

## АНАЛИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ К ГЛУТАМАТУ И ГАМК ДЛЯ ОЦЕНКИ ТРЕНИРОВОЧНОГО ПРОЦЕССА СПОРТСМЕНА

Мягкова М.А.<sup>1</sup>, Петроченко С.Н.<sup>1</sup>, Орлова Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, Черноголовка, e-mail: dianark777@mail.ru

Объективное определение биоресурсов и возможностей организма людей, деятельность которых связана с экстремальными условиями, в частности спортсменов, испытывающих повышенные физические нагрузки, является важной задачей для специалистов и тренеров, занимающихся подготовкой профессионалов, в связи с постоянной необходимостью улучшения спортивных результатов и эффективности работы сотрудников. Методом иммуноферментного анализа проведено определение уровня естественных антител к глутамату и ГАМК. В качестве материалов исследования использовали образцы сыворотки крови 22 борцов-спортсменов, квалифицирующихся в греко-римской борьбе. Контрольными образцами служили пробы сыворотки крови 42 здоровых добровольцев. Иммунохимические показатели уровня антител измеряли в соответствии с запланированным тренировочным циклом. Выполнено три этапа с интервалом 14 дней: в начале, середине и в конце тренировочного процесса. Обнаружено достоверное повышение уровня естественных антител к ГАМК и глутамату для борцов по сравнению с контрольной группой. Установлена взаимосвязь иммунологических показателей, измеренных до и после нагрузки. Коэффициенты корреляции составили для уровня антител к ГАМК  $r = 0,80$ , к глутамату  $r = 0,72$  ( $p < 0,05$ ). Разработан новый метод оценки функционального состояния спортсмена на основе измерения иммунологических показателей для коррекции нагрузок в учебно-тренировочном процессе с целью достижения максимального спортивного результата. Результаты обследования групп спортсменов показали возможность практического применения диагностического теста для оценки тренировочного процесса у лиц, имеющих повышенную физическую нагрузку.

Ключевые слова: диагностические маркеры, глутаминовая и гамма-аминомасляная кислоты; адаптационный потенциал; физическая нагрузка; иммуноферментный анализ.

## ANALYSIS OF NATURAL ANTIBODIES TO GLUTAMATE AND GAMK FOR EVALUATION OF THE TRAINING PROCESS OF THE ATHLETE

Myagkova M.A.<sup>1</sup>, Petrochenko S.N.<sup>1</sup>, Orlova E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FGBU of Science «Institute of Physiologically Active Substances» of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, e-mail: dianark777@mail.ru

An objective definition of the bioresources and possibilities of the body of people, whose activities are associated with extreme conditions, in particular, and athletes experiencing increased physical exertion, is an important task for professionals and trainers engaged in training professionals, due to the constant need to improve sports performance and employee performance. The level of natural antibodies to glutamate and GABA was determined by the method of enzyme immunoassay. As materials of the study used samples of blood serum of 22 athletes engaged in the Greco-Roman wrestling. Control samples were blood serum samples of 42 healthy volunteers. Immunochemical parameters of the antibody level were measured in accordance with the planned training cycle. Three stages were performed with an interval of 14 days, at the beginning, at the middle and at the end of the training process. A significant increase in the level of natural antibodies to GABA and glutamate for wrestlers was found in comparison with the control group. The relationship between immunological parameters measured before and after the load was established. Correlation coefficients were for the level of antibodies to GABA  $r = 0.80$ , for glutamate  $r = 0.72$  ( $p < 0.05$ ). A new method for assessing the athlete's functional state was developed on the basis of measuring immunological parameters for correcting loads in the training process in order to achieve the maximum sporting result. The results of the survey of groups of athletes showed the possibility of practical application of the diagnostic test to assess the adaptive capabilities of people with increased physical activity.

Keywords: diagnostic markers, glutamic and gamma-aminobutyric acid; adaptation potential; exercise stress; linked immunosorbent assay.

