

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи



Жукова Галина Викторовна

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ФЕРМЕНТНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СЛЮННОЙ
ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО
СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Кратасюк Валентина Александровна

Красноярск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 САЛИВАДИАГНОСТИКА, КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА В ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ.....	12
1.1 Виды психологического и физиологического состояния организма человека	12
1.2 Маркеры стресса и методы диагностики.....	23
1.3 Слюна как сложная биологическая система	29
1.4 Методы диагностики организма человека по слюне	40
1.5 Биотестирование и ингибиторный анализ.....	50
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	64
2.1 Объекты исследования	64
2.2 Отбор проб для анализа.....	66
2.3 Ферментативное биотестирование.....	66
2.4 Препараты и приготовление растворов	68
2.5 Методы определения характеристик слюны.....	69
2.6 Методы обработки данных	72
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ МОНИТОРИНГА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА	74
3.1 Специфический метод анализа лактата в слюне	75
3.2 Интегральный биолюминесцентный ферментный биотест	80
3.2.1 Влияние физической нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны	81
3.2.2 Влияние умственной нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны	86

3.2.3 Влияние трудовой нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны	88
3.3 Выявление факторов и установление корреляционных взаимосвязей между результатами биолюминесцентного теста и индивидуальной реакцией организма человека.....	92
3.4 Разработка программы сбора и анализа персонализированных данных	100
3.5 Разработка лабораторного макета ферментной технологии для мониторинга физиологического состояния организма человека	105
3.5.1 Варьирование компонентов реакционной смеси для биотестирования.....	105
3.5.2 Оценка влияния pH оптимума и оптических свойств слюны для работы с биолюминесцентной системой	113
3.5.3 Пробоподготовка.....	115
3.5.4 Условия хранения проб слюны	116
3.5.5 Регламент проведения технологии мониторинга физиологического состояния организма человека	119
3.6 Возможность применения созданной системы мониторинга организма для диагностики онкологических заболеваний.....	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	128
ВЫВОДЫ	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Нагрузки, связанные с профессиональной деятельностью, сопровождают человека в течение всей жизни, и их влияние на здоровье и состояние организма необходимо контролировать. При создании методов такого контроля необходимо учитывать индивидуальные особенности организма, поскольку каждый человек реагирует на изменение данных факторов по-разному. В связи с увеличением количества стрессовых ситуаций в современном обществе и необходимостью профилактики перегрузок, остро стоит проблема поиска сигнальных и неинвазивных методов контроля состояния организма человека. Факторы окружающей среды, повышенные физические нагрузки и некоторые виды условий труда, такие как, например, посменная и ночная работа, могут не только способствовать развитию патологических состояний (Vetter et al., 2018, Shan et al., 2018), но и являются причиной стресса организма и, как следствие, - повышения уровня аварийности, травм или потери работоспособности.

Поэтому актуальной проблемой является разработка простых экспрессных неинвазивных методов мониторинга состояния организма человека для профилактики перегрузок.

В настоящее время, для оценки состояния организма проводится анализ маркеров стресса в биологических жидкостях (кровь, сыворотка или моча) (Streckfus et al., 2017), среди которых нет экспрессных методов, а к неинвазивным относятся только методы оценки состояния организма путем самоанкетирования (Karasek et al., 1998; Siegrist, 1996), которые дают субъективную информацию.

Для обеспечения неинвазивности методов в настоящей работе предлагается использовать в качестве анализируемой пробы слюнную жидкость (слюна), которая функционально эквивалентна сыворотке крови и может отражать физиологическое состояние организма, включая эмоциональные и метаболические изменения. Показано существование связи

между уровнем стресса и содержанием определенных биомаркеров в слюне (Marvin et al., 2017), таких как концентрация кортизола и активность а-амилазы (Henckens et al., 2016; Birditt et al., 2018), а также изменением ионного и биохимического состава слюны (Сарф и Бельская, 2023; Bel'skaya et al., 2017). Так, повышенная активность а-амилазы при физических и умственных перегрузках коррелирует с повышением содержания катехоламинов (норадреналина или адреналина) (Briguglio et al., 2021). Связь функционального и физиологического состояния организма человека при стрессе выражается в форме физической усталости, информативным биомаркером которой является содержание лактата в слюне (Feijen et al., 2020). Все вышесказанное свидетельствует о возможности предсказывать стрессовое состояние организма по содержанию маркеров стресса в слюне.

Однако вышеперечисленные методы диагностики организма человека имеют такие недостатки как трудоемкость, длительность и высокая стоимость анализа, что усложняет их использование для контроля на постоянной основе и в режиме реального трудового процесса. Поэтому, несмотря на существование довольно обширного круга методов, отражающих физиологическое состояние организма человека, имеется потребность в экспрессных методах, сигнализирующих о неблагополучной ситуации и указывающих на необходимость анализа с использованием комплекса вышеперечисленных лабораторных методов для выяснения причин неблагополучия.

Для создания такого экспрессного метода оценки состояния организма человека в качестве прототипа предлагается использовать платформенную технологию биолюминесцентного ферментного биотестирования, на основе которой были разработаны биотесты для экологического мониторинга (Kratasyuk, 1990; Kolosova et al., 2022; Есимбекова и др., 2021). Эти ферментные биотесты фиксируют интегральное изменение концентраций веществ в анализируемых водных пробах, а потеря специфичности при этом компенсируется возможностью измерять суммарное влияние поллютантов в

условиях, когда неизвестна природа и концентрация каждого вещества. Интегральный тест используется как сигнальный на первом этапе для выявления степени загрязнения анализируемых проб и сопровождается (в случае необходимости) химическим анализом для выяснения механизмов загрязнения.

Вместо экологических образцов в таком ферментном биотесте можно использовать биологические жидкости. Ранее была показана применимость этой технологии для оценки интенсивности катаболических процессов при различных заболеваниях и оценки степени эндотоксикоза при различных патологиях (Воеводина, 1990; Совцов и Кратасюк, 1991). В этих исследованиях измеряли влияние сыворотки крови на интенсивность свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза (Р+Л). А также было замечено, что похожий эффект наблюдается при воздействии слюны на Р+Л в зависимости от степени тяжести заболевания (Есимбекова и др., 1999).

При этом остаются нерешенными вопросы о зависимости эффекта слюнной жидкости на ферменты светящихся бактерий от изменения компонентного состава слюны в покое и при перегрузках, а также о возможностях разработки персонифицированного подхода в оценке состояния организма, где индивидуальные показатели состояния организма человека при перегрузках будут сравнены с его же показателями в норме.

Цель исследования: разработка технологии персонифицированной экспрессной оценки физиологического состояния организма человека по слюнной жидкости с использованием биолюминесцентной ферментной системы.

Задачи исследования:

1. На основе закономерностей влияния на биферментную систему Л+Р слюны в норме и при перегрузках выявить взаимосвязи между результатами биолюминесцентного ферментного теста и индивидуальной реакцией организма человека на перегрузки, а также факторами, влияющими на

вариабельность состава слюны (возраст, пол, режим дня, биохимический состав).

2. Разработать программу сбора и анализа персонализированных данных на основе платформы Multiforms.

3. Установить корреляционные взаимосвязи между результатами биолюминесцентного теста и индивидуальной реакцией организма человека на перегрузки с использованием созданной базы данных.

4. Разработать регламент проведения персонализированного экспрессного неинвазивного теста для оценки физиологического состояния организма человека.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Степень ингибирования интенсивности свечения биоферментной системы Л+Р слюной испытуемых, испытывающих умственные, физические и трудовые перегрузки, зависит от содержания в слюне минеральных веществ (фосфаты, фториды, нитраты, нитриты, сульфаты), элементного состава (K, Na, Mg, Cu, Mn, Zn, Fe, Ca), продуктов перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые коньюгаты, основания Шиффа), органических компонентов (лактат, глюкоза, каталаза, мочевина, общий белок), водородного показателя pH.

2. Информационная платформа Multiforms применима для сбора и обработки персонализированных данных биолюминесцентным ферментным биотестом для контроля состояния организма человека.

3. Создана технология проведения экспрессного неинвазивного ферментного интегрального персонализированного мониторинга трудовых перегрузок и стрессовых состояний человека.

Научная новизна. Предложен новый подход к разработке экспрессных интегральных биолюминесцентных ферментных биотестов для персонализированного мониторинга нормального и отклоняющегося от нормы состояния организма человека. Создана база данных и адаптирована

информационная платформа Multiforms для экспрессного анкетирования, сбора и анализа персонализированных данных.

Доказана взаимосвязь между результатами биолюминесцентного ферментного теста и индивидуальной реакцией организма человека на перегрузки, а также факторами, влияющими на вариабельность состава слюны, а именно (минерального состава (фосфаты, фториды, нитраты, нитриты, сульфаты), элементного статуса металлов (K, Na, Mg, Cu, Mn, Zn, Fe, Ca), продуктов перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые коньюгаты, основания Шиффа), органического состава (лактат, глюкоза, каталаза, мочевина, общий белок), водородного показателя pH.

Практическая значимость работы. Предложен новый экспрессный метод для мониторинга профессиональной пригодности работников железнодорожного транспорта (РЖД) в условиях воздействия стрессовых факторов, основанный на исследовании влияния слюнной жидкости испытуемых до и после рабочей смены на интенсивность свечения биферментной реакции: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза. Разработаны методики оценки текущего уровня адаптации к перегрузкам, расчета индивидуального уровня нагрузок организма, базирующиеся на объективных данных о функционировании биохимических процессов. Показано, что ферментативная система оценки работоспособности организма в зависимости от количественного и качественного состава метаболитов позволяет интегрально диагностировать перегрузки организма, а также стрессовые жизненные ситуации.

Разработанный тест динамического контроля функционального состояния организма позволяет выявлять группу риска среди работников РЖД, что способствует уменьшению аварийности, повышению качества работы, снижению производственного травматизма, повышению эффективности адаптационного процесса, позволяет рационально использовать трудовые ресурсы.

Вклад автора заключается в личном участии в проведении экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также в написании научных публикаций и апробации результатов исследования на семинарах и конференциях.

Достоверность и обоснованность результатов подтверждается большим массивом данных, детальной обработкой и анализом полученных результатов. Статистический анализ данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с использованием непараметрического критерия с подсчетом медианы (M_e) и интерквартильных интервалов (C25 и C75). Кластерный анализ проведен методом К-средних, количество итераций – 10. Достоверность различий несвязанных параметров оценивали по критерию Манна–Уитни, связанных выборок – по критерию Вилкоксона. Корреляционный анализ данных проводили по критерию Спирмена для оценки существования возможных взаимозависимых связей между отдельными биомаркерами. Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$). Для прогноза уровня стресса по показателям слюнной жидкости применялся ансамблевый метод машинного обучения, метод Случайного леса (Random Forest). При этом решались классификационная (прогноз степени стресса) и регрессионная (вычисление уровня маркера) задачи. Вычисления проводились с применением библиотеки scikit-learning Python3.

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы представлены на конференциях и других научных мероприятиях российского и международного уровня: Международной конференции «Социальный мозг: психоэмоциональная и когнитивная адаптация в эпоху искусственного интеллекта» (Красноярск, 29-30 октября 2025); 18-ом Российском Национальном Конгрессе с международным участием «Профессия и здоровье» (21-26 сентября 2025, Красноярск); Междисциплинарной конференции молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН

(КМУ-XXVII) (Красноярск, 10 апреля 2024); III отчетной конференции магистрантов, аспирантов и молодых ученых-грантодержателей Красноярского краевого фонда науки, проводимой в рамках празднования столетия со дня рождения советского и российского физика, лауреата Нобелевской премии Николая Геннадиевича Басова и в рамках съезда советов Молодых ученых и специалистов Енисейской Сибири (Красноярск, 28 октября 2022); Научно - образовательной школе-конференции «Безопасность в спорте» Университета «Сириус» (Сочи, 23-24 июня 2022); Международной конференции «Социальный мозг – фокус на эмоции», ФГБОУ ВО КРАСГМУ им.проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск, 8-9 февраля 2022); XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Проспект Свободный – 2022», посвященной Международному году фундаментальных наук в интересах устойчивого развития (Красноярск, 25-30 апреля 2022); Международном биолюминесцентном семинаре СФУ под руководством профессора О. Шимомуры и академика И. И. Гительзона (Красноярск, 13-14 июня 2012 г.); Международной Pan-REC конференции «Российские университеты: эволюция и реформы» (Ярославль, 20-21 сентября 2012); семинарах лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета (Красноярск, 2013-2024); XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Проспект Свободный – 2024» (Красноярск, 25-30 апреля 2024).

Диссертационная работа выполнена при **финансовой поддержке** грантов Красноярского краевого фонда науки (№КФ-450, КФ-865, КФ-927, КФ-323, КФ-257), Российского научного фонда (№ РНФ-63); Приоритет 2030 -№ 502-851, Федеральной целевой программы х/д 10094 (№ 02.740.11.0766).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 работ, в том числе 8 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, входящих в Белый список и рекомендуемых ВАК России для

опубликования научных результатов; получены 1 патент РФ и 1 свидетельство о регистрации базы данных РФ.

Соответствие работы паспорту научной специальности. Содержание диссертационной работы соответствует направлению исследования «Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии», «Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и медицинского анализа» паспорта специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Структура и объем диссертации Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов работы, выводов, заключения и списка литературы. Работа изложена на 159 страницах, содержит 9 таблиц и 34 рисунка. Список литературы включает 218 источников, в том числе 140 на иностранных языках.

ГЛАВА 1 САЛИВАДИАГНОСТИКА, КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА В ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Мы испытываем стресс каждую минуту нашей жизни. Неважно, слабый или сильный, он присутствует всегда и, скорее всего, усиливается, особенно в наше время быстрых перемен, высоких технологий и личной неуверенности (Olusakin and Nwolisa, 2012). Профессиональная деятельность, является неотъемлемой частью жизни, влияет на здоровье, благополучие и физиологическое состояние организма. Определение уровня рабочей нагрузки у людей – непростая задача, поскольку каждый человек реагирует на стрессовые факторы по-разному. Важно оценить и вовремя диагностировать состояние организма, чтобы вовремя заметить патологическую тенденцию или социально опасное состояние.

