

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Дудко Г.А.<sup>1</sup>, Дикунец М.А.<sup>1</sup>, Вирюс Э.Д.<sup>2</sup>, Крючков А.С.<sup>1</sup>

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В СПОРТЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр физической культуры и спорта», 105005, Москва, Россия;

<sup>2</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, Москва, Россия

*В настоящем литературном обзоре приводится анализ достоинств и ограничений объектов биохимического контроля функционального состояния атлетов, а также перспективы использования альтернативных объектов для спортивной медицины. Традиционно инвазивные процедуры отбора биоматериала (венозная кровь, мышечная биопсия) являются золотым стандартом для исследования широкого спектра биомаркеров, которые могут использоваться в качестве эффективных диагностических инструментов контроля протекания адаптационных процессов, мониторинга работоспособности, перетренированности и общего состояния здоровья организма спортсменов, но эти методы болезненные, времязатратные и предъявляют ряд требований к хранению и транспортировке. В этой связи, актуальным является вопрос поиска альтернативных объектов для биохимического исследования, не имеющих вышеперечисленных недостатков. Не менее информативными и перспективными объектами биохимического мониторинга состояния спортсменов могут являться слюна и сухие пятна крови (СПК). Неинвазивный характер сбора слюны позволяет ускорить процесс проб-отбора, снизить уровень гормона стресса и риск возможного инфицирования, при ее отборе не требуется специальное оборудование и квалифицированный медицинский персонал, что особенно актуально при нахождении спортсменов на учебно-тренировочных мероприятиях. Техника СПК успешно зарекомендовала себя с целью неонатального скрининга и изучения фармакокинетики лекарственных средств. Основными ее преимуществами являются простота отбора, малый объем биоматериала, высокая стабильность адсорбированных маркеров на поверхности карточек, отсутствие специальных требований к хранению и транспортировке, сокращение расходов на доставку образцов в лабораторию. В совокупности перечисленные преимущества позволяют повысить частоту отбора биоматериала для точечного отслеживания влияния нагрузок на различные системы организма спортсменов. Сочетание СПК с иммунохимическим и масс-спектрометрическим методами может служить эффективным инструментом для исследования роли различных биомаркеров в рамках мониторинга функционального состояния спортсменов. Поиск научных материалов осуществляли в базе данных MedLine по ключевым словам «dry blood spots», «saliva», «sports medicine», «sample collection», «sports biochemistry».*

**Ключевые слова:** биохимический анализ; биологическая жидкость; сухие пятна крови; слюна; спорт; обзор.

**Для цитирования:** Дудко Г.А., Дикунец М.А., Вирюс Э.Д., Крючков А.С. Альтернативные и перспективные объекты биохимического анализа в спорте (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (11): 655-660. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-655-660>

**Для корреспонденции:** Дудко Григорий Алексеевич, ст. науч. сотр. лаб. проблем спортивной подготовки; e-mail: [dudko@vniifk.ru](mailto:dudko@vniifk.ru)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.04.2021

Принята к печати 21.05.2021

Опубликовано 29.11.2021

*Dudko G.A.<sup>1</sup>, Dikunec M.A.<sup>1</sup>, Virjus E.D.<sup>2</sup>, Krjuchkov A.C.<sup>1</sup>*

### ALTERNATIVE AND PROMISING TARGETS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS IN SPORT (REVIEW OF LITERATURE)

<sup>1</sup>Federal science center for physical culture and sport, 105005, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>The institute of general pathology and pathophysiology, 125315, Moscow, Russia.

