Результаты биолюминесцентного тестирования слюны спортсменов, занимающихся аэробной и анаэробной физической нагрузкой, существенно не различались в состоянии физического покоя ($T = 98.8 [93.1–160.1]\%$ до аэробной нагрузки и $T = 78.4 [67.5–130.5]\%$ — до анаэробной) и достоверно отличались после нагрузки ($p = 0.004$) (рис. 1). Слюна спортсменов после аэробной физической нагрузки усиливала биолюминесцентное свечение ($T = 148.7 [100.1–208.5]\%$) и тушила свечение ($T = 47.1 [63.7–137.4]\%$) после анаэробной физической нагрузки. Следовательно, на изменение биолюминесцентного свечения ферментативной реакции могли влиять количественные показатели отдельных компонентов слюны спортсменов.

Однако многофакторный анализ не выявил значимых компонентов слюны, способных влиять на биолюминесцентную реакцию.

Анализ корреляционных взаимосвязей между количественными показателями компонентной слюны и биолюминесцентным показателем выявил значимые маркеры, способные воздействовать на биолюминесцентную ферментативную реакцию.

Таблица 3. Компонентный состав образцов слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки, значимо влияющий на биолюминесцентную реакцию (по критерию Фишера)

Биохимический показатель	Значения критерия Фишера при уровне значимости $p < 0.05$	
	до физической нагрузки	после физической нагрузки
Содержание тиоцианатов, %	12.9 ($p < 0.001$)	11.7 ($p = 0.002$)
Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	6.5 ($p = 0.02$)	6.1 ($p = 0.02$)
Содержание олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов, %	4.6 ($p = 0.04$)	4.6 ($p = 0.04$)
Содержание амида группы II, %	4.3 ($p = 0.05$)	4.1 ($p = 0.07$)
Концентрация лактата, ммоль/л	3.7 ($p = 0.07$)	3.7 ($p = 0.07$)
Содержание амида группы IV, %	3.1 ($p = 0.09$)	—

Таблица 4. Компонентный состав образцов слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Биохимический и кислотно-щелочной показатель	Аэробная нагрузка ($n = 25$)		Анаэробная нагрузка ($n = 25$)	
	до тренировки	после тренировки	до тренировки	после тренировки
Концентрация лактата, ммоль/л	2.6 [1.6–3.6]	2.4 [1.6–4.6]	2.3 [1.7–3.7]	3.6 [2.1–5.7]
Концентрация общего белка, г/л	0.3 [0.2–0.6]	0.6 [0.4–0.9] ($p_{1,2} = 0.006$)	0.4 [0.2–0.6]	0.7 [0.5–0.9] ($p_{3,4} < 0.001$)
Активность каталазы, мкат/л	298368 [255744–378288]	354312 [293040–400266] ($p_{1,2} < 0.001$)	485514 [447552–579420]	572760 [532800–679320] ($p_{2,4} < 0.001$)
Активность супероксиддисмутазы, усл. ед.	139.5 [76.3–163.2]	188.2 [105.3–227.6]	127.6 [42.1–205.3]	73.7 [50.0–121.1]
Концентрация диеновых конъюгатов, нмоль/мл	3.9 [3.8–4.1]	4.0 [3.9–4.1]	3.8 [3.7–4.0]	3.8 [3.7–3.9]
Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	1.3 [1.2–1.3]	1.2 [1.2–1.4]	1.4 [1.3–1.5]	1.4 [1.3–1.5]
Концентрация оснований Шиффа нмоль/мл	0.5 [0.4–0.5]	0.5 [0.4–0.5]	0.4 [0.4–0.5]	0.4 [0.4–0.4]
Концентрация ионов аммония (NH_4^+), ммоль/л	0.1 [0–0.1]	0.1 [0.1–0.1]	0.1 [0–0.1]	0.1 [0.1–0.1]
Концентрация ионов калия (K^+), ммоль/л	7.3 [5.4–10.3]	7.7 [6.1–10.6]	9.9 [8.6–10.8]	9.7 [8.3–11.7]
Концентрация ионов натрия (Na^+), ммоль/л	8.8 [4.4–18.5]	7.9 [4.8–12.6]	12.5 [9.1–18.9]	8.7 [7.3–11.1]
Концентрация ионов магния (Mg^{2+}), ммоль/л	0.2 [0.2–0.5]	0.3 [0.2–0.3]	0.2 [0.2–0.3]	0.2 [0.1–0.3]
Концентрация ионов кальция (Ca^{2+}), ммоль/л	0.8 [0.6–1.2]	1.1 [0.9–1.2]	1.1 [0.8–1.2]	1.1 [0.8–1.3]
pH	7.0 [6.6–7.2]	7.2 [7.0–7.4] ($p_{1,2} < 0.001$)	6.9 [6.6–7.3]	7.0 [6.9–7.2] ($p_{3,4} = 0.006$)

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей.