1.1 Виды психологического и физиологического состояния организма человека

На работоспособность человека влияет множество факторов, таких как стресс, ненормативная и повышенная нагрузка, переутомление. Различают разные виды стресса, отличающиеся природой возникновения и воздействием на физиологическое состояние человека. Традиционно стресс определялся либо как стимул, часто называемый стрессором, который происходит с человеком, например, лабораторный шок или потеря работы; либо как реакция, характеризующаяся физиологическим возбуждением и негативными аффектами, особенно тревогой. Ричард Лазарус определил стресс как отношения между человеком и окружающей средой, которые оцениваются как личностно значимые и требуют дополнительных ресурсов для преодоления (Lazarus et al., 1966; Lazarus and Folkman, 2016). Стресс и совладания с ним имеет отношение к стрессовому процессу, поскольку он проявляется в

обычных событиях повседневной жизни, рабочем процессе, крупных жизненных событиях и хронических стрессовых состояниях, которые делятся годами (Folkman et al., 2013). Он влияет на самочувствие человека, потому что это естественная реакция, которая активируется в мозге и является способом реагирования организма на проблему (Nath and Singh, 2019).

Стресс может быть физическим, например, его вызывает отсутствие сна, холод или жара, повреждения и заболевания органов, и психологическим: конфликты, кризисы, неудачи. Но физический стресс всегда сопровождается психологическим, поэтому часто их рассматривают вместе, как и причины психологического и физического стресса. Это объясняется еще и тем, что психологический стресс может вызвать телесные симптомы, например, головную боль или расстройство ЖКТ, то есть стать причиной физического стресса. Тело и психика человека неразрывно связаны (Бодров и др., 2006). Р. Лазарус определяет психологический стресс как продукт транзакции между индивидом и средой, являющейся следствием двухэтапного процесса когнитивной оценки. Ключевым условием возникновения стресса является дисбаланс, при котором ситуация оценивается как угрожающая (первичная оценка), а ресурсы для ее преодоления – как ограниченные или недостаточные (вторичная оценка) (Лазарус, 1970).

Физиологический стресс впервые был описан Гансом Селье как общий адаптационный синдром (Селье, 1982). Он определяется как совокупность неспецифических адаптационных (нормальных) реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов-стрессоров (физических или психологических), нарушает его гомеостаз, а также соответствующее состояние нервной системы организма (или организма в целом). Стресс направлен на развитие в ответ на стрессорное воздействие защитно-приспособительных реакций организма с задействованием симпатоадреналовой системы. Она обеспечивает физиологическую связь между симпатической нервной системой и мозговым веществом надпочечников, а также играет важнейшую роль в физиологическом ответе

организма на внешние раздражители (Christensen, 1991). При поступлении сенсорной информации в организм симпатическая нервная система активирует преганглионарные нервные волокна, которые стимулируют мозговое вещество надпочечников посредством высвобождения нейромедиатора ацетилхолина. Этот процесс играет ключевую роль в регуляции ряда физиологических функций, включая поддержание уровня глюкозы и натрия в крови, контроль артериального давления, а также участие в различных метаболических процессах, обеспечивающих адаптацию организма к изменениям окружающей среды. Кроме того, симпатическая нервная система оказывает значительное влияние на когнитивные функции, такие как память и обучение, подчеркивая её важность в интеграции физиологических и поведенческих реакций (Бурдина и Пархоменко, 1973; Лукомская и Михельсон, 1975). В головном мозге восприятие стрессового стимула гипоталамусом инициирует активацию симптоадреналовой системы, преимущественно через нервные пути, передающие сигналы к надпочечникам. Данный процесс опосредуется высвобождением кортикотропин-рилизинг-фактора (CRF), также известного как кортикотропин-рилизинг-гормон (CRH). Активация симпатических нервов, иннервирующих надпочечники, осуществляется через взаимодействие CRF с соответствующими рецепторами в ганглиях симпатической нервной системы. CRF, в свою очередь, стимулирует гипофиз к секреции адренокортикопротного гормона (АКТГ), уровень которого напрямую зависит от интенсивности высвобождения CRF. Снижение секреции CRF приводит к уменьшению выброса АКТГ.

АКТГ связывается с рецепторами на клетках коры и мозгового вещества надпочечников, запуская каскад внутриклеточных сигналов, что в конечном итоге приводит к высвобождению нейромедиатора ацетилхолина. Ацетилхолин стимулирует нервные окончания, иннервирующие скелетные мышцы, а также мышцы, связанные с ключевыми физиологическими системами, такими как сердечно-сосудистая и дыхательная. Это вызывает

увеличение частоты сердечных сокращений, ускорение дыхания и повышение силы сокращения скелетных мышц.

Глюкокортикоиды, выделяемые в ответ на стресс, играют важную роль в модуляции активности симпатоадреналовой системы, выполняя защитную функцию. Они ограничивают чрезмерную активацию иммунной системы, которая может привести к повреждению тканей организма. Кроме того, глюкокортикоиды подавляют обратный захват катехоламинов, таких как норадреналин и адреналин, нервными окончаниями. Одновременно глюкокортикоиды усиливают синтез норадреналина и адреналина в мозговом веществе надпочечников за счет активации ключевых ферментов, включая тирозингидроксилазу, декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, дофамин-β-гидроксилазу и фенилэтаноламин-N-метилтрансферазу.

Таким образом, глюкокортикоиды не только регулируют стрессовый ответ, но и обеспечивают гомеостатический баланс, предотвращая потенциально вредные последствия чрезмерной активации симпатоадреналовой системы (Chrousos et al., 1995).

Продолжительная активация адаптационных реакций организма под воздействием неблагоприятных факторов приводит к развитию невротических расстройств и соматических заболеваний, которые определяются как хронический стресс. На физиологическом уровне стресс проявляется быстрой утомляемостью, бессонницей или повышенной сонливостью, изменением аппетита, расстройством пищеварения, головными болями. Перечень психологических нарушений включает перепады настроения, раздражительность, подавленность, плаксивость, снижение активного внимания и памяти (Зелтынь и др., 2009).

Подобно повседневному стрессу, спортивный стресс представляет собой реакцию организма на воздействие стимулов, превышающих по интенсивности привычный для спортсмена уровень. Профессиональная спортивная деятельность сопряжена со значительными эмоциональными и физическими затратами, что изначально предопределяет её высокострессовый

характер. Спортсмены постоянно сталкиваются с необходимостью преодоления как острого, кратковременного стресса, обусловленного конкретными соревновательными ситуациями, так и хронического стресса, вызванного систематическими экстремальными нагрузками и перманентным давлением ожиданий высокой результативности. При этом в сфере личной жизни на спортсмена воздействует тот же спектр стрессогенных факторов, что и на любого индивида, что создает кумулятивный эффект и оказывает комплексное влияние на его психоэмоциональное состояние. (Горская и др., 2013; Разумов и др., 2011; James and Collins, 1997; Yeh and Lestter, 2016). Во время физических упражнений организм подвергается стрессу, что приводит к повышенной потребности в кислороде и энергии. В ответ на это происходят значительные изменения в гормональном фоне и концентрации химических элементов в физиологических жидкостях. Увеличивается частота сердечных сокращений, что способствует усилиению кровотока и улучшению доставки кислорода к тканям, что, в свою очередь, способствует оптимизации кардиореспираторной функции. У лиц, регулярно занимающихся спортом, уровни адреналина и норадреналина в условиях физической нагрузки ниже, чем у нетренированных людей, поскольку последние испытывают более выраженный стресс и нуждаются в большем количестве кислорода и энергии для выполнения интенсивных упражнений. Тренированные индивидуумы адаптированы к более эффективному использованию кислорода, особенно при выполнении анаэробных нагрузок, что позволяет их организму дольше выдерживать физические нагрузки.

Повышение уровней адреналина и норадреналина, а также общей активности симпатoadреналовой системы, сопровождается увеличением запасов гликогена, особенно в мышечной ткани, что в конечном итоге приводит к повышению уровня глюкозы, необходимой для энергетического обеспечения. Симпатoadреналовая система играет ключевую роль в регуляции метаболических процессов, включая метаболизм глюкозы и жиров, которые необходимы для поддержания жизнедеятельности клеток и организма в целом.

Глюкоза, являющаяся основным источником энергии для клеток, может синтезироваться в больших количествах благодаря усиленной секреции адреналина. Этот процесс осуществляется через активацию гликогенолиза (расщепления гликогена до глюкозы) и стимуляцию глюконеогенеза (синтеза глюкозы из неуглеводных предшественников). Хотя адреналин оказывает более выраженное влияние на продукцию глюкозы, норадреналин также способен повышать её уровень, но только в высоких концентрациях. Кроме того, норадреналин может усиливать поглощение глюкозы скелетными мышцами и жировой тканью.

Что касается метаболизма жиров, катехоламины (адреналин и норадреналин) стимулируют липолиз — процесс расщепления жиров, что приводит к высвобождению энергии и уменьшению жировых запасов. Это объясняет, почему регулярные физические упражнения способствуют ускорению метаболизма и улучшению общего состояния организма. Таким образом, симпатоадреналовая система играет важную роль в адаптации организма к физическим нагрузкам, обеспечивая энергетические потребности и поддерживая гомеостаз (Ball, 2015).

Любая ситуация, на которую организм реагирует сильным эмоциональным возбуждением, может стать причиной возникновения стресса, его могут вызвать различные факторы - действующие как положительно, так и отрицательно. Изучая причины возникновения, механизм и длительность действия стресса, а также способы выхода из него, можно в определённой степени контролировать стрессовое состояние, оценивать действия фармакологических препаратов и многое другое (Фокин и Каркищенко, 2010). Исследованиями установлена корреляция между нервными и гормональными факторами в процессе формирования стресс-реакции. Показано, что психоэмоциональный стресс, вызванный сообщением об онкологическом диагнозе, сопровождается достоверным снижением ширины диапазона сердечно-дыхательного синхронизма, увеличением времени его становления, повышением концентрации АКТГ и кортизола в плазме крови, а также

снижением уровня β -эндорфинов, что интерпретируется как снижение функционально-адаптативных резервов организма. В случае неподтверждения диагноза наблюдается нормализация параметров сердечно-дыхательного синхронизма и повышение концентрации β -эндорфинов при отсутствии статистически значимых изменений уровня АКТГ и кортизола, что свидетельствует о восстановлении адаптационного потенциала. Полученные данные подтверждают интегративный характер реакции на психоэмоциональный стресс, опосредованной совместным участием нервной и эндокринной систем (Рожнов, 2009). Такое воздействие наряду с эмоционально-отрицательных и экстремальных факторов вызывает и профессиональную деятельность. Состояние напряжения работника, называют профессиональным или трудовым стрессом. Ключевое отличие профессионального стресса от физиологического заключается в его когнитивно-оценочной природе. Профессиональный стресс возникает не как непосредственная реакция на физическую угрозу, а как следствие осознания субъектом деятельности высокой ответственности за результат при одновременной невозможности осуществлять полный контроль над ходом событий и управлять всеми значимыми переменными (Леонова, 2000). Функциональное состояние работающего человека, зависит от совокупности различных факторов и процессов выполнения рабочих задач. Профессиональный стресс зависит также от внутрисубъективных особенностей, а также структуры организации, в которой работает субъект труда (Бодров и др., 2008). Он влияет на работоспособность и здоровье работника, а как следствие – и на производительность и качество его труда. Как и любой вид стресса, профессиональный стресс имеет как физиологические, так и психологические особенности проявления и развития. Исследователи разделяют стресс на эустресс (продуктивный стресс, состояние адекватной мобилизации ресурсов, «операциональная напряженность») и дистресс (деструктивный стресс, «эмоциональная напряженность»). Данная классификация выделяется на основе достигнутых

результатов при преодолении затруднений. Продуктивный стресс характеризуется мотивацией, подразумевает активизацию процессов мышления и памяти, самосознания, что ведёт к преодолению возникших препятствий. Деструктивный стресс характеризуется так называемой мотивацией «на себя», выраженной эмоциональностью и преобладанием мотива самореализации, самоутверждения. При дистрессе работник не в состоянии обеспечить продуктивную и безошибочную работу. Частое повторение состояния дистресса влечет негативные последствия для здоровья человека (Леонова и Кузнецова, 2015; Китаев-Смык и др. 2003). Выделяют 3 стадии стресса: первая – мобилизация (активный выброс адреналина и кортизола, учащённое сердцебиение, повышение давления); вторая – сопротивление (истощение организма, понижение выработки уровня гормонов) и последняя стадия – истощение (сбой в работе нервной и сердечно-сосудистой системы, понижение иммунитета) что приводит в дальнейшем к различным патологиям (Nath and Singh 2019).

Существуют защитные физические качества организма, которые проявляются в ответ на повышенное напряжение или нагрузку – выносливость. Она проявляется, как способность организма напрягаться и оставаться активным в течение длительного периода времени, а также его способность сопротивляться, выдерживать, восстанавливаться и иметь иммунитет к травмам, ранениям или переутомлению. Выносливость позволяет выполнять действия под нагрузкой долгое время, не теряя работоспособности, выстоять в трудной ситуации, "переносить трудности", легче тренировать силу, быстроту, гибкость и ловкость, концентрированность (Хиксон и др., 1980). При недостатке такого качества и длительной нагрузке происходит утомление организма или усталость. Утомляемость представляет собой психофизиологическое состояние, субъективно переживаемое как чувство усталости. В отличие от обычной усталости, ее выраженные формы сопровождаются нарушениями сна, раздражительностью, снижением аппетита, мотивации и работоспособности. Однако ощущение усталости — не

единственный симптом. При сильной мотивации человек может не замечать объективных признаков утомления, таких как ухудшение концентрации, памяти, продуктивности и даже изменения артериального давления и пульса. Важно подчеркнуть, что утомление — это естественная реакция организма на интенсивную физическую или умственную нагрузку. В нормальных условиях оно полностью компенсируется отдыхом и сном, после чего работоспособность восстанавливается. Длительное утомление может привести к переутомлению, которое опасно для здоровья человека. Если чувство усталости сохраняется на протяжении нескольких дней, не проходит после полноценного отдыха и сопровождается другими симптомами, это может указывать на наличие основного заболевания, требующего диагностики. К внешним признакам усталости относятся: изменение цвета кожи, повышенное выделение пота, нарушение ритма дыхания, нарушение координации движений, медленные движения; к внутренним — появление болевых ощущений в мышцах, головокружение (Кулганов и др., 2009). Специалисты выделяют четыре степени утомления, каждая из которых имеет характерные физиологические и психологические проявления:

Первая степень (Слабо выраженное утомление): Общее состояние почти не отличается от нормы. Основные признаки — незначительные ошибки в точных движениях и легкие нарушения сна (трудности с засыпанием и пробуждением). Работа, требующая максимальной отдачи, пока выполняется без проблем.