*Current literature review provides an evaluation of advantages and limitations of biochemical control objects representing functional state of athletes as well as the outlook for using alternative targets regarding sports medicine. Traditionally, invasive procedures (venous blood collection, muscle biopsy) have been known as the gold standard for analyzing a wide range of biomarkers which could be employed as effective diagnostic tools to control the course of adaptation processes, monitor performance, overtraining and physical well-being of athletes, but these techniques are painful, time-consuming and place demands on storage and shipment. In this behalf finding an alternative objects for biochemical research that does not have disadvantages given above is the question of present interest. Saliva and dry blood spots (DBS) could serve as equally informative and promising targets for monitoring athletes' condition. The non-invasive nature of saliva collection allows to shorten sample collection time, reduce stress hormones levels and possible infection contamination. Moreover, collecting saliva process does not require special equipment and trained medical staff which is particularly important when athletes are at training camps. The DBS method has successfully proven itself with regard to neonatal screening and pharmacokinetics studies. Its key benefits are simplicity, small volume of bioliquid, enhanced stability of adsorbed biomarkers on the card surface, lack of special storage and transportation requirements and low costs for samples shipment to the laboratory. Taken together outlined advantages will provide the opportunity to increase the frequency of biomaterial collection to perform selective observation of training loads effects on various systems of athletes' body. The combination of DBS with immunochemical and mass-spectrometric approaches could serve as an efficient instrument to investigate the role of various biomarkers in monitoring the functional state of athletes. We searched for articles in MedLine database with the key words «dry blood spots», «saliva», «sports medicine», «sample collection», «sports biochemistry».*

**Key words:** biochemical analysis; biological fluid; dry blood spots; saliva; sports; review.

**For citation:** Dudko G.A., Dikunec M.A., Virjus E.D., Krjuchkov A.C. Alternative and promising targets of biochemical analysis in sport (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (11): 655-660 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-11-655-660>

**For correspondence:** *Dudko Grigoriy Alekseevich*, senior scientist of Sports preparation research laboratory; e-mail: [dudko@vniifk.ru](mailto:dudko@vniifk.ru)

**Information about authors:**

Dudko G.A., <https://orcid.org/0000-0002-1064-3283>;  
Dikunec M.A., <https://orcid.org/0000-0002-5945-0722>;  
Virjus E.D., <https://orcid.org/0000-0001-9371-6494>;  
Krjuchkov A.S., <https://orcid.org/0000-0001-9423-8092>.

**Conflict of interests.** *The authors declare about conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 21.04.2021

Accepted 21.05.2021

Published 29.11.2021

Для оценки динамики функционального состояния организма спортсмена во время тренировочного процесса наряду с педагогическими, используются и медико-биологические методы контроля, в частности, биохимический. Основной принцип, который должен быть положен в основу системы использования биохимических показателей в качестве средств контроля за оперативным, текущим и этапным состоянием спортсменов с учетом специализации спортсмена, предлагаемых нагрузок, этапа годового цикла и текущих тренировочных задач, – это непрерывный мониторинг динамики биохимических показателей на всем протяжении годового цикла подготовки. Целью динамического контроля за варьированием биохимических показателей является выявление индивидуальных коридоров их изменчивости под влиянием тренировочных нагрузок на различных периодах и этапах подготовки.

Для определения широкого спектра биомаркеров с целью мониторинга работоспособности, перетренированности и функционального состояния организма спортсменов чаще всего используют инвазивные процедуры получения биоматериала, в результате которых происходит микротравматизация мягких тканей [1]. Распространенными инвазивными процедурами применительно к спортивной медицине относятся отбор крови (сыворотки и/или плазмы) и мышечная биопсия. При использовании неинвазивного способа и отбора биоматериала не нарушается целостность кожного покрова и отсутствует контакт инородного предмета со слизистыми оболочками или внутренней полостью тела, например, отбор мочи, слюны, пота и методы визуализации (электрокардиограмма, компьютерная и магнитно-резонансная томографии).

Несмотря на то, что различные инвазивные и неинвазивные процедуры отбора биоматериала обладают теми или иными преимуществами относительно друг друга, систематический пробоотбор как у любителей, так и у спортсменов высокой квалификации, требует практического подхода, который не только не должен нарушать тренировочный процесс, но и быть удобным для тренерского штаба. Принимая во внимание большое количество исследований, посвященных изучению влияния физических нагрузок на организм спортсменов, можно заключить, что общий консенсус научных работ основывается на инвазивном подходе, вероятно, в результате большого количества потенциальных биомаркеров, доступных в сыворотке и плазме, а также многочисленных

литературных данных и, следовательно, возможности сравнения полученных результатов.