Известно, что системы эндогенных биорегуляторов (ЭБ) и их состояние

характеризуют биоресурс организма человека и возможность к адаптации. Наиболее важное место среди ЭБ занимают регуляторы, отвечающие за процессы возбуждения и торможения, – это глутаминовая и гамма-аминомасляная кислоты (ГАМК) [1–3]. Иммунная система отражает метаболические перестройки, которые происходят в организме человека при изменяющихся условиях внутреннего и внешнего окружения [4, 5]. Физический и психоэмоциональный потенциал каждого человека полностью определяется его уникальной структурой взаимодействия системы ЭБ. Разработка методов контроля содержания эндогенных регуляторов физиологических процессов, поддерживающих гомеостатическое равновесие организма, является актуальной задачей. Для определения указанных веществ обычно применяют способы анализа на основе хроматографии или иммунохимии. Это высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), иммуноферментный и радиоиммунный анализы (РИА, ИФА) [2, 5]. На сегодняшний день изменились масштабы в оценке диагностических возможностей применения самих антител, отражающих состояние и уровни эндогенных биорегуляторов. На смену распространенным методом иммуноанализа с участием искусственно полученных иммунизацией антител, иммунохимические свойства которых непосредственно позволяют измерить концентрацию ЭБ, пришло определение природных, постоянно присутствующих в кровотоке антител к регуляторам гомеостаза. Хорошо известно, что уровни эндогенных соединений могут колебаться в соответствии с биоритмами организма. Однако указанные концентрационные всплески ЭБ отражаются и закрепляются в системе гуморального иммунитета, касающейся приобретения новых качественных и количественных свойств естественных антител (е-Ат). Составная часть иммунной системы е-Ат обеспечивает длительное гомеостатическое равновесие в кровотоке [1, 5]. Молекулы е-Ат принимают участие в физиологических реакциях, направленных на регуляцию иммунных процессов поддержания внутреннего постоянства организма, обеспечение биохимического метаболизма за счет контролирования действия биологически активных веществ с учетом их функции переносчика и защиты от чужеродных веществ [2]. Известно, что различные функциональные состояния организма сопровождаются сдвигами в содержании е-Ат, связанными с изменением обменных процессов ключевых эндогенных мишеней развития заболевания или обеспечивающих физиологическую норму [6, 7]. Решить задачу диагностики функционального состояния организма позволит разработка метода определения уровня е-Ат, которые сохраняют все изменения системы ЭБ.

Спортивная деятельность человека связана с физическими нагрузками различной интенсивности, в которой принимает непосредственное участие универсальный механизм адаптации [8]. Индивидуальные физиологические характеристики спортсмена определяют его возможности при выполнении той или иной программы [4]. Поэтому

сложно объективно выявить момент, когда спортсмен достигает своего предела. В этом случае могут проявиться как недостаточность нагрузок, так и негативные последствия для здоровья при избыточной нагрузке. Важной задачей, стоящей перед тренерами, занимающимися со спортсменами, и специалистами, готовящими профессионалов для работы в экстремальных условиях, включая повышенную физическую нагрузку, является разработка объективных способов оценки резервов организма человека.

**Цель исследования** заключалась в разработке метода определения естественных антител к глутаминовой и гамма-аминомасляной кислоте в сыворотке крови, проведении анализа сравнительного содержания антител для спортсменов, различающихся специализацией, физической нагрузкой, и лиц, занимающихся оздоровительным спортивным комплексом, установлении возможности практического применения иммунологических показателей в оценке тренировочного процесса спортсмена.

### **Материалы и методы**

Иммунохимические исследования проводили с применением перечисленных ниже методов и материалов: антивидовые овечьи антитела против иммуноглобулинов G и M человека, меченные пероксидазой, тетраметилендиамин, перекись водорода 20%-ная, твин-20 фирмы «Sigma» (США). Иммуноферментный анализ (ИФА) осуществляли с помощью высокосорбционных планшетов. Результаты ИФА измеряли спектрофотометрически при 450 нм.