Вторая степень (Умеренное утомление): наблюдается явное снижение работоспособности и выносливости, растет число ошибок. Однако усилием воли еще можно преодолеть чувство усталости.

Третья степень (Выраженное утомление): Характерно значительное падение работоспособности, замедление реакции и скорости работы. Возникают парадоксы: простые действия даются с трудом, а сложные могут выполняться относительно легко. Появляется дневная сонливость, а усталость

возникает от малейших усилий, хотя еще частично поддается волевому контролю.

Четвертая степень (Сильное утомление, истощение): Организм на грани возможностей. Реакции становятся ультрапарадоксальными (неадекватными), что крайне опасно и может привести к травмам. Это состояние глубокого истощения, требующее срочного отдыха. Причины повышенной утомляемости:

- Нарушение режима сна. В современном обществе многие люди пренебрегают качественным сном, уделяя больше времени интернету, сериалам или работе. Хронический недосып может привести к серьезным нарушениям здоровья. Бессонница требует коррекции, и при отсутствии улучшений рекомендуется обратиться к специалисту.

- Несбалансированное питание или неадекватные диеты. Недостаток питательных веществ, вызванный строгими низкокалорийными диетами или заболеваниями желудочно-кишечного тракта, может стать причиной снижения работоспособности и повышенной утомляемости. Сочетание интенсивных физических нагрузок с низкокалорийным питанием особенно быстро приводит к усталости.

- Прием лекарственных средств. Некоторые препараты, такие как седативные средства, бета-адреноблокаторы, антигистаминные препараты, гипотензивные средства центрального действия и транквилизаторы, могут вызывать утомляемость. Снотворные средства, нарушающие fazу быстрого сна, также способствуют появлению усталости даже при нормальной продолжительности сна.

- Анемия. Снижение уровня гемоглобина в крови ухудшает доставку кислорода к тканям, что проявляется общей слабостью, сонливостью и снижением работоспособности.

- Эндокринные патологии. Быстрая утомляемость характерна для таких заболеваний, как гипотиреоз (снижение выработки гормонов щитовидной железы) и сахарный диабет (колебания уровня глюкозы в крови).

- Заболевания кровеносной системы. Снижение выносливости, одышка, отеки, дискомфорт в области груди и раздражительность могут быть симптомами сердечно-сосудистых заболеваний, требующих медицинского вмешательства.

- Психологические проблемы. Усталость, сонливость и потеря аппетита могут быть признаками депрессии, тревожных расстройств или других психологических состояний, которые нельзя игнорировать.

- Инфекционные заболевания. Во время инфекционного процесса организм тратит значительные ресурсы на борьбу с патогенами, что приводит к повышенной утомляемости.

- Синдром хронической усталости (СХУ). Это состояние, характеризующееся длительной усталостью, не проходящей даже после отдыха. Среди теорий его возникновения выделяют дефицит нутриентов, психологические факторы, аллергические реакции и чрезмерные физические нагрузки. Наиболее распространенной является вирусная теория, согласно которой СХУ может быть связан с перенесенными инфекциями, вызванными герпесвирусами (вирус Эпштейна–Барр, вирус герпеса 7-го типа) или SARS-CoV-2. Даже после выздоровления от основного заболевания человек может долгое время испытывать значительный упадок сил.

Таким образом, повышенная утомляемость может быть вызвана множеством факторов, начиная от образа жизни и заканчивая серьезными заболеваниями. При сохранении симптомов усталости важно обратиться к врачу для диагностики и назначения соответствующего лечения (Гордеева и др., 2015; Пизова и др., 2012).

При статической утомляемости организма от рабочего процесса при правильном распределении нагрузки происходит профессиональная адаптация – это процесс приспособления, привыкания новых работников к содержанию и условиям труда, традициям коллектива, профессиональным требованиям, вхождение человека в профессию и гармонизация взаимодействий его с профессиональной средой. Она во многом зависит не

только от интересов и склонностей человека, но и от встречи, которую окажут ему руководители и коллектив (Гордашников и Осин, 2008; Сластёин и Каширин, 2010).

1.2 Маркеры стресса и методы диагностики

Физиологические параметры, такие как частота дыхания, частота сердечных сокращений и внутренняя температура тела, служат ключевыми индикаторами, отражающими действие экологических, социальных и психологических стрессоров. К числу классических маркеров стресса относятся эндокринные изменения, в частности колебания уровней гормонов, таких как кортизол и адреналин. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО), наряду с вегетативной нервной системой и иммунной системой, играет центральную роль в реакции организма на стресс, активируясь в ответ на внешние и внутренние стрессоры. Эта реакция проявляется через известные биомаркеры стресса: кортизол, альфа-амилазу и провоспалительные цитокины. Понимание взаимодействия иммунных цитокинов с нейронными цепями, вовлеченными в стрессовые реакции, имеет критическое значение для определения физиологических и психологических последствий стресса, а также для прогнозирования связанных с ним заболеваний.

Экспериментальные исследования на мышиных моделях продемонстрировали, что гипертермия и стрессовые воздействия в раннем возрасте приводят к дисрегуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, изменению экспрессии мРНК глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и нарушению нейрогенеза, что подтверждается снижением уровня маркера незрелых нейронов — даблкортина. Современные достижения в области протеомных исследований позволили идентифицировать множество потенциальных белков, которые могут служить биомаркерами для диагностики и терапии заболеваний, связанных с иммунитетом, свертыванием крови, управлением окислительным стрессом и энергетическим обменом

(McEwen, 2007; Cohen et al., 2007). Стресс, вызванный различными внутренними и внешними факторами, нарушает гомеостатическое равновесие организма на молекулярном и системном уровнях. Это состояние стресса негативно влияет на общее благополучие организма, активируя механизмы, направленные на борьбу с неблагоприятными последствиями, что может привести к ослаблению иммунитета и повышению уязвимости к патогенам. Уровень стресса может быть оценен с помощью количественного и качественного анализа биомаркеров. К числу потенциальных маркеров стресса относятся белки теплового шока (HSP); маркеры врожденного иммунитета, такие как белки острой фазы (APP); маркеры окислительного стресса, а также химические соединения, выделяемые со слюной и мочой. Эти биомаркеры также играют важную роль в прогнозировании заболеваний и расстройств, связанных со стрессом, и в разработке стратегий лечения. Стressовые реакции вызывают значительные физиологические и эндокринные изменения, которые приводят к нарушениям функциональных (например, клинических показателей), биохимических (например, уровней гормонов) и метаболических систем. (Kyrou and Tsigos, 2009). Эти изменения сопровождаются колебаниями метаболических биомаркеров, таких как метаболиты, ферменты и гормоны (Chrousos et al., 2009). Стressовые реакции настолько взаимосвязаны, что образование одних соединений (например, активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов) влияет на синтез других (например, антиоксидантов и противовоспалительных цитокинов). Это, в свою очередь, модулирует уровни активных форм кислорода и медиаторов воспаления. Нарушение этих взаимосвязанных гомеостатических механизмов приводит к перестройке защитных систем организма и развитию стрессовых реакций различной степени интенсивности и характера. Это запускает каскад реакций, включая активацию геномных и протеомных процессов, экспрессию генов и синтез специфических белков. Все эти изменения – метаболические, окислительные, воспалительные, геномные и протеомные – в итоге служат биомаркерами стресса.

Среди различных форм стресса окислительный и воспалительный стрессы играют ключевую роль в генерации биомаркеров, которые отражают изменения в различных клеточных системах. Эти биомаркеры являются важными индикаторами, позволяющими оценить степень воздействия стресса на организм и разработать стратегии для минимизации его негативных последствий (Минутко и др., 2010). Выявлена взаимосвязь между стрессом и уровнем цитокинов, выделяемые иммунной системой, которые активируют армии клеток для борьбы с такими захватчиками, как вирусы, патогенные бактерии или рак. Провокаторами уровня цитокинов могут являться: злоупотребление психоактивными веществами, курение, а также полезные виды поведения, которые снижают их уровень (физические упражнения, медитация, сон), которые с меньшей вероятностью будут применяться теми, кто подвергся чрезмерному психологическому стрессу (Deans, 2012).

В современной научной литературе представлено значительное количество методик, направленных на диагностику стресса. Однако, прежде чем давать им развернутую характеристику, необходимо уточнить, какие именно компоненты стресс-реакции они измеряют и насколько валидны, и надежны получаемые с их помощью данные. Исторически переход от изучения стресса в моделях на животных к исследованиям с участием людей продемонстрировал ключевую роль психологических факторов в формировании стрессовой реакции. Это связано с тем, что психологический стресс представляет собой системный ответ организма, интегрирующий психологические, физиологические и поведенческие аспекты (Щербатых, 2001), то это задает рамки для методов диагностики. Современные подходы к оценке стрессовых состояний определяются исследовательскими задачами и могут быть ориентированы либо на субъективные аспекты (когнитивно-эмоциональные переживания индивида), либо на объективные физиологические проявления (вегетативные реакции и поведенческие корреляты). Важным дифференцирующим фактором является также фаза развития стрессовой реакции. В соответствии с классической концепцией Г.

Селье, стрессовый ответ разворачивается в три стадии: стадия тревоги, характеризующаяся аффективными реакциями (тревога, страх, гнев) и психомоторным возбуждением; стадия резистентности, сопровождающаяся психической напряженностью и мобилизацией адаптационных ресурсов; стадия истощения, для которой типичны астено-депрессивные и фрустрационные состояния. Кроме того, принципиальное значение имеет различие типов стресса в соответствии с их функциональной ролью: эустресс как адаптивный, мобилизующий ресурсы организма процесс, и дистресс как дезадаптивное, деструктивное состояние, приводящее к нарушению психофизиологического функционирования. (Селье, 1970; Щербатых и др., 2022).

Современная диагностика психоэмоционального стресса осуществляется с применением двух взаимодополняющих подходов: объективных аппаратных методов и субъективных психодиагностических методик.

Аппаратные методы основаны на регистрации физиологических показателей и включают три основных направления исследований. Во-первых, анализ биоэлектрической активности головного мозга, осуществляемый посредством регистрации ионных токов между нейронами. К прямым методам относятся регистрация активности одиночных нейронов (SUA), многоэлементная запись нейронной активности (MUA), измерение потенциалов локального поля (LFP) и электрокортография (ЭКоГ). К непрямым методам принадлежат электроэнцефалография (ЭЭГ), магнитоэнцефалография (МЭГ) и функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ).

Во-вторых, оценка состояния вегетативной нервной системы, где наиболее информативным показателем признан анализ вариабельности сердечного ритма. Дополнительно исследуются сосудистый тонус (реоэнцефалография), кожно-гальваническая реакция, электрокардиограмма, артериальное давление и активность желудочно-кишечного тракта.

Интерпретация результатов основана на оценке баланса между симпатическим и парасимпатическим отделами нервной системы: преобладание симпатической активности свидетельствует о хроническом стрессе, тогда как общая гиперактивация указывает на острую стрессовую реакцию.

В-третьих, применяются методы биологической обратной связи, позволяющие отслеживать физиологические параметры в реальном времени. Психодиагностические методы включают стандартизированные опросники, проективные методики и клиническое интервью, направленные на выявление субъективных переживаний, связанных со стрессом. Комплексное использование этих подходов обеспечивает всестороннюю оценку психоэмоционального состояния человека. (Долбышев, 2020).

Известен способ диагностики ишемической болезни сердца (ИБС) методом стресс-эхокардиографии (ЭхоКГ) с применением пробы с умственным напряжением. В соответствии с данной методикой, в качестве средства индукции психоэмоционального стресса используется задание на выполнение арифметических вычислений в уме. В процессе проведения пробы осуществляется ультразвуковой мониторинг стандартных позиций ЭхоКГ. Критерием положительной пробы считается выявление нарушений локальной сократительной способности миокарда левого желудочка (ЛЖ), что свидетельствует об ишемической реакции миокарда в условиях психоэмоциональной нагрузки.

Однако и данная модификация метода обладает рядом существенных ограничений. Во-первых, моделирование психоэмоционального напряжения представляет значительные трудности для стандартизации, что препятствует получению количественно сопоставимых результатов. Во-вторых, применение методики демонстрирует наибольшую эффективность у пациентов с определённым психологическим профилем, характеризующимся выраженными чертами агрессивности, враждебности и раздражительности, что ограничивает её применение в общей популяции. В-третьих, ключевым

диагностическим недостатком является относительно низкая чувствительность метода, составляющая 73.5%, что указывает на высокую вероятность ложноотрицательных результатов при выявлении ишемической реакции миокарда (Modena et al., 1989). Согласно исследованию Burg M. и соавт. только у 45% больных с коронарным атеросклерозом выявляется дисфункция миокарда ЛЖ по данным ЭхоКГ во время умственной нагрузки (Burg et al., 1993). Хотя проба с умственным напряжением и изометрической нагрузкой признана информативным методом для диагностики гемодинамических расстройств при артериальной гипертонии, наличие существенных ограничений – низкой стандартизируемости, зависимости от психологического профиля пациента и умеренной чувствительности – обуславливает её ограниченное применение в широкой клинической практике (Шабалин и др., 2003).

Для диагностики и самодиагностики уровня стресса используют шкалу PSM-25 Лемура–Тесье–Филлиона (адаптация Н. Е. Водопьяновой). Используя шкалу для выявления психологического стресса, можно исследовать реакции на уровне тела, поведения и эмоций, выявить уровень стресса – низкий, средний или высокий. В исследованиях связи стресса на рабочем месте с заболеваниями существует опросник для оценки профессионального стресса (Гринберг и др., 2004). Показано, что факторы окружающей среды и некоторые виды условий труда, такие как, например, посменная и ночная работа, могут не только способствовать развитию патологических состояний (Vetter et al., 2018; Shan et al., 2018), но и являются причиной повышения уровня аварийности, например, при управлении транспортным средством. Оценка состояния организма путем самоанкетирования (Karasek et al., 1998; Siegrist, 1996) часто содержит субъективную информацию.