Таблица 5. Интенсивность полос поглощения ИК-спектров слюны спортсменов, отобранной до и после физической нагрузки

Интенсивность поглощения ИК-спектров, %	Аэробная нагрузка ($n = 25$)		Анаэробная нагрузка ($n = 25$)	
	до тренировок	после тренировок	до тренировок	после тренировок
Амид группы А	29.8 [11.6–64.2]	15.2 [11.9–22.9] ($p_{1,2} = 0.03$)	16.5 [4.2–31.2]	33.0 [11.5–44.2]
Амид группы I	15.8 [1.4–34.4]	4.9 [1.4–13.0]	14.4 [1.4–31.6]	25.6 [1.4–33.0] ($p_{3,4} = 0.004$)
Амид группы II	35.8 [24.2–48.8]	30.2 [21.4–37.2]	25.6 [15.8–35.8]	27.0 [20.0–47.2] ($p_{3,4} = 0.01$)
Амид группы IV	65.9 [57.2–71.2]	65.6 [57.2–69.8] ($p_{1,2} = 0.007$)	65.9 [65.6–68.4]	69.8 [68.4–74.0]
Метиленовые группы липидов слизистой оболочки полости рта	48.4 [33.0–58.6]	40.9 [33.7–51.6]	37.9 [27.4–47.0]	45.6 [31.2–53.0]
Тиоцианаты	90.2 [84.6–93.0]	88.8 [86.0–94.4]	87.1 [82.8–90.2]	86.0 [83.2–90.2]
Метиленовые группы боковых цепей аминокислот, липидов, белков	48.8 [44.2–57.2]	47.7 [38.6–60.0]	45.8 [37.2–53.0]	45.6 [40.0–57.2] ($p_{3,4} = 0.04$)
Фосфолипиды	76.0 [71.6–77.2]	78.5 [74.7–78.5]	76.0 [76.0–80.0]	78.6 [78.5–82.8]
Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК)	45.9 [40.0–60.0]	46.4 [35.1–54.6] ($p_{1,2} = 0.02$)	45.9 [33.0–48.4]	48.4 [43.4–55.3]
Олигосахариды, полисахариды, фосфатазы, фосфолипиды	89.7 [89.7–93.0]	91.3 [88.1–94.4] ($p_{1,2} = 0.02$)	89.7 [88.8–93.0]	91.3 [89.8–94.4]

Примечание. Данные представлены в виде моды и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентиля.

В состоянии физического покоя биolumинесцентный показатель слюны спортсменов с аэробной физической нагрузкой обратно коррелировал с содержанием тиоцианатов ($r = -0.6$, $p = 0.04$), амидов группы IV ($r = -0.4$, $p = 0.03$), концентрацией диеновых конъюгатов ($r = -0.4$, $p = 0.04$) и показателем pH ($r = -0.5$, $p = 0.02$); для спортсменов, занимающихся анаэробным видом нагрузки – с содержанием олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов ($r = -0.4$, $p = 0.04$) и амидов группы А ($r = -0.4$, $p = 0.04$). Следовательно, выявлены лишь компоненты слюны, способные значимо оказывать влияние на ингибирование биolumинесцентной ферментативной реакции, к ним отнесены тиоцианаты, диеновые конъюгаты, комплекс олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов и амиды групп А и IV.

После аэробной физической нагрузки биolumинесцентный показатель слюны спортсменов положительно коррелировал с концентрацией лактата ($r = 0.4$, $p = 0.04$), общего белка ($r = 0.4$, $p = 0.04$), ионов кальция ($r = 0.4$, $p = 0.04$), ионов калия ($r = 0.4$, $p = 0.04$), ионов магния ($r = 0.4$, $p = 0.04$); активностью каталазы ($r = 0.5$, $p = 0.03$) и обратно коррелировал с содержанием тиоцианатов ($r = -0.6$, $p = 0.03$), метиленовыми группами аминокислот, липидов и белков ($r = -0.5$, $p = 0.04$). Следовательно, после аэробной физической нагрузки на повышение интенсивности свечения биolumинесцентной биферментной реакции могли оказывать возможное влияние активность каталазы, концентрация лактата, общего белка, ионов кальция, калия, магния, на ингибирование – содержание тиоцианатов и метиленовых групп аминокислот, липидов.