Материалами исследования служили образцы сыворотки крови регулярно тренирующихся спортсменов-добровольцев. Это 22 борца-спортсмена в возрасте от 13 до 24 лет, занимающихся греко-римской борьбой. Спортсмены занимались борьбой в среднем от 5 до 14 лет. Образцы сыворотки крови, используемые в анализе, забирали с интервалом 14 дней в 3 этапа. Нулевая точка соответствовала первому этапу, при котором отсутствовала физическая нагрузка. Оценку функционального состояния спортсменов выполняли с помощью измерения уровней е-Ат в 1-й день (1-й этап), на 14-й день (2-й этап) и 28-й день (3-й этап). Участники эксперимента характеризовались отсутствием действующей спортивной дисквалификации, каждый из них дал письменное информированное согласие на участие в исследовании и прошел медицинское освидетельствование. Отбор образцов сыворотки крови для анализа, предоставленных спортивной школой «Спарта» города Москвы, осуществляли в соответствии с графиком до спортивной нагрузки и после ее окончания либо учебно-тренировочного процесса (УТП), запланированного тренером школы. В иммуноанализе контрольными образцами служила кровь 42 здоровых лиц-доноров в возрасте от 18 до 25 лет, занимающихся оздоровительным физкультурным комплексом, предоставленных фитнес-учреждением «Спорт

Форум». У всех испытуемых проводили отбор крови из вены (4 мл) на начальных и окончательных этапах после физической нагрузки через 28 дней. Пробирки термостатировали 30 минут при температуре 37<sup>0</sup>С, выдерживали 18 часов при температуре 4<sup>0</sup>С и откручивали при 3200 об/мин. Образцы для исследования замораживали до момента проведения анализа.

Синтез с использованием полимерной матрицы конъюгата гамма-аминомасляной кислоты. Получение антигена гамма-аминомасляной кислоты на поли(4-нитрофенил)акрилате проводили по приведенной ниже методике. К 12 мг (0,072 ммоль) раствора поли(4-нитрофенил) акрилата в 2 мл диметилформаида добавляли 2,2 мг (0,018 ммоль) гамма-аминомасляной кислоты. Реакционную смесь оставляли на сутки при температуре 20<sup>0</sup>С. Далее инактивировали непрореагировавший активированный п-нитрофениловый эфир 15 мкл 5%-ный раствор аммиака. Упаривали растворитель в вакууме. Образовавшееся масло многократно промывали эфиром и растворяли в 1 мл диметилформаида (ДМФА<sub>абс</sub>), хранили при температуре -20<sup>0</sup>С. Получен конъюгированный антиген гамма-аминомасляной кислоты, включающий 12 молей гаптена на 1 моль полимерного носителя (ГАМК-П).

Синтез на основе полимерной матрицы конъюгированного антигена глутаминовой кислоты осуществляли по аналогичному методу с использованием указанных выше соотношений компонентов. Получен конъюгат, представляющий собой комплекс глутаминовой кислоты и полимерной матрицы, включающий 14 молей гаптена на 1 моль полимерного носителя (глутамат-П).

Определение антител к гамма-аминомасляной и глутаминовой кислоте в сыворотке крови обследованных лиц методом ИФА. На планшет иммобилизовали конъюгированный антиген (по 100 мкл раствора в лунку) в интервале концентрации от 2,5 мкг/мл до 0,15 мкг/мл для конъюгата Глутамат-П и от 5,5 мкг/мл до 0,15 мкг/мл для конъюгата ГАМК-П в 0,02 М растворе бикарбоната натрия (рН 9,5), 18 часов при 4<sup>0</sup>С. Затем трижды отмывали планшет (3\*100 мкл) раствором детергента 0,005% твин-20 в забуференном физрастворе (рН 7,2). Далее в лунки добавляли в 2 повторах в забуференном физрастворе с 0,01%-ным детергентом твин-20 по 100 мкл сыворотки крови пациента в интервале от 1/50 до 1/1000 разведений. Инкубировали содержимое планшета 1 час при температуре 37<sup>0</sup>С. Отмывали по способу, описанному выше, и докапывали по 100 мкл в лунку растворенные в разведении 1/3000 антитела овцы против IgG или IgM человека, содержащих ферментную метку. Снова инкубировали содержимое лунок планшета 1 час при температуре 37<sup>0</sup>С. Отмывали по способу, описанному выше, и докапывали смесь субстрата (по 100 мкл в каждую лунку), растворенную в 0,05 М цитратном буфере. Выдерживали при отсутствии света в течение 15–20 мин и добавляли во все лунки планшета по 50 мкл 10%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Результаты учитывали спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