К отдельной категории методов диагностики эмоционального стресса относятся психодиагностические методики, служащие инструментарием для измерения и оценки индивидуально-психологических особенностей состояния человека. К формализованным методам исследования стрессовых состояний

относятся: опросники эмоционального состояния, проективные методики, психофизиологические тесты. Данные инструменты характеризуются строгой регламентацией процедуры проведения, объективизацией диагностического процесса, стандартизацией обработки результатов, подтверждённой надёжностью и валидностью.

Преимущество этих методик заключается в возможности оперативного получения достоверных данных, позволяющих осуществлять как качественный, так и количественный анализ психоэмоционального состояния испытуемых. (Куприянов и Кузьмина, 2012).

К малоинформативным, но ценным методам диагностики стрессовых состояний относятся наблюдение, беседа и анализ продуктов деятельности. Эти подходы, несмотря на отсутствие строгой формализации, позволяют получить уникальные данные о слабо объективируемых психических процессах, таких как неосознаваемые переживания, глубинные личностные установки и динамика эмоционального состояния. Особую значимость эти методы приобретают при необходимости изучения индивидуальных особенностей стрессового реагирования, недоступных для стандартизованных методик. Однако их применение сопряжено со значительной трудоёмкостью и требует от исследователя не только высокой профессиональной квалификации, но и развитого клинического мышления, что существенно ограничивает их использование в массовой диагностической практике (Барбаш и Шапошникова, 2003).

1.3 Слюна как сложная биологическая система

Слюна представляет собой полифункциональную биологическую жидкость, синтезируемую специализированными железистыми структурами и секретирующую в полость рта. У человека секреция слюны обеспечивается тремя парами больших слюнных желез: околоушными, поднижнечелюстными и подъязычными. Помимо этого, в слизистой оболочке ротовой полости

локализовано множество малых слюнных желез, диффузно распределенных в тканях щёк, губ, нёба и языка. (Amado et al., 2013).

Слюноотделение у человека характеризуется значительной вариабельностью количественных и качественных показателей, находящихся под влиянием множества факторов: суточных ритмов, характера питания, возраста, функционального состояния центральной и вегетативной нервной систем, а также соматического статуса. В норме распределение секреторной активности между крупными железами происходит следующим образом: поднижнечелюстные железы produцируют 69% общего объема слюны, околоушные — 26%, а подъязычные — 5%.

Суточный объем секреции колеблется в пределах 0,5–2,2 литра, при этом pH слюны варьирует от слабокислой до слабощелочной реакции (5,5–8,0). Ключевым параметром, определяющим состав слюны, является скорость её секреции: в состоянии покоя она составляет в среднем 0,24 мл/мин, однако может колебаться в диапазоне от 0,01 до 18,0 мл/мин даже в условиях покоя и достигать 200 мл/мин при стимуляции жеванием.

Слюна реализует ряд критически важных физиологических функций, включая пищеварительную, минерализующую (реминерализация эмали), защитную (анти микробная активность), регуляторную (поддержание гомеостаза полости рта), экскреторную (выведение метаболитов) и буферную (нейтрализация кислот).

Пищеварительная функция слюны реализуется посредством комплекса физико-химических процессов. Слюна обеспечивает смачивание, размягчение и гомогенизацию пищевого комка за счёт муцина, что облегчает его проглатывание и дальнейшее переваривание. Ключевая роль в начальном этапе углеводного метаболизма принадлежит ферменту α -амилазе (птиалину), гидролизующей крахмал до мальтозы и декстринов непосредственно в ротовой полости.

Помимо этого, в слюне идентифицированы протеолитические ферменты, включая трипсиноподобные энзимы и пепсиноген, участвующие в

начальном гидролизе белковых субстратов. Липолитическая активность обеспечивается липазами, инициирующими расщепление триглицеридов. Также обнаружено присутствие нуклеаз, катализирующих деградацию нуклеиновых кислот. Совокупность этих ферментативных систем подтверждает роль слюны не только как увлажняющего агента, но и как активного участника начальных стадий переваривания всех основных классов нутриентов. Слюна выполняет ряд критически важных физиологических функций, обеспечивающих гомеостаз полости рта. Минерализующая функция заключается в поддержании прочности и целостности твердых тканей зуба, в первую очередь эмали. Этот процесс обеспечивается за счет двух ключевых компонентов: наличия полного набора необходимых ионов (таких как кальций, магний, фосфаты и хлор) и действия органических регуляторов, которые управляют обменом минералов. К последним относятся витамины, гормоны и другие биологически активные вещества. Высокие концентрации кальция и фосфатов создают градиент, способствующий их диффузии в эмаль и процессам реминерализации. Защитная функция реализуется посредством: механического очищения полости рта; антибактериальной активности (лизоцим, пероксидазы, лактоферрин); иммунологического барьера (секреторный иммуноглобулин A, sIgA); образования муцинового слоя; присутствия ингибиторов протеиназ, пропердина и факторов гемостаза (Галиулина, 1988). Эксекраторная функция заключается в выведении метаболитов (продукты азотистого обмена), ксенобиотиков, лекарственных средств и гормональных метаболитов. Буферная функция обеспечивается бикарбонатной, фосфатной и белковой системами, нейтрализующими кислоты и щёлочи, что поддерживает оптимальный pH (5.5–8.0) для сохранения эмали и ферментативной активности. Стимулированная и нестимулированная слюна демонстрируют существенные различия в биохимическом составе и физико-химических свойствах. Важным аспектом является зависимость осмотического давления от скорости секреции: при низких показателях секреции слюна характеризуется гипотоничностью, тогда

как увеличение скорости слюноотделения приводит к росту её осмотической концентрации (Соколова и Люгайло, 2007).

Важно дифференцировать понятия «слюна» и «ротовая жидкость» (смешанная слюна). Слюна в строгом смысле представляет собой секрет, получаемый непосредственно из выводных протоков слюнных желез. При этом протоковая слюна различных желез (околоушных, поднижнечелюстных, подъязычных) отличается по физико-химическим и биохимическим свойствам. Ротовая жидкость является гетерогенной биологической средой, включающей: секреты больших и малых слюнных желез, клеточные элементы (слюнные тельца); слущенные эпителиоциты, нейтрофилы, лимфоциты, слизь носоглотки; микроорганизмы и продукты их метаболизма; остатки пищи.

Количественный анализ показывает, что в 1 мм^3 ротовой жидкости содержится 2000–4000 лейкоцитов и до 40000 живых микроорганизмов. Несмотря на это, в клинической и диагностической практике термин «слюна» часто используется как синоним «ротовой жидкости» или «смешанной слюны», что требует уточнения контекста интерпретации результатов исследований (Тарасенко и Непорада, 2008).

Слюна представляет собой бесцветную, слегка опалесцирующую вязкую жидкость, состоящую на 98.5–99.5% из воды и на 0.5–1.5% из сухого остатка. Суточный объём секреции составляет 0.5–2.2 литра. Удельный вес слюны варьирует в диапазоне 1.001–1.016 и зависит от соотношения воды и органических/неорганических компонентов, а также от характера питания, гидратации состояния организма и гигиенических практик.

Скорость секреции в состоянии покоя составляет в среднем 0.24 мл/мин, однако при стимуляции может увеличиваться многократно. Для человека характерна непрерывная базальная секреция слюны, обусловленная физиологическими потребностями, включая речевую функцию. С возрастом наблюдается значительное снижение саливационной активности.

Смешанная слюна содержит высокомолекулярные гликопротеины (муцины), определяющие её вязкость (1.2–2.4 пузаза). Осмотическое давление

составляет 50–270 мОсм/л, что соответствует $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$ осмотического давления крови. Формирование гипотонического секрета происходит в системе протоков слюнных желез благодаря активной реабсорбции ионов натрия из первичного изотонического фильтрата. Слюна в норме характеризуется слабощелочной реакцией среды, при этом её pH (6.4–7.4) является ключевым показателем гомеостаза полости рта. Данный параметр подвержен циркадным колебаниям: минимальные значения регистрируются в утренние часы, тогда как к вечеру наблюдается смещение реакции в щелочную сторону. На кислотно-щелочной баланс слюны влияют такие факторы как: характер питания (преобладание углеводов или белков); интенсивность метаболических процессов; возрастные изменения секреторной функции; гигиенический статус полости рта; буферная ёмкость слюны.

Особое значение имеет метаболическая активность ацидофильной микрофлоры, способной продуцировать органические кислоты (молочную, уксусную, пировиноградную) в процессе ферментации углеводов, что приводит к локальному снижению pH и создаёт риск деминерализации эмали.

Слюна имеет очень сложный состав и содержит более тысячи белков, среди которых: пищеварительные ферменты – амилаза, мальтаза, пептидаза, липаза и др.; защитные белки – лизоцим, лактоферрин, гистатины, цистатины и др.; факторы гемопэза и ростовые регуляторы; нейропептиды (Григорьев и др. 2004). Примерно пятая часть протеинов слюны находится в крови и в принципе состав слюны отражает состав крови. Показана зависимость состава слюны от физиологического и психологического состояния организма. При этом повторный сбор слюны одних и тех же людей показал постоянство ее белкового спектра (Laemmli et al., 1970).

Буферная система слюны, обеспечивающая регуляцию кислотно-щелочного равновесия в полости рта, включает три основных компонента: бикарбонатный, фосфатный и белковый буферы. Бикарбонатный буфер составляет 80% от общей буферной ёмкости, играя доминирующую роль в нейтрализации кислот. Фосфатный буфер (гидрофосфат/дигидрофосфат)

проявляет максимальную эффективность вблизи нейтральных значений рН, тогда как белковый буфер функционирует за счёт имидазольных групп гистидина и карбоксильных групп глутамата и аспартата. (Vengerova, 2009). Слюна имеет мицеллярное строение. Ядро мицеллы содержит фосфат кальция, вокруг которого расположены ионы гидрофосфата (HPO_4^{2-}), а затем диффузионный слой, содержащий ионы кальция (Ca^{2+}). Наружный слой мицеллы составляет водно-белковая оболочка. Устойчивость мицелл слюны в большой степени зависит от ее рН. Изменение рН в кислую и щелочную стороны нарушает стабильность мицелл слюны (Соколова и Люгайло 2007).

Среди органических компонентов слюны наибольшую физиологическую значимость имеют белки, представленные альбуминами, глобулинами, муцином, иммуноглобулинами и ферментами, а также липиды, включающие холестерол и его эфиры, свободные жирные кислоты и глицеролипиды. Кроме того, в состав органической фракции входят углеводы (моно- и дисахариды, свободные гликозаминогликаны), небелковые азотсодержащие соединения, витамины, циклические нуклеотиды и другие биологически активные вещества, обеспечивающие многообразие функций слюны. Количественное содержание органических веществ в смешанной слюне представлено в таблице 1.1

Подавляющую часть органических компонентов слюны составляют белковые соединения. Концентрация белка в секрете околоушной железы существенно ниже, чем в слюне поднижнечелюстной железы. Качественный состав белковых фракций слюны в целом соответствует таковому в сыворотке крови и включает альбумины, α -, β - и γ -глобулины, однако количественное распределение демонстрирует значимые отличия: доля альбуминов снижена и не превышает 10% от общего белкового пула, в то время как содержание β -глобулинов приблизительно в четыре раза превышает соответствующий показатель в крови.

Таблица 1.1 - Содержание органических веществ в смешанной слюне человека

Показатель	Норма	Источник литературы
Белок, г/л	2-4	Педанов, 1992
Белок, г/л	$1,58 \pm 0,11$	Коробейникова и Ильиных, 2001
Показатель	Норма	Источник литературы
Белок, г/л (подростки 13–16 лет)	$4,41 \pm 0,2$	Петрушанко и др., 2001
Альбумины, % α-лобулины, % β-лобулины, % γ-глобулины, %	7,6 11,1 43,5 18,5	Педанов, 1992, Тарасенко и др., 2008
Иммуноглобулины: slg A г/л lg A г/л lg G г/л lg M г/л	$0,9 \pm 0,06$ $1,2 \pm 0,65$ $1,3 \pm 0,06$ $1,08 \pm 0,02$	Тарасенко и др., 2002
Муцин, г/л	2	Педанов, 1992
Мочевина, ммоль/л	1,83	Педанов, 1992
Мочевая кислота ммоль/л	0,03	Педанов, 1992
Холестерол	0,06 - 0,23	Педанов, 1992
Фосфор липидный, ммоль/л	0,002 - 0,06	Педанов, 1992
Глюкоза: женщины, ммоль/л мужчины, ммоль/л	$0,02 \pm 0,005$ $0,023 \pm 0,004$	Чепрасова, 2022
Пировиноградная кислота, мкмоль/л	22,7 - 45,4	Педанов, 1992
Молочная кислота, мкмоль/л	0,2 - 0,44	Педанов, 1992
Лимонная кислота, мкмоль/л	10,4 - 104,9	Петрушанко и др., 2001
Фруктоза, мкмоль/л	$1,17 \pm 0,04$	Петрушанко и др., 2001

Присутствие высокомолекулярных белков, таких как амилаза и муцин может помешать обнаружению и идентификации потенциальных

биомаркеров. Муцин относится к защитным белкам, стабилизирует минеральные вещества слюны, поддерживая ее мицеллярный состав (Вилкинсон и др., 1981).

Благодаря высокому содержанию углеводного компонента, составляющего 60% его молекулярной массы, муцин придаёт слюне характерные viscous и слизистые свойства, в то время как белковая часть занимает около 40%. Различают два основных типа муцинов: сиаломуцины, содержащие остатки сиаловых кислот, и сульфомуцины, в состав которых входят сульфатные группы. Отрицательный заряд этих гликопротеинов обусловлен присутствием дикарбоновых, сиаловых кислот и сульфатных остатков. Олигосахаридные цепи ковалентно связаны с полипептидным оставом через гликозидные связи с гидроксильными группами серина и треонина. Показано, что удаление сиаловых кислот путём ферментативного гидролиза приводит к значительному снижению вязкости муциновых растворов.