При проведении биохимических исследований, направленных на мониторинг функционального состояния спортсмена, в ходе текущего биохимического контроля тренировочного процесса анализ крови необходимо проводить многократно в зависимости от задач, например, до и после нагрузки, на следующий день, в динамике нагрузки. В связи с этим, многократная инвазивная процедура забора крови исключена. Кроме того, многократный отбор венозной крови не находит одобрения со стороны антидопинговых служб. Пробоотбор крови из периферической вены является болезненной, трудоемкой и времязатратной процедурой. Особенно это касается командных видов спорта, где принимает участие большое количество спортсменов, а также в детско-юношеском спорте. Инвазивные процедуры также вызывают значительный стресс у спортсмена, это может повлиять на секрецию некоторых гормонов стресса, таких как кортизол [2, 3]. Эти факторы становятся особенно важными при изучении количественной оценки стресса после физической нагрузки, которые могут привести к получению ложноположительных результатов и переоценке стресса, вызванного нагрузкой.

Внедрение практики, включающей использование неинвазивных методов, позволяющих точно оценивать вызванные нагрузками физиологический и психологический стрессы, важно для длительного непрерывного мониторинга динамики состояния спортсмена. Дополнительным преимуществом использования слюны по сравнению с отбором крови является простота устройств для сбора материала [4].

**Слюна.** Слюна – бесцветная жидкость, состоящая на 98 % из воды, плотностью 1002–1012 г/л и pH ~6.64 [5, 6], содержащая гормоны, пептиды, электролиты, муцин, антибактериальные соединения и различные ферменты [7]. Концентрация большинства этих соединений в слюне гораздо ниже, по сравнению с плазмой или сывороткой, тем не менее, они надежно отражают концентрации биомаркеров в крови [8, 9].

Секреция слюны в значительной степени управляется нейронным контролем вегетативной нервной системы, которая в свою очередь косвенно регулирует скорость выделения слюны. Последняя зависит от типа активируемого вегетативного рецептора, что влияет на состав биоматериала. Парасимпатическая холинергическая нервная стимуляция вызывает вазодилатацию

капилляров, снабжающих слюнные железы, тем самым усиливая кровоток. Следовательно, повышенный приток крови к железам связан с более высокой скоростью секреции слюны [10]. Несмотря на то, что парасимпатическая холинергическая стимуляция значительно влияет на нейронный контроль секреции слюны, стимуляция симпатической адренергической нервной системы также участвует в секреции биожидкости. Так, слюна, выделяемая подъязычной и малыми слюзистыми железами, регулируется стимуляцией симпатических нервов, в то время как секреция из околоушной и подчелюстной желез – стимуляцией парасимпатической иннервации [11]. Нормальная секреция слюны складывается из совместного действия парасимпатической и симпатической иннерваций, причем основным стимулом к увеличению секреции является стимуляция парасимпатического возбуждения [12]. Секреция слюны, индуцированная парасимпатической стимуляцией, характеризуется водянистым потоком слюны, содержащим незначительные концентрации органических и неорганических соединений [7]. Симпатическая стимуляция, напротив, приводит к выработке низкого объема биоматериала, который богат содержанием органических соединений ( $\alpha$ -амилазы) и неорганических солей ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$ ) [13]. Следовательно, повышенный уровень  $\alpha$ -амилазы в слюне может служить потенциальным индикатором повышенной активности симпатической нервной системы [14]. В состоянии покоя у здоровых людей нестимулированная слюна выделяется со скоростью 0.30–0.65 мл/мин, тогда как стимуляция слюноотделения увеличивает скорость до 6.0 мл/мин [15,16]. Физические упражнения вызывают усиление симпатической активации, как следствие, интенсивные нагрузки могут привести к снижению скорости выделения слюны и изменить ее состав. Так, например, при длительных нагрузках, превышающих лактатный порог, скорость слюноотделения снижается [17]. Факторы, связанные с низкой секрецией слюны при высокоинтенсивных тренировках (> 60 % максимального потребления кислорода), включают активацию симпатических нервов, обезвоживание и гипервентиляцию, приводящие к потере жидкости за счет ее испарения. Тем не менее, парасимпатическая абстиненция более важна, чем симпатическая активация, поскольку она снижает скорость слюноотделения во время нагрузок [14].