Определяли индивидуальное содержание антител IgG и IgM класса в сыворотках крови обследуемых спортсменов и контрольных доноров с помощью полученных измерений ИФА. При этом устанавливали достоверное изменение уровня антител. Оценку результатов исследований проводили с использованием среднего значения ( $X_{cp}$ ) и среднеквадратичного отклонения ( $\sigma$ ), критерия Стьюдента ( $t$ ). Нормальность распределения значений уровней антител у спортсменов и здоровых лиц была подтверждена по Колмогорову–Смирнову. Для принятия гипотезы применяли уровень достоверности 95% ( $p=0,05$ ). Анализ различий показателей до и после нагрузки проводили при помощи парного критерия Стьюдента. Степень связи между полученными показателями определяли по уравнению регрессии, учитывая силу связи и ее направление с помощью вычисления коэффициента корреляции ( $r$ ) по Пирсону.

### Результаты

Разработанный ИФА определения е-Ат к гамма-аминомасляной и глутаминовой кислоте был апробирован в группе спортсменов с повышенной физической нагрузкой, различающейся видом спорта. В качестве материала сравнения использовали сыворотку крови лиц, занимающихся оздоровительной физкультурой, одного пола и возраста с обследуемыми спортсменами. Участие глутаминовой и гамма-аминомасляной кислот в биохимических процессах, происходящих в организме обследованных лиц при изменениях физической либо психологической нагрузки, стало основой выбора панели антигенов для определения иммунологических показателей. В таблице 1 представлены сравнительные данные измерения е-Ат к глутамату, ГАМК в кровотоке обследованных лиц, включая контрольную группу и группу спортсменов борцов, для трех этапов. Это 1-й день (1-й этап), 14-й день (2-й этап) и 28-й день (3-й этап).

Таблица 1

Показатели естественных антител ( $OD_{450}$  ИФА,  $X_{cp} \pm \sigma$ ) в сыворотке крови у обследуемых спортсменов

Показатель	Контрольная группа (n=22)	Обследуемая группа, этап (n=22)		
		1	2	3
е-Ат к ГАМК	0,77±0,09	0,86±0,14	0,94±0,1	1,05±0,15*
е-Ат к глутамату	0,81±0,09	0,79±0,16	0,92±0,12	1,19±0,13*

Примечание: \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе

Проводили оценку взаимосвязи изменения иммунологических показателей с различным уровнем нагрузки, который возникает при введении отличий по длительности

занятием спортом. Среди обследованных спортсменов, греко-римских борцов, были выделены три группы. В первую вошли лица со стажем от 11 до 14 лет. Вторую группу составили спортсмены, участвующие в занятиях борьбой от 8 до 10 лет. А спортсмены, стаж занятия борьбой которых составлял от 5 до 7 лет, были включены в третью группу. Проводили анализ образцов сыворотки крови в перечисленных группах спортсменов, которые соответствовали ранее установленным срокам эксперимента (1-й, 14-й и 28-й день). В таблице 2 представлены данные измерения е-Ат для глутамата, ГАМК в кровотоке спортсменов, участвующих в исследовании.

Таблица 2.