По этой причине требуются специальные методы для обогащения менее распространенных биомолекул, доступных для обнаружения и идентификации. В последнее время внедрение передовых методов разделения, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография (ЖХ), позволило получить обширные качественные и количественные характеристики пептидома и протеома слюны в различных физиологических и патологических состояниях. Такие методологии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) оказались полезными дополнительными методами в оценке даже мельчайших белков и пептидов слюны. Используя этот подход, в цельной слюне было идентифицировано более 2000 белков (Pappa, 2018, 2020), в частности охарактеризовано 4 основных типа белков слюны: PRP, статерины, цистатины и гистатины (Dawes et al., 2019). При этом примерно 27% белков плазмы обнаружены в слюне человека (Miller, 2010). В плазме или сыворотке человека преобладают иммуноглобулины и альбумины, которые составляют 60–80% от их общего веса. Очевидно, наиболее распространенные 22 белка в плазме

составляют 99% от общего содержания белка. Для сравнения, для цельной слюны 20 самых распространенных белков составляют только 40% от содержания белка в слюне. Таким образом, слюна представляет собой благоприятную диагностическую жидкость для обнаружения потенциальных биомаркеров (Loo et al., 2010; Eftekhari et al., 2019). Кроме того, все источники слюны, особенно малые слюнные железы, содержат высокий процент белков, участвующих в метаболизме, что объясняет интерес к слюне как к диагностической жидкости (Millea et al., 2007; Schulz et al., 2013; Thomadaki et al., 2011; Hartenbach et al., 2020; Franco-Martínez et al., 2020; Sembler-Moller et al., 2020). К гликопротеинам слюны, помимо муцинов, относятся иммуноглобулины и группоспецифические вещества крови. Особое значение имеет секреторный иммуноглобулин A (sIgA), основной синтез которого осуществляется в околоушных слюнных железах. Формирование sIgA происходит в результате взаимодействия между плазматическими клетками, производящими мономерный IgA, и эпителиальными клетками протоков слюнных желез, которые синтезируют секреторный компонент. Молекулярная масса секреторного IgA (390 кДа) существенно превышает таковую у сывороточного IgA (150 кДа) due to присоединения секреторного компонента. Биологическая роль sIgA заключается в защите слизистых оболочек посредством предотвращения адгезии микроорганизмов к поверхности эпителия, что обуславливает его антибактериальную и антиаллергенную активность (Хайтов и Пинегин, 2000). Секреторный иммуноглобулин A (sIgA) играет ключевую роль в защите слизистых оболочек, предотвращая адгезию аллергенов, микроорганизмов и их токсинов к поверхности эпителия, что блокирует их проникновение во внутреннюю среду организма. Дефицит sIgA приводит к снижению местного иммунитета полости рта и повышает риск развития воспалительных процессов. Уникальные защитные свойства sIgA обусловлены двумя основными механизмами: 1 – высокая устойчивость к протеолитическим ферментам (протеиназам), что позволяет ему сохранять активность в агрессивной среде слизистых оболочек; 2 – неспособность

активировать систему комплемента, что предотвращает развитие воспалительных реакций и повреждение собственных тканей организма.

Эти особенности делают sIgA оптимальным молекулярным инструментом для эффективной и безопасной защиты слизистых покровов от чужеродных агентов. (Соколова и др. 2007).

В составе слюны человека выделено более 100 ферментов. Набор ферментов слюны включает амилазу, лизоцим, гликолитические ферменты, гиалуронидазу, ферменты цикла трикарбоновых кислот, ферменты тканевого дыхания, щелочную и кислую фосфотазы, аргиназу, липазу, ферменты антиоксидантного действия и др. (Тарасенко и Непорада 2008). Основные из них представлены в таблице 1.2.

Таблица 1.2 - Активность ферментов в смешанной слюне у человека

Фермент	Норма
Амилаза, Е/л	529,6 ± 20,6
Лизоцим, мкмоль/л	0,11 ± 0,01
Липаза, усл. ед/100 мл	0,2 - 2,7
Фосфатаза щелочная, нкат/л	1,28 ± 0,08
Фосфатаза кислая, усл. ед/100 мл (в ед. Боданского В.Е)	0,025 - 1,11
Фосфатаза щелочная, усл. ед/100 мл (в ед. Боданского В.Е)	0,5 - 13
Общая протеолитическая активность, мкмоль/мин*мл	0,73 ± 0,04
Катала, М/с*л мМ/с*г белка	0,04 ± 0,1 14,32 ± 2,78
Супероксиддисмутаза, ед/с*л ед/с* г белка	2,94 ± 0,63 1,10 ± 0,26
Калликреин, Е/л	260,7 ± 12,5
Калликреиноген Е/л	65,6 ± 3,7
α1-Протеиназный игибитор, ИЕ/мл	0,22 ± 0,05
α2 - Макроглобулин, ИЕ/мл	0,05 ± 0,011
Термокислотностабильные игибиторы трипсиноподобных протеиназ, мкмоль, мин*мл	203,0 ± 15,4
Кислотостабильный игибитор, ИЕ/мл	0,03 ± 0,004

Слюнные железы обладают эндокринной функцией, секретируя в кровь и слону широкий спектр биологически активных веществ и пептидных гормонов, таких как инсулин, соматостатин и вазоактивный интестинальный пептид (VIP). Эти соединения регулируют ключевые физиологические процессы, включая минерализацию зубов и костной ткани, метаболизм белков, липидов и углеводов, рост и дифференцировку тканей, а также влияют на кровообращение и адаптационные механизмы организма.

Пептиды, продуцируемые слюнными железами, выполняют роль нейромедиаторов и нейромодуляторов, оказывая разнонаправленное действие на синаптическую передачу: одни ингибируют, другие – активируют нервные импульсы, тем самым модулируя клеточный метаболизм и интегративные функции нервной системы (Соколова и Люгайлои др., 2007). Среди минеральных компонентов слюны преобладают натрий, калий, кальций и магний (Тарасенко и Непорада 2008) (таблица 1.3).

Таблица 1.3 - Содержание минеральных элементов в смешанной слюне человека

Показатель	Норма
Калий, ммоль/л	5,29
Калий, без стимуляции, ммоль/л со стимуляцией, ммоль/л	11,76–27,61 18,0–19,0
Кальций общий, ммоль/л	1
Кальций общий, ммоль/л	1,28± 0,08
Кальций ионизированный	0,5
Магний, ммоль/л	0,08 - 0,53
Натрий, ммоль/л	8,8
Натрий, без стимуляции, ммоль/л со стимуляцией ммоль/л	6,5–21, 7 43,0 - 46,0
Фосфор неорганический, ммоль/л	10

Показатель	Норма
Фосфор неорганический, ммоль/л	3,23 - 5,07
Хлор, ммоль/л	21,6
Кобальт, нмоль/л	118,8
Медь, мкмоль/л	4,09
Железо, мкмоль/л	0,9
Йод, гмоль/л	275,8–1891,2
Фториды, мкмоль/л	5,26 -10,53
Бром, мкмоль/л	1,25

Неорганические ингредиенты слюны поступают в основном из крови. Их содержание в секрете непостоянно, и они всегда появляются в ионизированной форме. Такие катионы как Na^+ и K^+ участвуют в активном транспорте соединений через клеточные мембранны, а Ca_2^+ и Mg_2^+ активируют некоторые ферменты. Анион Cl^- активирует α -амилазу, а F^- обладает противокариозной активностью, тогда как I^- играет роль в защитных механизмах, в основном за счет присутствия в системе пероксидазы (Frenkel 2015). Существует множество способов использования слюны в качестве биологической жидкости (биожидкости). Существенными преимуществами слюны как уникального диагностического материала являются ее доступность и неинвазивный метод сбора (Denny et al. 2008; Segal and Wong, 2008). Сбор быстрый, не нуждается в дорогостоящем оборудовании и безопасный. Кроме того, слюна как «зеркало тела» может отражать физиологическое и патологическое состояние человека. Поэтому она служит инструментом диагностики и мониторинга во многих областях науки, таких как медицина, стоматология и фармакотерапия (Wong, 2011; Kubala et al., 2018).

1.4 Методы диагностики организма человека по слюне

Диагностическая ценность слюны как биологической жидкости определяется ее молекулярным составом, который точно отражает текущее

физиологическое состояние организма. Перенос биологически значимых молекул из системного кровотока в слону осуществляется посредством трех основных физиологических механизмов: пассивной диффузии через капиллярные стенки, активного транспорта с участием секреторных клеток и ультрафильтрации через межклеточные пространства ацинарных и протоковых клеток слюнных желез. Благодаря этим процессам в слюне обнаруживаются те же биомаркеры, что и в сыворотке крови, что подтверждает ее диагностическую значимость.

Ключевым преимуществом слюны как биоматериала является ее неинвазивный характер сбора, который позволяет проводить многократный забор образцов без дискомфорта для пациента. В отличие от инвазивных методов, таких как забор крови, использование слюны минимизирует риск ятрогенных осложнений, включая перекрестное инфицирование, и не требует привлечения квалифицированного медицинского персонала. Кроме того, простота процедуры сбора обеспечивает возможность динамического мониторинга состояния организма в различные временные точки, включая период физических нагрузок и восстановления, что особенно ценно для спортивной медицины и физиологических исследований.

Важным диагностическим свойством слюны является высокая чувствительность слюнных желез к изменениям в работе внутренних органов и систем. Независимо от того, вызваны эти изменения патологическими процессами или физиологическими состояниями. (Криштоп и Курчанинова, 2014).

Слюну как диагностический материал легко собирать, транспортировать и хранить. Однако следует помнить, что образцы этого материала всегда должны браться у исследуемых в одно и то же время, предпочтительно между 9:00 и 11:00 (из-за наибольшей физико-химической стабильности). Однако, время сбора также может зависеть от конкретных анализируемых компонентов. Исследуемому следует не принимать пищу не менее чем за 90 минут до сбора и прекратить прием лекарственных средств, влияющих на

слюноотделение, за 1 сутки до процедуры. Перед взятием проб следует прополоскать рот деионизированной водой и собрать слюну в течение 10 минут (Burlage et al., 2005). Существуют различные методы сбора слюны в зависимости от типа материала (состава слюны), который планируется получить: свободное истечение нестимулированной слюны изо рта, сбор слюны по методу Навазеша (Navazesh, 1993), с небольшой мышечной стимуляцией, или сбор слюны со дна ротовой полости (Inoue et al., 2006) Нестимулированный сбор является наиболее рекомендуемым методом, поскольку большинство аналитов можно определить количественно без каких-либо изменений в традиционных методах количественного определения. Однако объем слюны, собранный этим методом, будет небольшим. Для получения стимулированного слюноотделения рекомендуется жевать парафиновые блоки или жевательную резинку без вкуса и сахара, которая влияет на секрецию слюны. Слюна из отдельных желез может быть собрана канюляцией железистых протоков или специальными сборными устройствами в области выхода железистых протоков. Однако эти процедуры сложны, медленны и инвазивны и требуют квалифицированного персонала (Chianeh and Prabhu, 2014). Бактериальный материал и клеточные примеси должны быть устраниены непосредственно после сбора биологического образца. Применение ватных фильтров для данной цели признано методологически некорректным, поскольку белки и гормоны демонстрируют высокую аффинность к целлюлозным материалам, что может приводить к ложным результатам или снижать диагностическую ценность теста (Veerman et al., 2008). Для характеристики ионного состава и реологических параметров слюны анализ образцов необходимо проводить непосредственно после их получения. В целях сохранения диагностической ценности биоматериала пробы следует незамедлительно замораживать, предпочтительно с использованием жидкого азота. Забор образцов рекомендуется осуществлять в предварительно охлаждённые контейнеры.

Кратковременное хранение слюны допускается при температуре +4°C с обязательной обработкой в течение 3–6 часов после сбора. Для долгосрочного сохранения стабильности таких показателей, как активность альфа-амилазы, концентрация общего белка и уровень низкомолекулярных антиоксидантов, образцы могут храниться при -20°C до двух недель без значимой деградации аналитов (Nunes et al., 2011).

Сохранность концентрации кортизола в образцах слюны обеспечивается при температуре -80°C в течение года или при +5°C – до трёх месяцев. Однако хранение при комнатной температуре в течение 30 дней приводит к снижению концентрации кортизола приблизительно на 10% (Hansen et al., 2008). Для бактериального роста может применяться азид натрия, однако его использование способно вызывать интерференцию в иммуноанализах с применением пероксидазы хрена.

Наличие бактериальных протеаз в слюне может приводить к деградации белковых компонентов, что требует включения в пробу ингибиторов протеаз (апротинин, лейпептин, антипаин, пепстатин А, фенилметилсульфонилфторид) и стабилизаторов (ЭДТА, тимеросал) для обеспечения достоверности анализов (Chiappin et al., 2007).

Преаналитическая обработка слюны должна соответствовать стандартам, принятым для образцов крови и мочи. Образцы требуют хранения в холодильных условиях и транспортировки с контролем температуры для предотвращения микробной контаминации (Gröschl et al., 2008). Для длительного хранения рекомендована температура -80°C, а разведение образцов глицерином в соотношении 1:1 позволяет минимизировать повреждения от повторяющихся циклов замораживания-оттаивания (Park et al., 2006).

Сбор слюны может осуществляться в стеклянные или пластиковые контейнеры методами пассивного слиивания, сплевывания или аспирации. Стандартизованный забор обеспечивают коммерческие системы типа

Salivette, использующие гигроскопичные материалы для абсорбции слюны при жевании (Topkas et al., 2012).

Неинвазивность сбора, возможность проведения в нелабораторных условиях и воспроизводимость результатов делают анализ слюны перспективным для скрининговых исследований и point-of-care диагностики (Tabak, 2007). Исследование слюны включает не только химический и биохимический анализ, но и оценку её физических свойств (Kubala et al., 2018).

Современные исследования сосредоточены на разработке простых в использовании сенсоров, применимых к слюне, полезных для диагностических целей. Отмечается, что слюна как динамичная биологическая жидкость, быстрее, чем кровь, реагирует на изменение функционального состояния организма, такому как утомление организма. Показано, что при стрессе содержание кортизола в слюне резко повышается (Klaassens et al., 2010), содержание мочевины в слюне уменьшается (Soni et al., 2018), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), выполняющий регуляторные и эффекторные функции в иммунном ответе и воспалении изменяется в зависимости от уровня тревожности (Veronesi et al., 2017), содержание глюкозы в слюне повышается (Arakawa T. et al., 2020), содержание лактата в слюне изменяется в зависимости от уровня профессионализма(Yao et al., 2017). В качестве портативных устройств предлагают использовать сенсоры, разработанные для долгосрочного наблюдения, таких как каппы 116 (Francesca et al., 2017; Soni et al., 2018), оптический и электрохимический биосенсор (Shi et al., 2020), микрофлюидный чип (Yao et al., 2017). Несмотря на простоту, гибкость и одноразовость измерений предложенных сенсоров, имеются недостатки в низкой чувствительности, помехи из-за высокой селективности, сложности и высокой стоимости систем контроля давления и методов изготовления.