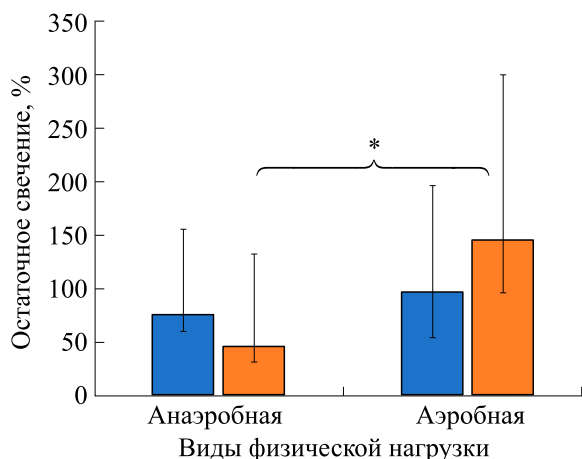


Рис. 1. Изменение интенсивности светоизлучения биолуминесцентной реакции при воздействии слюны спортсменов, отобранной до и после анаэробной ($n = 25$) и аэробной ($n = 25$) физической нагрузки. * – Достоверность различий между показателями после анаэробной и аэробной нагрузки ($p = 0.004$).

После анаэробной физической нагрузки биолуминесцентный показатель слюны спортсменов положительно коррелировал с концентрацией общего белка ($r = 0.6$, $p = 0.04$) и содержанием амидов группы IV ($r = 0.4$, $p = 0.04$) и обратно коррелировал с содержанием тиоцианатов ($r = -0.4$, $p = 0.04$) и комплексом олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов ($r = -0.4$, $p = 0.04$).

Следовательно, после анаэробной физической нагрузки на усиление светоизлучения в биолуминесцентной биферментной реакции могли оказывать возможное влияние такие показатели, как концентрация общего белка и содержание амидов группы IV, на тушение свечения – содержание тиоцианатов и комплекс олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов.

Таким образом, предполагаем, что во время интенсивной физической нагрузки происходило изменение кислотно-щелочного баланса слюны, что способствовало накоплению продуктов перекисного окисления липидов, которые в свою очередь способны оказывать ингибирующее воздействие на биолуминесцентную реакцию. Возможными биомаркерами функционального состояния организма спортсмена во время занятий анаэробной или аэробной физической нагрузкой, которые способны оказывать влияние на биолуминесцентную ферментативную реакцию, могут быть лактат, каталаза общий белок, ионы кальция, калия и магния, амиды группы IV, тиоцианаты, комплекс олигосахаридов и полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов. Для выявления значимого вклада отдельных компонент слюны на усиление или ослабление биолуминесцентной ферментативной биолуминесцентной реак-

ции необходимо продолжить исследование на большой выборке обследуемых.

Учитывая неинвазивность, простоту и возможность многократного тестирования, биолуминесцентный анализ слюны спортсменов, занимающихся разными видами физической нагрузки, можно использовать в качестве перспективного метода для оценки адаптации организма спортсмена к нагрузкам. На основе усиления или ослабления биолуминесцентного свечения биферментной системы при воздействии отдельных компонент слюны, которые будут количественно изменяться при разных видах физической нагрузки, можно разработать чувствительный персонифицированный метод профилактики физических перегрузок.

ВЫВОДЫ

1. Концентрация общего белка и показатель pH были повышены в слюне независимо от вида физической нагрузки (аэробной и анаэробной). Повышенный уровень активности каталазы в слюне отличал аэробную физическую нагрузку от анаэробной.

2. Биолуминесцентный показатель слюны повышен для спортсменов, занятых аэробной физической нагрузкой, и понижен – для спортсменов с анаэробной нагрузкой.

3. Значимое влияние на усиление интенсивности свечения биолуминесцентной биферментной реакции способны оказывать такие маркеры слюны, как концентрация лактата, активность каталазы, концентрация общего белка, ионов кальция, ионов калия, ионов магния и содержание амидов группы IV.