Уровень естественных антител в сыворотке крови ( $OD_{450}$  в ИФА,  $x_{cp} \pm \sigma$ ) в группах с различными сроками занятия борьбой

Показатель		е-Ат к ГАМК	е-Ат к Глутамату
Контрольная группа, n=22		0,75±0,12	0,77±0,15
1-я группа (11–15лет), n= 8	1-й этап	0,83±0,09	0,78±0,07
	2-й этап	0,91±0,06	0,93±0,15
	3-й этап	1,19±0,11*	1,21±0,07*
2-я группа (8–10лет), n= 4	1-й этап	0,89±0,08	0,75±0,11
	2-й этап	0,81±0,12	0,99±0,07
	3-й этап	1,08±0,15*	1,10±0,12*
3-я группа (5–7 лет), n= 10	1-й этап	0,87±0,13	0,81±0,07
	2-й этап	1,02±0,12*	0,91±0,08
	3-й этап	1,14±0,15*	1,21±0,08*

Примечание: \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе

Увеличение уровня антител в момент физической нагрузки является косвенным доказательством усиленной выработки нейромедиаторов, задействованных в процессе стабилизации гомеостатического равновесия. Проведено исследование взаимосвязи влияния физической нагрузки на изменения уровней е-Ат до и после тренировки. Коэффициенты корреляции составили ГАМК  $r = 0,80$ , глутамату  $r = 0,72$ , ( $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Известно, что медиаторами физиологических процессов активации и торможения являются глутаминовая и гамма-аминомасляная кислоты. Именно эти аминокислоты обеспечивают гуморальную связь иммунной и нейроэндокринной систем с головным мозгом [7]. Указанные биомолекулы задействованы в физиологических процессах, ответственных за

изменение физической нагрузки [2]. Они имеют наиважнейшее значение при возникновении стрессовых реакций организма, передаче импульсов боли, отвечают за полноценное дыхание, сохранение памяти, способности к обучению и др.

Для создания ИФА е-Ат использовали синтетические конъюгаты – антигены на основе гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот с поли(4-нитрофенил)акрилатом с различным замещением полимерной матрицы молекулами гаптена (100%, 50%, 30%, 10–15% молекул лиганда). Далее изучали влияние структуры синтетического антигена, содержащего различные варианты ковалентной пришивки гаптена, на результат определения в ИФА набора специфических антител из общего пула естественных иммуноглобулинов. Установлено, что наиболее пригодными для обнаружения в индивидуальных образцах сыворотки крови обследуемых лиц иммуноглобулинов, отличающихся по аффинности и концентрации, являются конъюгаты с диапазоном замещения 10–15% ГАМК и глутаматом. Следующий раздел посвящен выявлению иммуноглобулинов к гамма-аминомасляной и глутаминовой кислоте в сыворотке крови пациентов твердофазным ИФА. На полистирольный планшет иммобилизовали указанные выше конъюгированные антигены. Затем выдерживали анализируемые образцы сыворотки крови с адсорбированными на поверхности лунок планшета антигенами и измеряли связавшиеся иммуноглобулины с помощью антивидовых конъюгатов антител для IgG и IgM человека.

Отражение ситуационных перемен концентрации ЭБ в организме может косвенно характеризоваться уровнем специфических антител и динамикой его изменения [6]. Получены сравнительные данные параметров измерения уровней е-Ат для пациентов контрольной группы и спортсменов греко-римской борьбы (табл. 1). Проведенный анализ результатов иммунологического мониторинга позволил установить наличие изменения уровня естественных антител к биорегуляторам у обследованных спортсменов по сравнению с параметрами, полученными для лиц контрольной группы. У спортсменов в среднем в 1-й день начала эксперимента содержание е-Ат не отличалось от нормы в контрольной группе. Далее согласно тренировочному плану происходило увеличение физической нагрузки. При этом отмечается тенденция к изменению уровня е-Ат к глутамату, ГАМК в отличие от группы контроля. Развитие обнаруженного увеличения содержания антител к перечисленным ЭБ происходило уже через 2 недели (к 14-му дню) от начала спортивной тренировки. Однако лишь по прошествии 28 дней тренировочного процесса отмечено достоверное повышение уровня е-Ат к глутамату и ГАМК. Нарастание адаптационного потенциала в группе обследованных спортсменов подтверждается одновременным возрастанием содержания е-Ат к указанным выше ЭБ на заключительном этапе тренировки. Это свидетельствует о приведении в сбалансированное состояние системы возбуждения и торможения.