Многочисленные исследования наглядно показывают, что определение биохимических показателей информативно при использовании в качестве

субстрата слюны (Tartaglia et al., 2017; Kaur et al., 2018; Nam et al., 2019; Цветаева и Гулин, 2010; Михайлов и др., 2008; Dawes and Jenkins. 2014)

В работах Бельской и соавторов описывается метод высокоэффективной жидкостной хроматографии и утверждается, что, в частности, важными показателями являются кислотность среды и минеральный состав слюны. Известно, что концентрация неорганических ионов играет существенную роль в таких жизненно важных процессах, как сердечная деятельность, кислотно-щелочное равновесие, регуляция внутриклеточного гомеостаза. Показана важная роль кальция и неорганического фосфора в поддержании равновесия процессов минерализации и деминерализации в полости рта. Слюна может быть использована для изучения оксидативного стресса наряду с кровью, так как содержит антиоксидантные ферменты (каталаза, супeroxиддисмутаза, глутатионпероксидаза), витамины-антиоксиданты (A, E, C), из крови в слону поступают продукты перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые конъюгаты, основания Шиффа). Уровень оксида азота, а также концентрация мочевой кислоты, которая принадлежит антиоксидантной системе организма, могут дать важную информацию в слюне. Однако использование слюны в диагностике сочетается в двух направлениях: выявление заболеваний полости рта и выявление патологий организма в целом. В первом случае достаточно определить соответствующий биохимический показатель для контрольной группы и при наличии заболеваний полости рта. Во втором случае необходимо сравнить результат с эталонным значением (сыворотка или плазма). Нередко проводят параллель между динамикой биохимического показателя в слюне и крови (Bel'skaya et al., 2020; Бельская и Голованова, 2012).

Для определения состояния человека также используется акустический анализ (Гурбатов и др., 2010) и твердофазный иммуноферментный анализ (Черкасов и Гулин, 2011; Шлепцова и др., 2006). Наиболее широко используемым методом исследования белкового состава слюны является электрофорез. Однако он не может быть использован для экспресс-анализа состояния испытуемого. Кроме того, электрофорез не отображает спектр

ферментативной активности набора ферментов, а это есть функциональная характеристика, в более полной мере представляющая состояние организма.

Электрохимические методы способны к определению множества веществ в слюне и базируется на основе измерения электрохимических показателей. Так, можно с помощью электрохимического сенсора на основе аптамера измерить пептидный гормон окситоцин (Rana et al., 2023). Гормон и биомаркер психологического стресса кортизол определяются на базе электрохимической импедансной спектроскопии и циклической вольтамперометрии (Liu et al., 2019). Существует и электрохимическое определение по антигену. Так, выявление антител IgG к SARS-CoV-2 в слюне основано на электрохимическом измерении окислительно-восстановительной реакции пероксидазы и H_2O_2 /тетрометилбензидин в иммобилизованном геле с антигеном (Chiang et al., 2021). Маркер почечной недостаточности креатинин можно обнаружить при помощи электрохимических датчиков, включающих в себя иммобилизованные на наночастицах ферменты (Gonzalez-Gallardo et al., 2022). Метамфетамин определяется при помощи вольтамперметрии на углеродном электроде с помощью N, N'-(1,4-фенилен)-дibenзолсульфонамида (Bartlett et al., 2016). Жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией (ЖК-МС) высокого разрешения способна к определению метаболома. Так, в частности, определение данным методом аминокислотного состава слюнной жидкости служит для выявления тяжести течения COVID-19 (Frampas et al., 2022), белкового состава - для прогнозирования фазы ретенции после лечения ортодонтита путем определении экспрессии геном ТЕС тирозин-киназы (Аванг-Кечик и др., 2019), Изучение пириимидиновых нуклеоидов и нуклеозидов позволяет отличить пациентов с первичным синдромом Шегрена от прошедших лучевую терапию после рака головы и шеи (Hynne et al., 2022), определение уровня метаболитов-участников пентозофосфатного пути, гликолиза, глюконеогенеза, аминокислоты и пуриновые и пириимидиновые нуклеотиды указывают на увеличение возраста (Teruya et al., 2021). ЖК-МС применяется и для анализа меньшей

совокупности метаболитов. Сульфат прегненолона (PREGS), сульфат дегидроэпиандростерона (DHEAS), сульфат кортизола (CRTS) и 17 β -эстрадиол-3-сульфата (E2S) обнаружаются методами ЖК-МС с твердофазной микроэкстракцией и добавлением стабильных изотопов (Kataoka, Nakayama, 2022). ЖК-МС применяется для оценки фармакинетических свойств напроксена и его метаболита 6-О-десмтеилнапроксена (Oliveira et al., 2022), противосудорожного препарата каннабидиола и 7-гидроксиカンнабидиола (Kataoka and Nakayama, 2022).

Многочисленные потенциальные варианты применения ЖК-МС были описаны для различных заболеваний, таких как: аутоиммунные заболевания (рассеянный склероз (Comabella et al., 2014), воспалительное заболевание кишечника (Mitsuyama et al., 2016.), системная красная волчанка (СКВ) (Arbuckle et al., 2003), вирусы (ВИЧ) (Greenwald et al., 2006; Roehr, 2012; Kamat et al., 1999), лихорадка денге (Cuzzubbo et al., 1998), кори, эпидемического паротита и краснухи (Perry et al., 1993), антитела против опухолеассоциированных антигенов (Tan and Zhang, 2008; Heo et al., 2012; Chapman et al., 2012; Tan et al., 2009) и паразитов (Doenhoff et al., 2004). Уже было показано, что некоторые из них можно обнаружить и (в принципе) диагностически использовать в слюне. На сегодняшний день на рынке уже имеется один тест на ВИЧ на основе слюны (Madar et al., 2002; Roehr 2012; Kamat et al., 1999; Cuzzubbo et al., 1998). Однако во всех упомянутых исследованиях изучались только специфические идиотипы антител, связанные с заболеванием, или наборы идиотипов. В научной литературе до сих пор отсутствует более общий подход, не связанный с конкретным применением или медицинским исследованием слюны, но есть частные примеры (Hettegger et al., 2019). Исследования посвящены анализу воздействия на организм экстремальных токсических и физических нагрузок. В частности, работы на примере пожарных демонстрируют корреляцию между уровнем натрия в слюне и активностью симпатаoadреналовой, тиреоидной и гипофизарно-

надпочечниковой систем (Колычева и др., 2015). Также изучены акустические характеристики слюны в условиях стресса (Шаленкова и др., 2014).

В условиях неблагоприятной экологической обстановки в РФ актуальным становится изучение влияния антропогенных факторов на здоровье человека, где ключевая задача — оценка воздействия продуктов жизнедеятельности на состояние организма. Отсутствие эффективных реабилитационных мер на фоне негативного влияния среды усугубляет течение заболеваний, что стимулирует научный интерес к данной проблеме. В рамках поиска биомаркеров такого влияния, в литературе описан метод оценки общих гликопротеинов слюны как маркера местного иммунитета (Романенко, Кленина, 2012). Наиболее низкие показатели зафиксированы у детей с воспалительными и эрозивными поражениями слизистой гастродуodenальной зоны. Биохимический анализ слюны у детей с хроническими патологиями также позволил идентифицировать специфические маркеры эндогенной интоксикации. (Филонов и др., 2014; Шульженко и др., 2008). Сфера спортивной медицины также проявляет интерес к саливадиагностике, что обусловлено экологической безопасностью и неинвазивностью метода. В условиях высокоинтенсивного спорта, где ведется пристальный мониторинг за применением запрещенных веществ, особенно востребованы высокотехнологичные экспресс-методы для допинг-контроля и оценки состояния здоровья атлетов (Carvalho et al., 2018; Михайлов и Розенгарт, 2008).

Несмотря на то, что классическим биоматериалом для оценки воздействия физических нагрузок остается кровь, ее забор в условиях тренировочного процесса сопряжен с организационными трудностями: требованием к специальным условиям и обязательным присутствием обученного медицинского персонала. Вследствие этого приоритет в спортивной биохимии постепенно смещается в сторону использования более доступных сред, таких как моча и слюна.

Многочисленные исследования обосновывают целесообразность применения саливадиагностики в качестве неинвазивного инструмента для мониторинга уровня нагрузок, оценки адаптационного потенциала и функциональных резервов организма спортсменов (Бельская и др., 2011). Установлено, что динамика концентрации ключевых метаболитов (мочевины, глюкозы и молочной кислоты) в слюне коррелирует с их содержанием в сыворотке крови, что подтверждает репрезентативность данного метода (Джалилов и др., 2012; Савин и др., 2000; Weisshaar, 1975). Кроме того, анализ слюны эффективно используется для мониторинга гормонального фона, в частности измерения концентрации кортизола и прогестерона, а также для оценки состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у атлетов (Диденко и Алексанянц, 2013).

В настоящее время в биологии и медицине широко применяются различные аналитические методы для количественного и качественного исследования биологических систем на молекулярном уровне.

Эти же методы применяются в клинической биохимии для анализа различных биологических жидкостей человека, с целью диагностики его физиологического состояния. Классификация этих методов представлена на рисунке 1.1

Схема 1. Классификация аналитических методов исследования в биологии и медицине.



Рисунок 1.1 – Классификация аналитических методов в биологии

Возможности других имеющихся способов диагностики ограничены инвазивностью, трудоемкостью методик, часто низкой точностью, что особенно характерно для портативных приборов, например, для измерения концентрации лактата. Все методы биохимического контроля инвазивны, трудоемки и требуют дорогостоящего сложного оборудования. Методы функциональной диагностики, преимущественно базирующиеся на кардиографии, не дают полной картины изменений в организме и позволяют оценить происходящие в организме процессы лишь косвенно.

1.5 Биотестирование и ингибиторный анализ

Биолюминесцентные ферментативные системы бактерий первыми были использованы для создания биолюминесцентных методов анализа и до сих пор играют большую роль в биолюминесцентной аналитике. Перспективность применения светящихся бактерий и их ферментов в аналитических целях обусловлена тремя ключевыми факторами.

1. Историческая и технологическая доступность. Долгое время светящиеся бактерии были единственным биолюминесцентным организмом, который можно было легко культивировать в больших масштабах, что обеспечивало исследователей необходимым количеством бактериальной люциферазы. Эта монополия привела к активной разработке методик: было создано более 100 аналитических методов на их основе. Хотя сегодня с развитием генной инженерии стало возможным получение рекомбинантных ферментов из других светящихся организмов, именно бактерии заложили фундамент этой области исследований.

2. Высокая специфичность. Методы анализа на основе бактериальной люциферазы характеризуются высокой точностью благодаря специфичности фермент-субстратных взаимодействий.

3. Универсальность и гибкость. Энергия для биолюминесцентной реакции забирается из общих метаболических путей клетки. Это

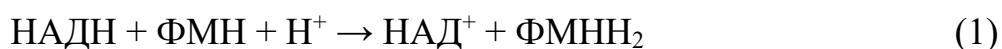
фундаментальное свойство позволяет интегрировать люциферазную систему с другими ферментами через их субстраты. Такое сопряжение дает возможность создавать аналитические цепочки для измерения концентрации широкого спектра ключевых метаболитов (и их ингибиторов – антиметаболитов) путем регистрации интенсивности свечения.

В настоящее время биолюминесцентные тесты *in vitro* активно используются в экологии, медицине, сельском хозяйстве и других областях народного хозяйства. Каждый раз проводят сравнение результатов биотестов для контрольного («норма») и исследуемого («опыт») образцов. В настоящее время разработано множество подходов и приемов для создания биолюминесцентных биотестов *in vitro*. Преимуществами биолюминесцентных методов *in vitro* являются экспрессность, высокая (фемто- и пикомоли вещества) чувствительность, простота, малая погрешность измерений, хорошая повторяемость (Esimbekova et al., 2021; Kratasyuk et al., 2001).

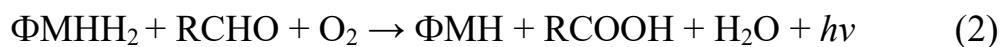
Сопряженная ферментативная система НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза относится к уникальному объекту биофизических и бioхимических исследований, поскольку в результате ее функционирования происходит превращение энергии химических связей в световую. В результате первой реакции, катализируемой НАДН:ФМН-оксидоредуктазой, происходит восстановление ФМН с помощью НАДН. Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной и сопровождается испусканием кванта света. Главной отличительной особенностью сопряженной ферментной системы НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза является возможность регистрации испускаемого кванта света, который может быть способом оценки при использовании биферментной биолюминесцентной системы в различных аналитических методах. При проведении биолюминесцентных анализов *in vitro* в качестве тест-объектов применяют либо моноферментную реакцию, катализируемую люциферазой (реакция 2), либо биферментную систему НАДН:ФМН -оксидоредуктаза-люцифераза (реакции 1 и 2). В реакции (2)

люцифераза катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов, при участии восстановленного флавинмононуклеотида, продуктом реакции является излучение света в сине-зеленой области спектра. Для обеспечения люциферазы восстановленным флавинмононуклеотидом применяется сопряжение люциферазной реакции с реакцией, катализируемой НАДН:ФМН-оксидоредуктазой (реакция 1).

НАДН:ФМН-оксидоредуктаза



люцифераза



Методы, основанные на использовании фермент-субстратных систем, полученных из светящихся бактерий, условно можно разделить на две группы: избирательные (или селективные) методы анализа и интегральные тесты.

В экологической практике нашли широкое применение интегральные методы биотестирования на основе бактериальной люциферазы. Данные системы предназначены для оперативного мониторинга качества окружающей среды в промышленных зонах и природно-хозяйственных комплексах. Они эффективно используются для детекции залповых выбросов загрязняющих веществ, оценки результативности очистки сточных вод и работы очистных сооружений, а также для комплексной оценки экологических рисков, связанных с деятельностью предприятий и состоянием отдельных территорий. Концепция люциферазного биотестирования была выдвинута в 1987 году (Кратасюк и Гительзон, 1987; Воеводина и др., 1990). Принцип люциферазных методов анализа состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции. В основе биолюминесцентных тестов лежит ингибирование люциферазы компонентами анализируемых смесей. Разработано множество подходов и приемов для создания биолюминесцентных тестов *in vitro*.