Концентрации маркеров в слюне выражаются в 4-х различных единицах измерения:

1. абсолютная (мкг/мл, нмоль/л);
2. относительно скорости секреции (мкг/мин), применяемая к биомаркерам, концентрация которых зависит от скорости слюноотделения [18,19];
3. относительно массы белка (мкг/мг белка);
4. относительно осмоляльности слюны (мг/мосм), применяющейся в случае низкой скорости потока биожидкости [20].

В литературе наиболее часто встречаются два метода отбора слюны: с использованием ватных тампонов и пассивное слюноотделение в контейнер [21]. Преимущества сбора на ватные тампоны заключаются в минимизации риска кровотечения из десен и комфорте процедуры отбора биожидкости. Однако отбор биоматериала вторым методом является более надежным, поскольку материалы на основе хлопка или полиэстера имеют тенденцию повышать кислотность образца [1] и приводить к искажению количественного состава слюны [22], поскольку перемещение ватного тампона в

ротовой полости может стимулировать разные железы, тем самым влияя на ее состав [14]. Очевидным преимуществом метода пассивного слюноотделения является возможность определения скорости образования слюны путем фиксации времени отбора в предварительно взвешенный контейнер. Однако преимущества и недостатки описанных методов подвергаются сомнению, поскольку стимуляция слюноотделения влияет далеко не на все компоненты биоматериала. Например, изменение скорости слюны не влияет на концентрацию стероидных гормонов, так как они переносятся из крови методом пассивной диффузии, и, наоборот, скорость слюноотделения влияет на концентрацию IgA: при увеличении или уменьшении скорости абсолютное содержание IgA или уменьшается за счет разбавления, или увеличивается за счет концентрирования, соответственно [23].

Таким образом, альтернативным объектом биохимического исследования является слюна – биологическая жидкость с уникальным исследовательским потенциалом, получаемая неинвазивным способом, не имеющая ограничений по частоте отбора и объему образца, не требующая условий стерильности и не связанная с этическими ограничениями. Состав слюны практически полностью идентичен таковому в фракциях цельной крови и тесно связан с гомеостазом, а ее компоненты могут выступать в качестве количественных маркеров протекающих в организме процессов обмена веществ.

**Сухие пятна крови.** Традиционно, образцы цельной крови отбирают методом венопункции в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт, а для последующего хранения и транспортировки охлаждают. В зависимости от распределения определяемого биомаркера в различных компонентах крови биожидкость могут дополнительно разделять на фракции, например, плазму, эритроциты и мононуклеарные клетки периферической крови. С практической точки зрения плазма или сыворотка предпочтительнее цельной крови, ввиду возможного разрушения эритроцитов, затрудняющего дальнейшие стадии работы с биоматериалом. Однако для всех этих образцов хранение и транспортировка накладывают ряд неотъемлемых требований к логистике, а именно наличие холодильника, морозильника или сухого льда, что приводит к значительным расходам.

Об использовании сухих пятен крови (dried blood spots, СПК) в качестве альтернативной методики отбора биологических образцов для целей педиатрии R.Guthrie и соавт. [24] сообщили более 50 лет назад. Принцип СПК заключается в нанесении нескольких капель капиллярной крови, полученных в результате прокола кожи на пятке или пальце руки, на фильтровальную бумагу в форме карты (также известной как «карта Гутри») и последующей сушке без какой-либо дополнительной обработки. С химической точки зрения, определяемые соединения адсорбируются с компонентами крови на твердой матрице.

Образцы крови наносятся на специальные карточки, обладающие рядом весомых практических преимуществ: низкая стоимость; относительная простота изготовления и печати (маркировка и отслеживание образцов); предварительная химическая пропитка (в зависимости от целей применения); хорошие адсорбционные свойства [25]. На текущий момент коммерчески доступные бумажные карточки на основе целлюлозы для СПК производятся несколькими производителями, которые можно разделить на две группы: необработанные



ные и химически подготовленные. Необработанные карточки – 100% чистая хлопковая целлюлоза («Whatman 903», GE Healthcare Life Sciences, США; «Ahlstrom 226», PerkinElmer Health Sciences, США) – наиболее часто используют в программе скрининга новорожденных. Данные марки карточек зарегистрированы Управлением по надзору за пищевыми продуктами и лекарственными средствами (FDA) и Европейским союзом (ЕС) как медицинские изделия для *in vitro* диагностики класса II.