4. Содержание тиоцианатов совместно с комплексом олигосахаридов, полисахаридов, фосфатаз, фосфолипидов в слюне спортсмена может способствовать ингибированию биолуминесцентного свечения биферментной реакции, независимо от вида выполняемой им физической нагрузки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность спортсменам и тренерам Сибирского государственного университета физической культуры и спорта, оказавшим помощь в проведении исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Методика биолуминесцентного тестирования слюны разработана при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-10039, <https://rscf.ru/project/23-25-10039>) сов-

местно с Красноярским краевым фондом науки (Красноярский край).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики и одобрены локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера протокол № 11 от 10.10.2023 года. В начале тестирования от испытуемых получено письменное информированное согласие на обработку данных и добровольное участие в эксперименте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлов С. С. и Розенгарт Е. В. Слюна как объект биохимического контроля в спорте. *Ученые записки ун-та им. П. Ф. Лесгафта*, **6**, 57–61 (2008).
2. Турлак И. В. Слюна – основные направления исследования ее свойств. *Современные проблемы науки и образования*, № 4, 154–164 (2020).
3. Бельская Л. В., Голованова О. А., Турманидзе В. Г. и Шукайло Е. С. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов. *Омский науч. вестн.*, **6** (102), 175–178 (2011).
4. Bel'skaya L. V. and Sarf E. A. The use of IR Fourier spectroscopy of saliva for rapid assessment of the level of lipid peroxidation products. *Biomed. Chem. Res. & Methods*, **2** (2), e00094 (2019). DOI: 10.18097/BMCRM00094
5. Bel'skaya L. V. Application of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Bull. Sci. & Practice*, **2** (15), 132–140 (2017). DOI: 10.5281/zenodo.291849
6. Бельская Л. В., Голованова О. А., Шукайло Е. С. и Турманидзе В. Г. Экспериментальное исследование кристаллизации биологических жидкостей. *Вестн. Отделения наук о Земле РАН*, **3**, NZ6012 (2011). DOI: 10.2205/2011NZ000142
7. Hayes L. D., Sculthorpe N., Cunniffe B., and Grace F. Salivary testosterone and cortisol measurement in sports medicine: a narrative review and user's guide for researchers and practitioners. *Int. J. Sports Med.*, **37** (13), 1007–1018 (2016). DOI: 10.1055/s-0042-105649
8. Davies R. H., Corry J. W., and Andrade J. D. Lactate assay based on bacterial bioluminescence: enhancement, dry reagent development, and miniaturization. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 441–444 (2002). DOI: 10.1142/9789812776624_0099
9. Бельская Л. В. и Сарф Е. А. *Биохимические методы исследования слюны в лабораторной диагностике* (ИНТЕХ, Омск, 2013).
10. Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S., and Feron G. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Arch. Oral Biol.*, **57** (5), 556–566 (2012). DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.016
11. Bel'skaya L. V., Sarf E. A., Kosenok V. K., and Massard Zh. Chronophysiological features of the normal electrolyte composition of human saliva. *Ekologiya Cheloveka (Human Ecology)*, **25** (5), 28–32 (2018). DOI: 10.33396/1728-0869-2018-5-28-32
12. Mira A., Artacho A., Camelo-Castillo A., Garcia-Esteban S., and Simon-Soro A. Salivary immune and metabolic marker analysis (SIMMA): A diagnostic test to predict caries risk. *Diagnostics*, **7** (3), 38 (2017). DOI: 10.3390/diagnostics7030038
13. Винник Ю. С., Савченко А. А., Перьянова О. В., Теплякова О. В., Якимов С. В., Тепляков Е. Ю. и Мешкова О. С. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа. *Сибирское мед. обозрение*, **40** (3), 3–6 (2006).
14. Liao C., Chen X., and Fu Y. Salivary analysis: An emerging paradigm for non-invasive healthcare diagnosis and monitoring. *Interdisc. Med.*, **1** (3), e20230009 (2023). DOI: 10.1002/INMD.20230009
15. Zhang L., Xiao H., and Wong, D. T. Salivary biomarkers for clinical applications. *Mol. Diag. Ther.*, **13**, 245–259 (2009). DOI: 10.1007/BF03256330
16. Esimbekova E. N., Torgashina I. G., Kalyabina V. P., and Kratasyuk V. A. Enzymatic biotesting: scientific basis and application. *Contemp. Probl. Ecol.*, **14**, 290–304 (2021). DOI: 10.1134/S1995425521030069
17. Esimbekova E., Kratasyuk V., and Shimomura O. Application of Enzyme Bioluminescence in Ecology. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 1. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Ed. by G. Thouand and R. Marks (Springer, Berlin, 2014), pp. 67–109. DOI: 10.1007/978-3-662-43385-0_3
18. Kratasyuk V. A. and Esimbekova E. N. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **18** (10), 952–959 (2015). DOI: 10.2174/1386207318666150917100257
19. Esimbekova E. N., Kondik A. M., and Kratasyuk V. A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity. *Environ. Monit. Assess.*, **185** (7), 5909–5916 (2013). DOI: 10.1007/s10661-012-2994-1
20. Kratasyuk V. A., Stepanova L. V., Ranjan R., Sutormin O. S., Pande S., Zhukova G. V., and Kolenchukova O. A. A non-invasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' response to physical exertion. *Luminescence*, **36** (2), 384–390 (2020). DOI: 10.1002/bio.3954
21. Stepanova L. V., Vyshedko A. M., Kolenchukova O. A., Zhukova G. V., and Kratasyuk V. A. Use of bioluminescent saliva testing in evaluating of physical preparedness of athletes with different qualifications. *Sib. Med. Rev.*, **1**, 63–69 (2017). DOI: 10.20333/2500136-2017-6-63-69