(Frundzhyan and Ugarova et al., 2007).

Первый вариант биолюминесцентного ферментативного биотестирования наиболее быстрый и обеспечивает хорошую повторяемость результатов. Методика регламентирует следующую последовательность действий: кювету, содержащую все необходимые компоненты биферментной системы светящихся бактерий, их субстраты и буфер, помещают в биолюминометр и после регистрации величины максимальной интенсивности свечения I_K (контрольный уровень свечения) в кювету добавляют от 5 до 50 мкл анализируемого образца воды или исследуемого раствора токсического вещества, вновь регистрируют максимальную интенсивность свечения I_o (рисунок 1.2). Количественная оценка степени влияния testируемой воды на интенсивность свечения биферментной системы выражается в виде безразмерной величины – люциферазного индекса токсичности «ЛИ», определяемой по формуле:

$$\text{ЛИ} = \frac{I_K - I_o}{I_K} \times 100$$

где I_K – максимальная интенсивность свечения в контрольной пробе,

I_o – максимальная интенсивность свечения в опытной пробе.

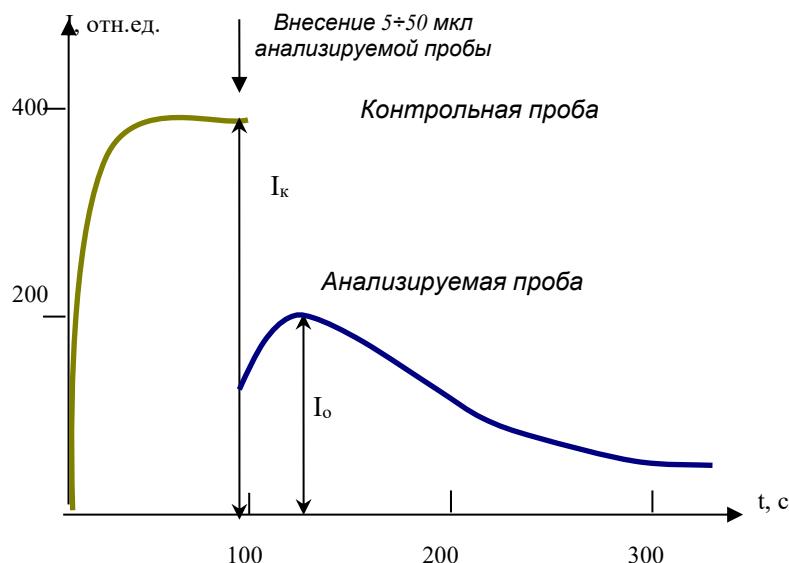


Рисунок 1.2 – Схема проведения биолюминесцентного тестирования

Кроме того, реакцию биотеста можно определять по изменению константы спада свечения $k_{\text{сп}}$, которую рассчитывают по формуле:

$$k_{\text{сп}} = (\ln(I_1/I_2))/\Delta t,$$

где I_1 – максимум интенсивности свечения системы, I_2 – интенсивность свечения системы через заданное время после достижения максимума, Δt – время (в минутах), за которое I_1 достигает I_2 .

Во втором случае удается достичь большей чувствительности тестов к действию токсических веществ. В этом варианте тестирование контрольного образца (обычно дистиллированной воды или буфера) и анализируемого образца проводят в разных кюветах. Реакцию биотеста также определяют по величинам ЛИТ и $k_{\text{сп}}$. Однако, в этом случае возможно использование для анализа токсичности еще одного параметра - времени выхода свечения биферментной системы на максимум $T_{\text{макс}}$ (рисунок 1.3).

Критерием токсичности воды является снижение на 20 % и более максимальной интенсивности свечения биферментной системы при добавлении анализируемого образца воды, по сравнению с интенсивностью свечения в контрольной пробе.

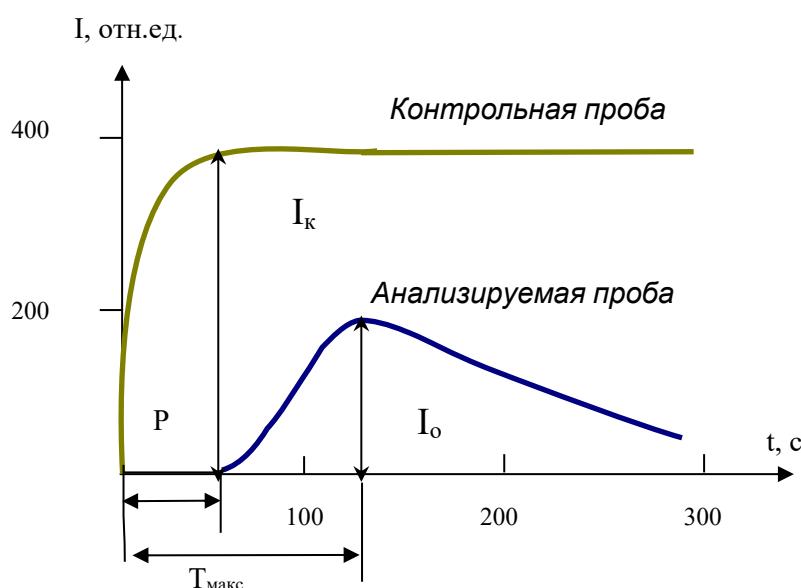


Рисунок 1.3 – Модифицированная схема проведения биолюминесцентного тестирования

Применение биолюминесценции в экологическом мониторинге основано на способности ксенобиотиков-загрязнителей взаимодействовать с ключевыми компонентами светящихся систем. Характер этого воздействия напрямую зависит от физико-химических свойств конкретного соединения.

Для изучения влияния загрязнителей на элементарные процессы в биолюминесцентной системе был применен метод тестирования с использованием рядов гомологичных соединений, различающихся такими параметрами, как: энергия электронно-возбужденных состояний, редокс-потенциал, квантовый выход флуоресценции, наличие гидрофобных заместителей или тяжелых атомов в молекуле.

На основе этих исследований Кудряшевой и соавторов (Kudryasheva, 2006; Kudryasheva et al., 2002) была разработана классификация механизмов воздействия, согласно которой экзогенные соединения могут влиять на систему четырьмя основными путями:

1. Воздействие на процессы переноса энергии;
2. Влияние на процессы переноса водорода ($e^- + H^+$);
3. Модификация процессов переноса электронов;
4. Прямое взаимодействие с ферментами биолюминесцентной системы.

Понимание этих физико-химических принципов позволяет не только точно интерпретировать результаты биотестирования, но и целенаправленно регулировать чувствительность тест-систем к определенным классам загрязняющих веществ.

Преимуществом использования ферментативных тестов является экспрессность (длительность анализа – не более 3–5 минут), высокая чувствительность, простота процедуры измерения, возможность автоматизации процедуры проведения, доступность и безопасность реагентов, широкий рынок биолюминометров.

Исторически в биотестировании доминировали системы, основанные исключительно на биферментной реакции с участием НАДН:ФМН-

оксидоредуктазы и люциферазы. Однако ключевое преимущество данного подхода заключается в универсальности бактериальной люциферазы, которая благодаря механизмам ферментативного сопряжения позволяет оценивать активность более сотни различных ферментов.

Важным аспектом является использование в качестве тест-объекта не целых организмов, а изолированных ферментативных реакций. Это предоставляет возможность гибко регулировать аналитическую чувствительность метода под конкретные задачи. Например, чувствительность к токсичным веществам можно целенаправленно повышать за счет удлинения цепи сопряженных ферментативных реакций.

В результате реализации этого принципа был разработан комплекс ферментативных биотестов, селективных к различным классам загрязнителей (Esimbekova et al., 1999; Vetrova et al., 2007). Данный комплекс впоследствии получил название «сигнальная система ферментативных тестов».

Сигнальная система ферментативных тестов была оптимизирована и использована для мониторинга природных и лабораторных водных экосистем, а также анализа токсичности ряда пестицидов (Frundzhyan end Ugarova 2007; Girotti et al., 2000; Esimbekova et al., 2023; Esimbekova, et al., 2022).

Получены данные, убедительно демонстрирующие возможности применения биолюминесцентных ферментных тестов для анализа токсичности не только воды, но и воздуха или почвы (Rimatskaya et al., 2012; Frundzhyan end Ugarova, 2007; Kolosova et al., 2022).

Как светящиеся бактерии, так и выделенные ферменты используют для мониторинга радиационной токсичности, отслеживая таким способом результаты воздействия радиации, как на микробиологическом, так и биохимическом уровнях (рисунок 1.4). В Институте биофизики СО РАН разработан биолюминесцентный способ мониторинга радиационной токсичности растворов, содержащих альфа- и бета-излучающие радионуклиды. Используются биолюминесцентные системы различной структуры и уровня организации – лиофилизированные бактерии,

растворимая и иммобилизованная биферментная система сопряженных реакций. Радиотоксичность раствора определяют по значениям интенсивности биолюминесценции, измеряемой в контрольной и рабочей пробах.

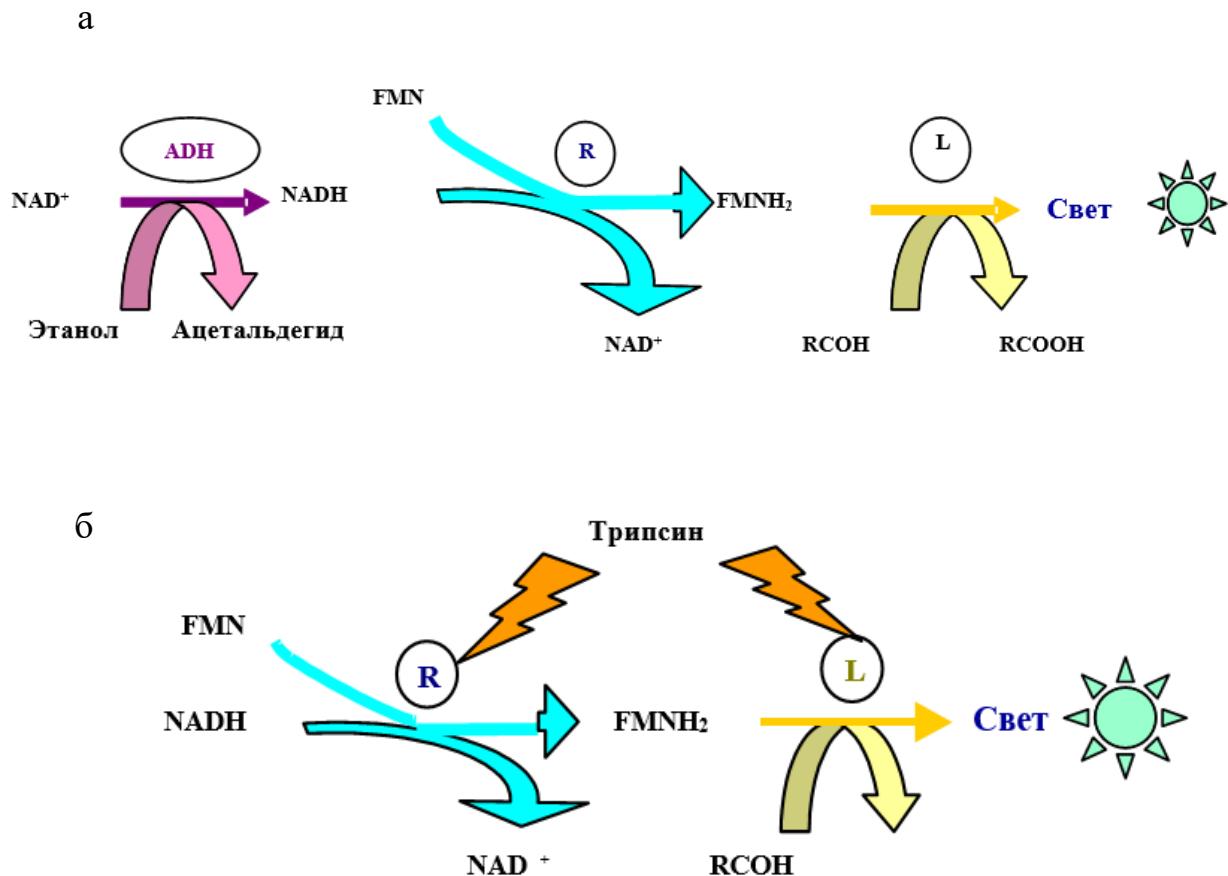


Рисунок 1.4 – Примеры сопряжения ферментативных реакций для создания сигнальной системы биолюминесцентных ферментативных тестов.

а – схема трехферментной реакции алкогольдегидрогеназа-НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза (пример биолюминесцентного ферментативного теста, основанного на прямом сопряжении ферментативных реакций)

б - схема ферментативных взаимодействий в трехферментной системе трипсин- НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза (пример биолюминесцентного ферментативного теста, основанного на протеолитическом взаимодействии ферментов)

Современные аналитические методы на основе биолюминесцентных реакций решают широкий спектр аналитических задач в медицине – от определения степени тяжести неспецифического эндотоксикоза больных (интегральные тесты) до молекулярной диагностики различных заболеваний и инфекций (высокочувствительные и специфичные биолюминесцентные иммуно- и гибридизационный анализы). Экономичность, высокая чувствительность, нетоксичность используемых реагентов и быстрота определения делают биолюминесцентные методы особенно привлекательными для клинической биохимии, а использование цепей сопряжения с бактериальной люциферазой позволяет значительно расширить круг веществ, анализируемых биолюминесцентным методом, и включить в него соединения, не принимающие непосредственного участия в биолюминесценции (Воеводина и др., 1990; Esimbekova et al., 1999; Реммель и др., 2003). В таблице 1.4 представлены некоторые данные по биолюминесцентному анализу метаболитов в цепях сопряжения ферментов с бактериальной люциферазой.