Вторая группа карточек изготавливается из целлюлозы, обработанной различными химическими веществами, например, додецилсульфатом натрия (< 5 %), трис-(гидроксиметил)аминометаном (< 5 %), гуанидинтиоционатом (30–50 %). Карточки этой группы не зарегистрированы как медицинские изделия. Изначально они разработаны для анализа нуклеиновых кислот, а добавление химических веществ предназначено для лизиса клеток, инактивации патогенных микроорганизмов, денатурации ферментов и других белков.

Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) разработано руководство по отбору образцов крови на данные адсорбционные материалы, поскольку способ отбора может привести к расхождению результатов [26]. Для стимуляции местного кровотока перед проколом разрешается сделать массаж или нагреть места отбора. После чего оно обрабатывается 70 % раствором изопропанола и прокалывается одноразовым стерильным ланцетом. Во избежание вытекания межклеточной жидкости первая капля крови удаляется, последующие наносятся на бумагу. Круги, напечатанные на бумаге (диаметр 12 мм), должны быть заполнены полностью и однородно. Образцам дают высохнуть при комнатной температуре в горизонтальном положении карточки (3–4 ч), после чего отправляют в лабораторию.

Адсорбция и твердая поверхность матрицы для получения СПК по большей части снижают реакционную способность анализируемых соединений по сравнению с жидкой кровью. Одним из ключевых преимуществ СПК является то, что при соблюдении нескольких простых мер предосторожности (упаковка карт в герметичные пакеты с осушителем) биомаркеры демонстрируют превосходную стабильность при температуре окружающей среды: от нескольких дней, а в ряде случаев и до нескольких месяцев. Кроме того, некоторые соединения нестабильны *ex vivo* в биологических жидкостях (например, в цельной крови и плазме) и требуют адаптированных процедур для предотвращения деградации [27, 28]. В таких случаях выбор техники СПК позволяет улучшить стабильность соединений без необходимости выполнения вышеупомянутых процедур. Использование СПК значительно упрощает пробоподготовку и кратковременное хранение, позволяя избежать необходимости в специальном лабораторном оборудовании (центрифуги, гомогенизаторы, холодильники, морозильники). Кроме того, анализ СПК снижает или устраняет риски биологической опасности. Доставка СПК до лабораторий осуществляется обычными почтовыми конвертами или курьерским транспортом, тогда как образцы плазмы должны транспортироваться на сухом льду. Транспортировка биоматериала с использованием сухого льда попадает под действие специальных правил Международной ассоциации воздушного транспорта и относится к грузам 9 класса опасности. van Amsterdam и соавторы [29] заявили, что 30 % посылок с сухим льдом имели проблемы с отправлением из-за неправильной упаковки

или неверно заполненной транспортной документации. Транспортировка СПК по сравнению с образцами цельной крови или ее фракций требует облегченных логистических процедур и представляет собой предпочтительный формат доставки биоматериала, особенно если исследования должны проводиться в удаленных местах или регионах с ограниченными ресурсами.

Помимо логистических требований преимущества СПК заключаются в простоте отбора биологического материала – необходимо сделать один прокол, с этой нетрудной операцией может справиться любой человек [30 – 32], тогда как для отбора венозной крови требуется квалифицированный медицинский специалист (флебологист). Несмотря на то, что процесс прокалывания остается в определенной степени инвазивным, показано, что он более «удобен для пациента», лучше переносится и менее болезнен, чем венепункция [31, 33, 34]. С другой стороны, объем крови для нанесения на фильтровальную бумагу довольно мал (обычно несколько десятков микролитров), тогда как для стандартного отбора проб венозной крови в пробирки требуется от 0.1 мл до нескольких миллилитров биожидкости. СПК представляют особый интерес в случае тестирования спортсменов детско-юношеских школ.

