

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА И КОРТИЗОЛА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

УДК/UDC 796.01:612

Поступила в редакцию 20.05.2023 г.

Кандидат химических наук **М.А. Дикунец**¹**Г.А. Дудко**¹Доктор химических наук **Э.Д. Вирус**¹¹Федеральный научный центр физической культуры и спорта, Москва

ENZYME IMMUNOSORBENT AND MASS SPECTROMETRIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF TESTOSTERONE AND CORTISOL: COMPARATIVE ANALYSIS

PhD **M.A. Dikunets**¹**G.A. Dudko**¹Dr. Sc.Chem. **E.D. Virus**¹¹Federal Science Center of Physical Culture and Sport (VNIIFK), MoscowИнформация для связи с автором:
dikunets.m.a@vniifk.ru

Аннотация

Цель исследования – провести сравнительный анализ иммуноферментного (ИФА) и масс-спектрометрических методов определения кортизола и тестостерона в сыворотке человека.

Методика и организация исследования. Анализ образцов проводили на полуавтоматическом фотометре BTS-350 (BioSystems, Испания) с использованием ИФА наборов и сверхбыстром жидкостном хромато-масс-спектрометре с тройным квадруполом LCMS-8060 (Shimadzu, Япония).

Результаты исследования и выводы. Между результатами количественного определения кортизола и тестостерона в сыворотке сравниваемыми методами выявлена высокая двусторонняя корреляция. В среднем концентрация кортизола, измеренная фотометрическим методом с использованием твердофазного ИФА, по сравнению с масс-спектрометрическим, была в четыре раза выше. Для обеспечения точности количественного определения стероидных гормонов в сыворотке необходимо применять хромато-масс-спектрометрический метод или предварительно проводить сравнительный анализ используемого метода с хромато-масс-спектрометрическим для определения коэффициента пересчета.

Ключевые слова: кортизол, тестостерон, иммуноферментный анализ, хромато-масс-спектрометрия.

Abstract

Objective of the study was to conduct a comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and mass spectrometric methods for determining cortisol and testosterone in human serum.

Methods and structure of the study. The samples were analyzed on a semi-automatic photometer BTS-350 (BioSystems, Spain) using ELISA kits and an ultra-fast liquid chromatography-mass spectrometer with a triple quadrupole LCMS-8060 (Shimadzu, Japan).

Results and conclusions. A high two-way correlation was revealed between the results of quantitative determination of cortisol and testosterone in serum using the compared methods. On average, cortisol concentrations measured photometrically using solid-phase ELISA were four times higher than those measured by mass spectrometry. To ensure the accuracy of the quantitative determination of steroid hormones in serum, it is necessary to use a chromatography-mass spectrometric method or first conduct a comparative analysis of the method used with a chromatography-mass spectrometric method to determine the conversion factor.

Keywords: cortisol, testosterone, enzyme immunoassay, gas chromatography-mass spectrometry.

Введение. Для физиологической адаптации организма к тренировочным нагрузкам требуется правильная гормональная сигнализация. В зависимости от величины тренировочного стимула, определяемой такими переменными, как нагрузка, объем, продолжительность, модальность и восстановление, гормоны вызывают специфические адаптации к тренировкам. К ключевым гормонам, играющим решающее значение для оценки степени функциональной подготовки спортсменов, относятся тестостерон и кортизол [2, 7–9].

В спортивной биохимии в качестве показателя анаболическо-катаболического баланса используется отношение концентраций тестостерона к кортизолу (Т/К), зависящее от интенсивности и продолжительности физического воздействия. Т/К считается более чувствительным к тренировочным нагрузкам показателем, по сравнению с отдельно измеренными концентрациями кортизола и тестостерона.

Благодаря высокой экспрессности в биохимическом контроле для определения кортизола и тестостерона в крови наиболее распространен твердофазный иммуноферментный метод анализа (ИФА), основанный на принципе конкурентного связывания. Однако лежащая в его основе реакция антиген-антитело нередко подвержена интерференции со стороны гетерофильных антител, ограничивающей селективность метода [1, 4]. По этой причине ИФА стероидных гормонов, как правило, приводит к завышению их реальных концентраций. Кроме того, серьезным ограничением рассматриваемого метода являются высокие значения коэффициентов вариации наборов, измеренные как в рамках одной аналитической серии, так и между несколькими сериями. Вследствие чего результаты, измеренные ИФА наборами производства разных фирм, зачастую не согласуются между собой. Вышеописанные ограничения ИФА значительно снижают его практиче-

скую ценность в качестве надежного и достоверного инструмента коррекции тренировочного процесса. Поэтому поиск селективного и чувствительного аналитического метода, обеспечивающего прецизионный биохимический контроль функционального состояния спортсменов, является актуальной задачей.