22. Бельская Л. В., Сарф Е. А. и Косенок В. К. *Биохимия слюны: методы исследования* (Омск: Омскбланкиздат, Омск, 2015).
23. Bel'skaya L. V., Kosenok V. K., and Massard G. Endogenous intoxication and saliva lipid peroxidation in patients with lung cancer. *Diagnostics*, **6** (4), 39 (2016). DOI: 10.3390/diagnostics6040039
24. Grzesiak-Gasek I. and Kaczmarek U. Influence of swimming training session on selected saliva components in youth swimmers. *Front. Physiol.*, **13**, 869903 (2022). DOI: 10.3389/fphys.2022.869903
25. Ярушин С. А. Влияние физических нагрузок различной интенсивности на изменение некоторых биохимических показателей в поте и слюне. *Физическая культура. Спорт. Туризм. Двигательная рекреация*, **2** (4), 7–10 (2017).
26. Petushkov V. N., Dubinnyi M. A., Tsarkova A. S., Rodionova N. S., Baranov M. S., Kublitski V. S., Shimomura O., and Yampolsky I. V. A novel type of luciferin from the siberian luminous earthworm fridericia heliota: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53** (22), 5566–5568 (2014). DOI: 10.1002/anie.201400529
27. Yixiao X. U., Yongcai Z. H. A. O., and Binghong G. A. O. Saliva: A potential biological sample for the application in sports training. *J. Shanghai Univ. Sport*, **46** (10), 84–94 (2022). DOI: 10.16099/j.sus.2021.08.25.0002

The Influence of Salivary Constituents on the Activity of Bioluminescent Double Enzyme-Based System Depending on the Type of Physical Exertion

V.V. Malysheva*, L.V. Stepanova*, A.M. Vyshedko*, L.V. Bel'skaya**, E.A. Sarf**, Z. Khaljanova*, O.A. Kolenchukova*, ***, ***, and V.A. Kratasyuk*. *****

*Siberian Federal University, Svobodny prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

**Omsk State Pedagogical University, nab. imeni Tukhachevskogo 14, Omsk, 644099 Russia

***Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, ul. Partizana Zheleznyaka 3g, Krasnoyarsk, 660022 Russia

****Krasnoyarsk State Agrarian University, prosp. Mira 90, Krasnoyarsk, 660049 Russia

*****Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

The saliva of athletes participating in anaerobic (track and field athletes) or aerobic (swimmers) physical activity was studied. Saliva sample was collected before (control) and after the workout. It was found that physical activity significantly increased the salivary total protein concentration and pH values in the athletes. The activity of catalase in saliva was significantly increased only after aerobic, but not anaerobic exercise performance. The bioluminescent indicator of athletes' saliva is significantly higher during aerobic workout than anaerobic exercise. Salivary biomarkers such as lactate concentration, catalase activity, total protein concentration, calcium, potassium, magnesium ions, and the amide IV group may have a significant effect on the enhancement of light emission in a bioluminescent assay based on a system of coupled enzymatic reaction. The amide IV group and the presence of the salivary oligosaccharides, polysaccharides, phosphatase, and phospholipids in athletes during anaerobic physical activity can eliminate bioluminescence more efficiently than the concentration of triene conjugates and the amide II group in the saliva of athletes involved in aerobic exercises. Thus, significant biomarkers for the measurement of the physiological status of athletes who engaged in aerobic or anaerobic physical activity have been identified in saliva, these biomarkers can influence the integrated response of the bioluminescent enzymatic biotest. The change in the integrated bioluminescent indicator of athletes' saliva depending on the type of physical exertion can be used in sports medicine to prevent physical overload.

Keywords: bioluminescent enzymatic bioassay, biochemical analysis, infrared Fourier spectroscopy, saliva, aerobic and anaerobic exercise, sports medicine