Небольшое количество биоматериала и многокомпонентность матрицы приводят к аналитическим трудностям с точки зрения чувствительности и селективности определения информативных биомаркеров, что в совокупности может снизить интерес к использованию СПК. В рамках скрининга новорожденных, учитывая большое количество анализируемых образцов, пропускная способность и стоимость являются определяющими факторами в пользу выбора того или иного метода пробоотбора. С исторической точки зрения, с момента появления СПК в начале 1960-х гг. для целей неонатального скрининга предложены два ключевых методологических направления, позволивших нивелировать вышеуказанные аспекты. Первый из них – иммунохимический анализ (ИХА), для широкого применения которого в 1970-х гг. было развернуто производство моноклональных антител, что впоследствии привело к разработке коммерчески доступных диагностических наборов для большого количества биомаркеров. Безусловно, ИХА биологических субстанций сыграл важную роль в клиническом анализе и до сих пор используется в рамках программы неонатального скрининга. Однако из-за перекрестной реактивности с мешающими компонентами матрицы иммунохимические методики недостаточно селективны, разработка новых методик является времязатратным процессом, связанным с производством новых моноклональных антител, диагностические наборы имеют высокую стоимость.

Вторым ключевым методом анализа биомаркеров в СПК является масс-спектрометрия (МС), первое применение которого упоминается в работе J.Мее и соавт. [35]. Технический прогресс и расширение знаний в области МС привели к разработке технологии тандемной МС, которая оказалась одним из самых значительных достижений в области клинической диагностики и послужила толчком к сдвигу устоявшейся парадигмы «один анализ – одно заболевание» к модели «один анализ – множество болезней», когда в одном анализе стало возможным быстро детектировать несколько маркеров [36].

В последние годы многие фармацевтические компании проводят количественный анализ лекарственных

средств и их метаболитов в СПК. Такой интерес вызван несколькими причинами: (1) сокращение затрат на транспортировку и логистику в многоцентровых исследованиях, (2) более удобная техника сбора образцов крови и (3) сокращение количества лабораторных животных на стадии доклинических испытаний.

В течение последнего десятилетия активно исследуется возможность использования СПК в качестве дополнительной матрицы в области допинг-контроля, поскольку при тестировании на наличие/отсутствие запрещенных субстанций первостепенное значение имеет надежный, недорогой и простой способ пробоотбора [37]. СПК, как дополнительная матрица, дает возможность увеличить количество точек антидопингового контроля спортсменов и, следовательно, расширить и улучшить стандартные программы тестирования во внесоревновательный период. С помощью техники СПК могут быть сужены аналитические ограничения, связанные с короткими временными окнами обнаружения ряда метаболитов допинговых субстанций. Техника СПК может успешно применяться для тестирования и в соревновательный период, поскольку факт приема запрещенных веществ, повышающих результативность выступления, неоспоримо доказываемся фармакологически значимым изменением их концентраций в крови. Это имеет решающее значение в отношении субстанций, запрещенных только в соревновательный период, а также для пороговых соединений [38]. Таким образом, определение текущей концентрации запрещенного вещества в кровотоке спортсмена имеет преимущества для обеих сторон: тестирующие органы получают информацию о концентрации активной формы соединения и, следовательно, могут более точно оценить ее значимость, тогда как у спортсмена есть возможность доставить образец СПК для подтверждения отсутствия запрещенной субстанции в случае, если в образце его мочи обнаружен (неактивный) метаболит, косвенно указывающий на нарушение антидопинговых правил. В обоих случаях результаты анализа СПК, несомненно, повлияют на последующие санкции в отношении спортсмена [39].

Еще одним важным преимуществом СПК в области борьбы с допингом является возможность длительного хранения большого количества карточек (эквивалентных допинг-пробам), отобранных на крупных спортивных мероприятиях, для последующего ретроспективного анализа с использованием более чувствительных методов анализа. На данный момент учеными в области антидопингового контроля разработаны МС методики количественного определения ряда стимуляторов (кокаин, амфетамин, псевдоэфедрин), JWH-018 и сальбутамола [38], анаболических андрогенных стероидов (станозолол, дегидрохлорметилтестостерон) [39], а также 46 пептидных и непептидных агонистов рецепторов грелина, гонадорелина, гормона роста и вазопрессина [40].