По нашему мнению, перспективным представляется применение метода высокочувствительной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС), подтвердившего свою эффективность в количественном определении циркулирующих стероидных гормонов в клинической диагностике [5, 6]. Однако до настоящего времени обоснованность систематического применения метода ВЭЖХ–МС/МС в спортивной биохимии требовала подтверждения.

Цель исследования – выявление целесообразности применения метода ВЭЖХ–МС/МС в спортивной биохимии для количественного определения стероидных гормонов – кортизола и тестостерона в сыворотке.

Методика и организация исследования. В исследовании, одобренном этическим комитетом ФГБУ ФНЦ ВНИИФК, приняли участие 36 биатлонистов сборной команды России, добровольно подписавшие информированное согласие на участие в эксперименте. Забор крови у спортсменов проводился из локтевой вены в вакуумные пробирки с SiO₂ и гелем-сепаратором VACUETTE® (Greiner Bio-One, Австрия).

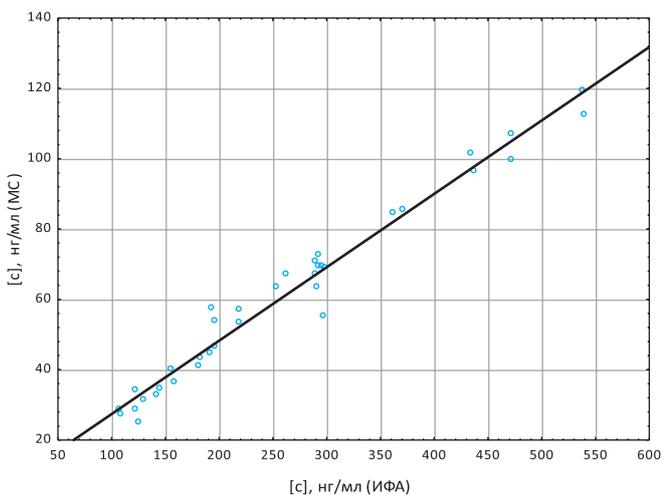


Рис. 1. Ассоциация результатов измерений концентраций кортизола в образцах сыворотки добровольцев, измеренных методами ИФА (ИФА) и СВЭЖХ-МС/МС (МС)

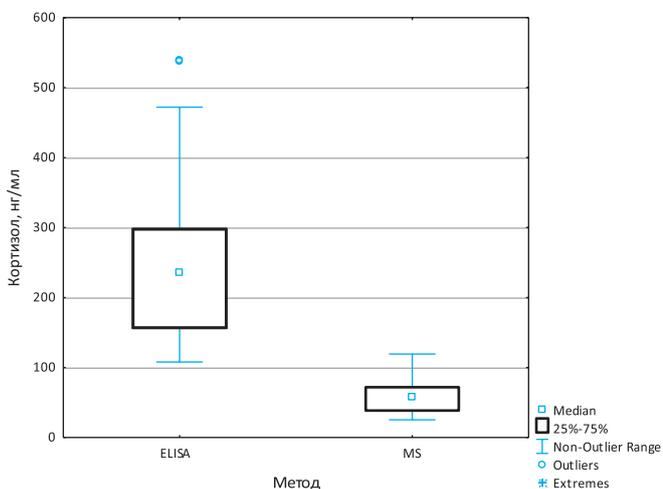


Рис. 2. Концентрации кортизола в сыворотке добровольцев, измеренные методами СВЭЖХ-МС/МС (MS) и ИФА (ELISA)

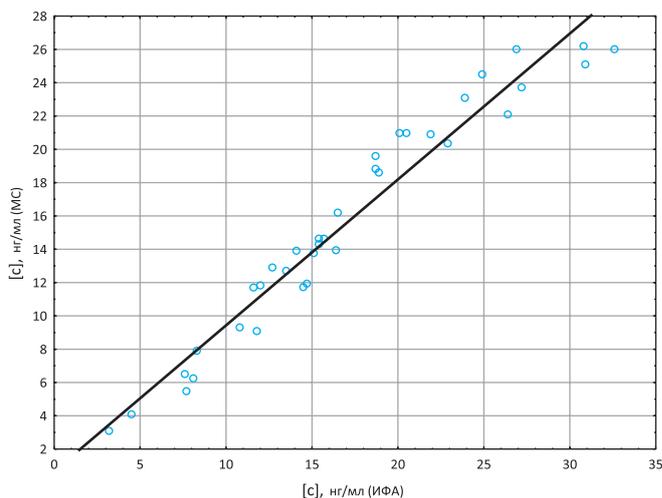


Рис. 3. Ассоциация результатов количественного определения тестостерона в образцах сыворотки спортсменов, полученных методами ИФА (ИФА) и СВЭЖХ-МС/МС (МС)