Анализ результатов определения иммунологических показателей е-Ат к эндогенным биорегуляторам в зависимости от уровня нагрузки для каждой группы спортсменов греко-римских борцов показал неоднородность полученных значений и позволил установить их значимость в диагностическом применении на практике [9]. В ходе эксперимента на 2-м этапе тренировочного процесса для группы борцов, имеющих наименьший стаж занятия спортом, установлено достоверное изменение уровня е-Ат только к ГАМК. Одновременное увеличение уровня антител к глутамату и ГАМК выявлено лишь к 3-му этапу повышения нагрузки. Оно характерно для каждой группы обследованных спортсменов и не зависит от стажа занятия борьбой. При сбалансированности показателей активации и торможения спортсмены демонстрируют стабильную физическую форму, у них повышается устойчивость к стрессу, улучшается настроение, уменьшается беспокойство, что способствует спокойному сну [10].

Таким образом, разработан иммунологический метод определения антител к гамма-аминомасляной и глутаминовой кислоте для оценки тренировочного процесса спортсменов на различных этапах физической нагрузки. Выбор в качестве объекта исследования спортсменов связан с обеспечением однородности группы, отсутствием значительных колебаний в физической подготовке. Методом ИФА определения антител к гамма-аминомасляной и глутаминовой кислоте установлены изменения их содержания в кровотоке людей, применяющих повышенную спортивную физическую нагрузку. Уровень е-Ат косвенно отражает процессы организма человека, характеризующиеся изменением метаболизма указанных биомолекул. Показаны новые диагностические возможности оценки биоресурсов организма на основе определения естественных антител для мониторинга физиологических процессов с участием ГАМК и глутамата. На примере группы обследованных спортсменов установлена принципиальная возможность практического применения диагностического теста измерения естественных антител к указанным биомолекулам.

### Список литературы

1. Poletaev A.B., Stepanyuk V.L., Gershwin M.E. Integrating immunity: the immunculus and self-reactivity. *J. Autoimmun.* 2008. 30. P. 68-73.
2. Мягкова М.А., Мороз В.И. Иммунохимические свойства естественных антител к физиологически активным соединениям // *Фундаментальные исследования.* 2014. №11-5. С. 1066-1070.
3. Casazza G. A., Fernandez D.H., Maddock M. I. Acute modulation of GABA content by



physical activity // J. Neuroscien. 2016. V. 36 (8). P. 2449.

4. Дугнист П.Я., Романова Е.В. Особенности адаптации организма спортсмена к физическим нагрузкам: аналитический обзор // Здоровье человека, теория и методика физической культуры и спорта. 2016. №2. С. 3-13.

5. Пальцев М.А., Полетаев А.Б., Сучков С.В. Аутоиммунитет и аутоиммунный синдром: границы нормы и патологии // Вестник РАМН. 2010. № 8. С. 1–3.

6. Петроченко С.Н., Боброва З.В., Мягкова М.А., Спасский А.А., Ледовской С.М., Ильина А.К., Михайлов А.А. Определение антител к эндогенным биорегуляторам для оценки функционального состояния здоровья спортсменов // Клиническая лабораторная диагностики. 2017. Т. 62. № 2. С. 346-350.

7. Захарьева Н.Н., Яшкина Е.Н. Прогноз физиологического тестирования для спортивного отбора гимнасток-художниц высокой квалификации // Теория и практика физической культуры и спорта. 2017. № 1. С. 75-80.

8. Nazarenko L.D., Panova E.E., Valkina O.N. Theoretical importance substantiation of taking into consideration adaptation regularities of an organism during the process of sports training. Russian Journal of Physical Education and Sport. 2018. V. 13 (1). P. 138–144.

9. Jin Z1, Mendu SK, Birnir B. GABA is an effective immunomodulatory molecule. Amino Acids. 2013. 45(1). P. 87-94.

10. Anna M Hansen, Rachel R Caspi. Glutamate joins the ranks of immunomodulators. Nat. Med. 2010. 16(8). P. 856–858.