**Выводы.** На основании проведенного анализа литературных данных можно сделать вывод о том, что слюна, рассматриваемая нами как альтернативный объект биохимического контроля в спорте, может предоставить количественную нейрофизиологическую оценку динамики состояния организма спортсмена с использованием неинвазивной процедуры. Простота техники отбора и широкая панель информативных биомаркеров значительно расширят возможности мониторинга оперативного, текущего и этапного состояний спортсмена.

Техника СПК, успешно зарекомендовавшая себя в педиатрии и фармакологии, а также активно развивающаяся в области антидопингового контроля, представляется нам перспективным объектом биохимического мониторинга. Обладая такими уникальными преимуществами, как малый объем образца, высокая стабильность биомаркеров, отсутствие специальных требований к хранению и транспортировке и низкие сопутствующие расходы, она в сочетании с современными высокотехнологичными методами анализа способна придать новый импульс к развитию и совершенствованию программ тестирования спортсменов всех возрастных групп.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mosby. Mosby's medical dictionary, 8<sup>th</sup> ed. St. Louis, Mo.: Elsevier; 2009.
2. Eastell R., Brandi M.L., Costa A.G., D'Amour P., Shoback D.M., Thakker R.V. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the Fourth International Workshop. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99(10): 3570-9.
3. Weckesser L.J., Plessow F., Pilhatsch M., Muehlhann M., Kirschbaum C., Miller R. Do venepuncture procedures induce cortisol responses? A review, study, and synthesis for stress research. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;46: 88-99.
4. Lindsay A., Lewis J.G., Scarrot C., Gill N., Gieseg S.P., Draper N. Assessing the effectiveness of selected biomarkers in the acute and cumulative physiological stress response in professional rugby union through non-invasive assessment. *Int. J. Sports Med.* 2015;36(6): 446-54.
5. Schneyer L.H., Young J.A., Schneyer C.A. Salivary secretion of electrolytes. *Physiol. Rev.* 1972;52(3):720-7.
6. Kreuzer W., Heidland A., Hennemann H., Wigand M.E., Knauf H. Mono- and divalent electrolyte patterns, pCO<sub>2</sub> and pH in relation to flow rate in normal human parotid saliva. *Eur. J. Clin. Invest.* 1972;2(6): 398-406.
7. Chicharro J.L., Lucia A., Perez M., Vaquero A.F., Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Med.* 1998;26(1):17-27.
8. Cadore E., Lhullier F., Brentano M., Silva E., Ambrosini M., Spinelli R. et al. Correlations between serum and salivary hormonal concentrations in response to resistance exercise. *J. Sports Med.* 2008;26(10):1067-72.
9. Sannikka E., Terho P., Suominen J., Santti R. Testosterone concentrations in human seminal plasma and saliva and its correlation with non-protein-bound and total testosterone levels in serum. *Int. J. Androl.* 1983;6(4):319-30.
10. Baum B.J. Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.* 1987;66(1):628-32.
11. Bokemeyer C., Bondarenko I., Hartmann J.T., de Braud F., Schuch G., Zube A. et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann. Oncol.* 2011;22(7):1535-46.
12. Ramos D., Martins E.G., Viana-Gomez D., Casimiro-Lopez G., Salerno V.P. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2013;38(5):507-11.
13. de Oliveira V.N., Bessa A., Lamounier R.P.M.S., de Santana M.G., de Mello M.T., Espindola F.S. Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test. *Int. J. Sports Med.* 2010;31(6):377-81.
14. Turpeinen U., Hamalainen E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;27(6):795-801.
15. Heintze U., Birkhed D., Bjorn H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed. Dent. J.* 1983;7(6):227-38.
16. Watanabe S., Dawes C. The effects of different foods and concentrations of citric acid on the flow rate of whole saliva in man. *Arch. Oral Biol.* 1988;33(1):1-5.
17. Pilardeau P., Richalet J.P., Bouissou P., Garnier M., Vaysse J., Margo J.N. et al. Secretion salivaire et exercice physique. *Med. Sport.* 1992;66(3-4):111-4.