Количественное определение тестостерона и кортизола в сыворотке методами СВЭЖХ–МС/МС и фотометрического анализа (ФА) выполняли с использованием сверхбыстрого жидкостного хромато-масс-спектрометра с тройным квадруполом LCMS-8060 (Shimadzu, Япония) и полуавтоматического фотометра BTS-350 (BioSystems, Испания) в сочетании с ИФА наборами EIA-1887 и EIA-1559 (DRG Techsystems, США), соответственно.

Результаты исследования и их обсуждение. На рис. 1 представлен график ассоциации концентраций кортизола в образцах сыворотки, измеренных методами ИФА и СВЭЖХ–МС/МС. При оценке коэффициента корреляции ранговым методом Спирмена выявлена высокая двухсторонняя корреляция результатов 0,966 ($p < 0,001$). В результате сравнительного анализа установлено, что в среднем полученные методом ИФА концентрации стероида в 4,23 раза превышали таковые, измеренные СВЭЖХ–МС/МС (рис. 2). Таким образом, ИФА набор для количественного определения кортизола, применявшийся для выделения стероида перед последующим ИФА, характеризуется низкой специфичностью к определяемому стероиду. Данный факт объясняется тем, что прочие структурно схожие с кортизолом молекулы конкурируют за связывание с антителами, что приводит к ложным завышенным результатам. В подтверждение тому производитель ИФА наборов отмечает, что перекрестная реакция кортизола, например, с кортикостероном составляет 45% [3].

На рис. 3 представлен график ассоциации концентраций тестостерона в образцах сыворотки спортсменов, измеренных методами ИФА и СВЭЖХ–МС/МС. Как и в случае с кортизолом, между результатами количественного определения тестостерона сравниваемыми методами выявлена высокая двухсторонняя корреляция: коэффициент линейной корреляции Спирмена составил 0,974 ($p < 0,001$). Смещение при доверительном интервале 95% и коэффициент пересчета концентраций составили 1,45 нг/мл и 1,1, соответственно.

Ложно завышенные концентрации кортизола, измеренные методом ИФА с использованием ИФА наборов, приведут к неправильной интерпретации данных, так как высокий уровень глюкокортикоида указывает на высокую, граничащую с «перегрузкой» стрессогенность нагрузки, а результирующее низкое Т/К будет трактоваться как ухудшение работоспособности и физиологическое напряжение организма спортсмена, требующие коррекции тренировочного процесса и снижения интенсивности нагрузки.

Выводы. Основной проблемой, связанной с применением ИФА для измерения уровней стероидов, является специфичность, зависящая от взаимодействия сайта связывания антител с их молекулой-мишенью. В результате все стероидные ИФА тесты демонстрируют высокую систематическую погрешность измерения. В отличие от ИФА метод СВЭЖХ–МС/МС обладает высокой специфичностью и не зависит от патентованных антител. Следовательно, для обеспечения высокой точности количественного определения эндогенных стероидных гормонов, требуемой в биохимическом контроле, следует применять метод СВЭЖХ–МС/МС или предварительно проводить сравнительный анализ методов для определения коэффициента пересчета (смещение).

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ ФНЦ ВНИИФК № 777-00036-23-01 (тема № 001-22/3).

References

1. Bjerner J., Borner O.P., Nustad K. The war on heterophilic antibody interference. Clin. Chem. 2005. 51(1). pp. 9-11.

2. Horwath O., Apro W., Moberg M., et al. Fiber type-specific hypertrophy and increased capillarization in skeletal muscle following testosterone administration in young women. J. Appl. Physiol. 2020. 128(5). pp. 1240-1250.
 3. Instructions for Use. Cortisol ELISA. Available at: https://www.drg-diagnostics.de/files/eia-1887_ifu--cortisol_2019-05-02_endeitesfr.pdf (date of access: 02.17.2023).
 4. Ismail A.A.A. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. Clin. Chem. 2005. 51(1). pp. 25-26.
 5. Keevil B.G. LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory. Clin. Biochem. 2016. 49(13-14). pp. 989-997.
 6. Ketha S.S., Singh R.J., Ketha H. Role of mass spectrometry in clinical endocrinology. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. 2017. 46(3). pp. 593-613.
 7. Kraemer W.J., Ratamess N.A., Nindl B.C. Recovery responses of testosterone, growth hormone, and IGF-1 after resistance exercise. J. Appl. Physiol. (1985). 2017. 122(3). pp. 549-558.
 8. Kraemer W.J., Ratamess N.A. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med. 2005. 35(4). pp. 339-361.
 9. Ramson R., Jürimäe J., Jürimäe T., Mäestu J. Behavior of testosterone and cortisol during an intensity-controlled high-volume training period measured by a training task-specific test in men rowers. J. Strength Cond. Res. 2009. 23(2). pp. 645-651.
 10. Viru A., Viru M. Cortisol-essential adaptation hormone in exercise. Int. J. Sports Med. 2004. 25(6). pp. 461-464.

ИЗ ПОРТФЕЛЯ РЕДАКЦИИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ВОЕННО-ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ КОМПЕТЕНЦИИ КУРСАНТОВ

Кандидат педагогических наук, профессор **А.В. Борисов**¹
¹Ярославское высшее военное училище
 противовоздушной обороны МО РФ, Ярославль

УДК/UDC 796.011.3

Ключевые слова: курсант, критерий, показатель, физическая подготовка, эффективность, компетенции.

Введение. Критерии оценки результатов освоения основной образовательной программы и сформированности профессиональных компетенций будущих специалистов имеют важное значение для повышения качества учебного процесса, обоснования эффективности полученных научных результатов, новых решений или выявления их несостоятельности [1, с. 192].

Цель исследования – обоснование компонентов военно-профессиональной компетенции курсантов.

Методика и организация исследования. Применялись общепринятые психолого-педагогические методы, включающие анализ литературных данных, анкетирование курсантов в количестве 100 человек и командиров воинских подразделений как в военно-учебном заведении (45 человек), так и подразделениях, в которых проходят военную службу выпускники военно-учебного заведения (55 человек).

Результаты исследования и их обсуждение. Определено, что военно-профессиональная компетенция – это совокупность взаимосвязанных профессионально-личностных качеств, формирующихся в образовательном процессе военно-учебного заведения и определяющих способность курсантов к осуществлению военно-профессиональной деятельности на основе полученных знаний и сформированных навыков. Для оценки сформированности военно-профессиональной компетенции у курсантов можно выделить следующие компоненты:

– *профессионально-мировоззренческий*, включающий: креативность военно-прикладного профессионального мышления курсанта, требующего применения физических умений и навыков при выполнении задач боевого дежурства и других профессиональных задач; сформированность профессиональной

DETERMINATION OF COMPONENTS OF MILITARY-PROFESSIONAL COMPETENCE OF CADETS

PhD, Professor **A.V. Borisov**¹

¹Yaroslavl Higher Military Institute of the Air Defense of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Yaroslavl

Поступила в редакцию 06.09.2023 г.

убежденности, ее проявление в практической деятельности и поведении. Данный критерий поддержан 89% курсантов и 91% командиров воинских подразделений;

– *профессионально-деятельностный*, включающий: способность курсанта проектировать свое дальнейшее военно-профессиональное развитие; нормативное взаимодействие курсантов в процессе выполнения задач военной службы; собственную профессиональную самооценку курсанта, стимулирующую его к осмыслению и решению проблем; готовность к эффективной военно-профессиональной деятельности в нестандартных служебных ситуациях. Данный критерий поддержан 91% курсантов и 87% командиров воинских подразделений;

– *рефлексивный*, включающий: способность курсанта критически оценивать собственные знания, умения, навыки, проявление личностных и физических качеств в условиях учебно-профессиональной и военно-профессиональной действительности; степень осознания курсантом потребности, а также направленности военно-профессионального развития в период после выполнения задач войсковой практики. Данный критерий поддержан 87% курсантов и 95% командиров воинских подразделений.

Выводы. Выделенные компоненты военно-профессиональной компетенции позволяют определить оценочные критерии и обоснованно проводить мониторинг процесса формирования у курсантов, соответствующих профессионально-значимых качеств, необходимых в будущей военной профессии.

Литература

1. Васин В.Н. Результаты педагогического эксперимента по совершенствованию уровня физической подготовленности военнослужащих / В.Н. Васин, А.В. Буриков, А.В. Горохов // Современный ученый. – 2020. – № 2. – С. 191-195.

Информация для связи с автором: burikov2001@mail.ru