BIOCHEMISTRY

18. Bosch J.A., Ring C., de Geus E.J.C., Veerman E.C.I., Amerongen A.V.N. Stress and secretory immunity. *Int. Rev. Neurobiol.* 2002;52:213-53.
19. Bishop N.C., Walker G.J., Scanlon G.A., Richards S., Rogers E. Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2006;38(3):513-9.
20. Sari-Sarraf V., Reilly T., Doran D.A., Atkinson G. The effects of single and repeated bouts of soccer-specific exercise on salivary IgA. *Arch. Oral. Biol.* 2007;52(6):526-32.
21. Granger D.A., Weisz J.R., McCracken J.T., Kauneckis D., Ikeda S. Testosterone and conduct problems. *J. Am. Child. Adolesc. Psychiatry.* 1994;33(6):908.
22. Muramatsu Y., Takaesu Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 1994;35(3):139-51.
23. Bishop N.C., Gleeson M. Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. *Front. Biosci.* 2009;14(2):4444-56.
24. Guthrie R., Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963;32:338-43.
25. Pelton R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *Trends Analyt. Chem.* 2009;28(8):925-42.
26. Clinical and laboratory standards institute. Blood collection on filter paper for newborn screening programs. Approved standard, 6<sup>th</sup> ed. NBS01-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
27. Chen J., Hsieh Y. Stabilizing drug molecules in biological samples. *Ther. Drug Monit.* 2005;27(5):617-24.
28. Li W., Zhang J., Tse F.L.S. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. *Biomed. Chromatogr.* 2011;25(1-2):258-77.
29. van Amsterdam P., Waldrop C. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials. *Bioanalysis.* 2010;2(11):1783-6.
30. Fokkema M.R., Bakker A.J., de Boer F., Kooistra J., de Vries S., Wolthuis A. HbA1c measurements from dried blood spots: validation and patient satisfaction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009;47(10):1259-64.
31. Leichtle A.B., Ceglarek U., Witzigmann H., Gabel G., Thiery J., Fiedler G.M. Potential of dried blood self-sampling for cyclosporine C<sub>0</sub> monitoring in transplant outpatients. *J. Transplant.* 2010;6:1-6.
32. Alodaib A., Carpenter K., Wiley V., Sim K., Christodoulou J., Wilcken B. An improved ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alloisoleucine and branched chain amino acids in dried blood samples. *Ann. Clin. Biochem.* 2011;48(5):468-70.
33. Merton G., Jones K., Lee M., Johnston A., Holt D.W. Accuracy of cyclosporin measurements made in capillary blood samples obtained by skin puncture. *Ther. Drug Monit.* 2000;22(5):594-8.
34. Woods K., Douketis J.D., Schnurr T., Kinnon K., Powers P., Crowther M.A. Patient preferences for capillary vs. venous INR determination in an anticoagulation clinic: a randomized controlled trial. *Thromb. Res.* 2004;114(3):161-5.
35. Mee J.M.L., Korth J., Halpern B. Rapid and quantitative blood analysis for free fatty acids by chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Lett.* 1976;9(12):1075-83.
36. Chace D.H., Kalas T.A., Naylor E.W. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin. Chem.* 2003;49(11):1797-1817.
37. Thomas A., Geyer H., Guddat S., Schanzer W., Thevis M. Dried blood spots (DBS) for doping control analysis. *Drug Test. Anal.* 2011;3(11-12):806-13.
38. Tretzel L., Thomas A., Geyer H., Pop V., Schanzer W., Thevis M. Dried blood spots (DBS) in doping controls: a complementary matrix for improved in- and out-of-competition sports drug testing strategies. *Anal. Methods.* 2015;7(18):7596-7605.
39. Thevis M., Kuuranne T., Dib J., Thomas A., Geyer H. Do dried blood spots (DBS) have the potential to support result management processes in routine sports drug testing? *Drug Test. Anal.* 2020;12(6):704-10.
40. Lange T., Thomas A., Walpurgis K., Thevis M. Fully automated dried blood spot sample preparation enables the detection of lower molecular mass peptide and non-peptide doping agents by means of LC-HRMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020;412(14):3765-77.