Таблица 1.4 – Анализ некоторых метаболитов в цепях сопряженных ферментов

Анализируемое вещество	Реагент	Чувствительность
Глюкоза	Бактериальная люцифераза, НАДН:ФМН-оксидоредуктаза, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа и гексокиназа	0,5–6 пмоль/л
Гликоген	Бактериальная люцифераза, НАДН:ФМН-оксидоредуктаза, глицерол-3-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы	10 пмоль
Андростерон, Тестостерон	Люцифераза, оксидоредуктаза, стероиддегидрогеназа	1 пмоль
Желчные кислоты	Бактериальная люцифераза, НАДН:ФМН-оксидоредуктаза и 3-, 7-, 12-а-гидрокистероиддегидрогеназа	5–100 пмоль

Анализируемое вещество	Реагент	Чувствительность
Этанол (в сыворотке крови и слюне)	Алкогольдегидрогеназа, бактериальная люцифераза и оксидоредуктаза	75 пмоль
Оксалоацетат	Бактериальная люцифераза, оксидоредуктаза	1 нмоль/л
Лактоза и галактоза (в плазме крови)	Бактериальная люцифераза, НАДН:ФМН- оксидоредуктаза	0,28 нмоль
Глюкоза (в человеческом молоке)	Бактериальная люцифераза, НАДН:ФМН- оксидоредуктаза	0,28 нмоль в 20 мкл образца
Активность лактат-дегидрогеназы	Бактериальная люцифераза и оксидоредуктаза	$4 \cdot 10^{-7}$ единиц активности

Таким образом, использование принципа сопряжения в биолюминесцентном анализе предоставляет практически неограниченные возможности для определения активности различных ферментов и концентраций их субстратов.

Биолюминесцентный анализ, который в настоящее время нашел применение в медицине, гигиене, фармакологии и мониторинге окружающей среды для создания экспрессных биодатчиков, отличается не только быстродействием (10–60 секунд), но и высокой чувствительностью и точностью анализа (10%) (Vienna, 1980; Галиулина, 1988). Биотесты на основе светящихся бактерий схожи с традиционными методами, использующими инфузорий, дафний, водоросли или рыб, с той лишь разницей, что в качестве регистрируемого параметра жизнедеятельности используется интенсивность биолюминесценции (Кратасюк и Гительзон, 1987).

При этом, поскольку первичное воздействие любых поллютантов на организм начинается на молекулярном уровне, использование в качестве тест-объектов ключевых ферментов, ответственных за фундаментальный процесс жизнедеятельности бактерий – светоизлучение, представляется логичным и обоснованным подходом.

Помимо селективных методов анализа в медицине с успехом применяются биолюминесцентные методы интегрального анализа, например, определение степени эндотоксикоза больных (Совцов и Кратасюк, 1992). Эндотоксикоз представляет собой симптомокомплекс, ответственный за состояние организма. Биолюминесцентный метод анализа степени эндотоксикоза применим для оценки состояния пациента, прогнозирования течения болезни, оценки эффективности применяемых методов детоксикации и определения оптимального режима работы дренирующих устройств из полупроницаемых мембран.

В основе всех этих методов лежат различия в степени воздействия на биолюминесцентную реакцию крови доноров и пациентов, которые объясняются наличием в крови больных большего количества продуктов перекисного окисления липидов. На примере управляемой перфузии печени крыс была показана возможность использования биолюминесцентного интегрального метода для оценки интенсивности патологических окислительных процессов (Реммель и др., 2003).

Весьма интересным и многообещающим направлением развития интегрального биолюминесцентного тестирования является экспресс-анализ оценки реакции организма человека на стрессовую физическую и умственную нагрузку. К недостаткам известных методов, таких как измерение гемодинамики, определение максимального потребления кислорода, показателей анаэробного обмена и ряда других, относятся их длительность, сложность проведения анализа, трудоемкость, необходимость предварительной пробоподготовки в лаборатории, инвазивность при анализе сыворотки и плазмы крови. Главными преимуществами биолюминесцентного метода являются не только экспрессность, высокая точность и чувствительность, но и неинвазивность, так как анализируют слону человека, которая так же, как и кровь, отражает его функциональное состояние. Анализ проводят путем сравнения интенсивности свечения биферментной системы

НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза в присутствии слюны человека, взятой до и после стрессовой нагрузки.

Ярким примером применения селективного биолюминесцентного анализа *in vitro* служит оценка стрессового состояния растений через определение содержания пиридиновых нуклеотидов. Эти коферменты выступают в качестве ключевых редокс-переносчиков в растворимой клеточной фазе, играя центральную роль как в про- и антиоксидантном метаболизме, так и в разнообразных метаболических реакциях, не связанных с окислительно-восстановительными процессами. Благодаря этому их статус является интегральным показателем биохимического ответа на стресс.

Был разработан высокоспецифичный биолюминесцентный метод для количественного определения НАД(Ф)Н и НАД(Ф)⁺ в экстрактах тканей растений. Метод успешно применен для анализа растений, выращенных в замкнутых климатических камерах, имитирующих условия длительных космических полетов, в частности, для детекции окислительного стресса, индуцированного гипобарическими условиями (Kratasyuk et al., 2011).

Методы биолюминесцентного анализа применялись для определения содержания лактата в крови (Савченко и Сунцова, 1989) При этом следует отметить, что имеются публикации у авторов настоящего проекта по биолюминесцентным методам (Кратасюк и Гительзон 1987; Воеводина и др. 1990; Kratasyuk., Esimbekova et al., 2012; Совцов и Кратасюк, 1992), указывающих на перспективу разработки биолюминесцентного анализа слюны для медицины (Esimbekova et al., 1999) и спорта (Бельская, 2011; Розенгарт, 2008; Gritsenko et al., 1996.), для чего необходимо изучение механизмов влияния слюны на биолюминесцентные ферментативные системы.

В данной работе исследуются подходы к изучению слюны человека биофизическими методами и к принципиальной возможности создания биолюминесцентного биотестирования для контроля различных физиологических состояний человека по его слюне (Gallagher et al., 2006;

Jasim, et al., 2018). По простоте и числу анализируемых веществ биолюминесцентные тесты сходны со спектрофотометрическими, но по чувствительности превосходят их на 2–3 порядка и отличаются экспрессностью. Однако некоторые недостатки биолюминесцентных аналитических методов ограничивают их широкое применение. Так, ошибка в измерениях возникает вследствие нестабильности реагентов, используемых в биолюминесцентном анализе.

Выводы к главе

Следует отметить, что в области персонифицированной медицины делаются интенсивные попытки изменить ситуацию и перейти от методологии исследования типа «средняя температура по больнице» к изучению особенностей отдельных организмов и переходу к мониторингу организма каждого человека с учетом его индивидуальных особенностей. Совершенствование системы диагностики состояния организма требует методов индивидуализации программ, что возможно только при использовании объективных критериев оценки реакции организма на нагрузку. Поэтому важно разработать новую методологию мониторинга организма человека, учитывающую индивидуальные особенности организма, образ жизни, профессиональные характеристики, историю заболеваний и др. Организм человека, как и биологические жидкости (слюна, кровь, пот, и др.) являются сложными системами, динамически меняющимися как по составу и концентрациям веществ, их составляющих. Получение большого количества данных с помощью традиционных физических и химических методов исследования в рамках идеологии редукционизма не дают полной картины, описывающей состояние организма человека, а также стадии и формы патологического процесса. В связи с этим становится крайне актуальной разработка новой методологии исследования, основанной на выделении основных эмпирических и хорошо коррелируемых функциях, способных дать сигнальный ответ в клинической диагностике. Такие функции могут быть

получены при переходе от метода физической параметризации к методам биологической параметризации. Инновационность предлагаемого подхода заключается в установлении интегральной биологической функции и состояния исследуемых биологических жидкостей (слюна) в организме человека и исследовании биологических взаимодействий друг на друга и другие системы всех компонент слюны, без коллекционирования огромного массива физико-химических параметров, которые зачастую не дают полного понимания этих жидкостей. Поэтому проблема разработки новой методологии мониторинга организма человека, которая будет основана не на выделении отдельно взятых параметров, а на установлении биологической роли этих параметров в изучаемых процессах является актуальной.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В главе описаны материалы, объекты и методы исследования для разработки технологии мониторинга физиологического состояния организма человека, на основе биолюминесцентного метода. В качестве основ для разработки методики были выбраны: авторская платформенная технология биолюминесцентного ферментативного биотестирования профессора В.А. Кратасюк, патент РФ №2665144 способ определения уровня стрессоустойчивости человека. Для разработки ферментативной диагностической системы были исследованы образцы смешанной слюны ($n=964$): специалистов оперативно-диспетчерского состава Красноярской железной дороги-филиала ОАО «РЖД», спортсменов разной квалификации, студентов университета г. Красноярска, пациентов с диагнозом «рак молочной железы» и сопутствующими заболеваниями, потенциально здоровых людей в возрасте 30–50 лет. Предварительно данные об участниках испытаний были обезличены, от каждого испытуемого получено информированное согласие на обработку данных и добровольное участие в эксперименте.

2.1 Объекты исследования

Для профессиональной нагрузки в качестве анализируемых образцов была использована смешанная слюна специалистов оперативно-диспетчерского состава Красноярской железной дороги-филиала ОАО «РЖД» ($n=43$). Исследования проводились в течение месяца и повторились через год, так же сбор анализируемой жидкости осуществлялся ежедневно в течение месяца, согласно рабочему графику. Возраст испытуемой группы составлял 30–50 лет. Отбор проб производился до начала рабочей смены и после рабочего дня (нагрузка). Общее количество отобранных проб составило 310 образцов.

Для определения спортивной нагрузки, уровня лактата и компонентного

состава было исследовано 336 образцов слюны спортсменов разной квалификации (мастера спорта, кандидаты в мастера спорта, спортсмены 1 спортивного разряда) ($n=26$) в возрасте 18–40 лет. Нагрузка осуществлялась как аэробная, так и анаэробная, в зависимости от вида спорта исследуемых: вольная борьба ($n = 25$), фристайл ($n=39$), студенты института физкультуры Сибирского федерального университета ($n=37$), лыжный бег ($n=20$). Обследование проводилось до и через 15 минут после тренировки. Исследования проводили в течение 5 дней, входящих в микроцикл тренировочного процесса для экспериментальной группы и на занятиях физической культуры для контрольной группы. В тренировочный график входило 3 дня с возрастающей скоростно-силовой нагрузкой, день длительной объемной нагрузки и восстановительный день. Продолжительность тренировочного дня составляло 90 минут. Испытуемые экспериментальной группы на тренировках получали одинаковую физическую нагрузку, так же как участники контрольной группы на тренировочных занятиях. Тренировка состояла из трех этапов: фаза разминки, активности и охлаждения. Во время фазы разминки испытуемые выполняли простые упражнения на растяжку в течение 25 минут, за которыми следовала активная фаза, в ходе которой испытуемые участвовали в нагрузке средней интенсивности общим временем 45 минут. Последней фазой было охлаждение, которое длилось 20 минут, в течение которых испытуемые медленно бегали трусцой, пока их кровяное давление не вернулось к нормальному уровню в состоянии покоя. Интенсивность тренировки поддерживалась в пределах предварительно рассчитанной частоты сердечных сокращений для каждого испытуемого (выше 65–75% от уровня покоя).

В обследовании по определению умственной нагрузки приняли участие студенты медицинского университета ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России в количестве 123 человек. Возраст исследуемых групп – от 18 до 23 лет. Обследования проводились до-

(состояние покоя) и во время экзаменационной сессии (умственная нагрузка). Всего исследовано 369 образцов слюны.

Материал для диагностики заболеваний и определения аминокислотных профилей слюны был получен из г. Омска. В эксперименте приняли участие здоровые люди, без нагрузки и заболеваний, женского пола в возрасте 30–50 лет ($n=25$) и пациенты с диагнозом «рак молочной железы» и сопутствующими заболеваниями, женского пола в возрасте 30–80 лет ($n=170$).

Предварительно данные об участниках испытаний были обезличены, от каждого испытуемого получено информированное согласие на обработку данных и добровольное участие в эксперименте.

2.2 Отбор проб для анализа

Сбор биоматериала (смешанная слюна) производился самостоятельно испытуемыми, участвующими в эксперименте, путем свободного сплевывания в пластиковую стерильную микроцентрифужную пробирку посредством пассивного слюноотделения без дополнительной стимуляции. Хранение анализируемой жидкости осуществлялось в холодильной камере при температуре 6–8 °C, не более 24 часов. Образцы слюны перед исследованием центрифугировали в течение 15 минут при частоте 5000 об/мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810r (Eppendorf, Германия) и для анализа использовали надосадочную жидкость.

Образцы слюнной жидкости, собранные в городе Омск, доставлялись в Красноярск посредством почтовой посылки с соблюдением необходимых мер и правил перевозки биоматериала.

2.3 Ферментативное биотестирование

В качестве возможных ферментных систем для включения в комплексный ферментативный биотест были рассмотрены следующие

ферментативные системы: НАД(Ф)Н:ФМН–оксидоредуктаза + люцифераза (Р+Л, люцифера относится к классу оксидоредуктаз, катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов при участии восстановленного flavинмононуклеотида ($\text{ФМН}\cdot\text{H}_2$), продуктами реакции являются окисленный flavинмононуклеотид (ФМН), жирная кислота (RCOOH) и излучение света в сине-зеленой области спектра), лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза ($\text{ЛДГ}+\text{Р}+\text{Л}$), лактатдегидрогеназа относится к классу оксидоредуктаз, ключевой фермент молочно-кислого брожения),

Оценку ингибирующего действия слюнной жидкости на активность биферментной системы: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза (Р + Л) проводили в присутствии образцов слюны по величине максимальной интенсивности свечения согласно методике, описанной ранее (Kolosova et al., 2022; Есимбекова и др. 2021; Kratasyuk et al., 2020; Zhukova et al., 2023)

Биолюминесцентное тестирование проводили на планшетном люминометре TriStar LB 941 (TriStar LB 941, Германия) и кюветном люминометре («PromegaGloMax» 20/20 Luminometer, USA). В кювету биолюминометра вносили реакционную смесь (КРАБ, 0.002% тетрадеканаль, 0.05M калий (натрий) фосфатного буфера (рН 6,8-7), 4-10⁻⁴M НАДН, 5.10M ФМН), помещали кювету в биолюминометр и регистрировали интенсивность свечения реакции биолюминесценции, после достижения максимума свечения (I_K) – контрольное свечение, затем в другую кювету вносили реакционную смесь и нативную слюну, тщательно перемешивали и измеряли интенсивность свечения нового уровня биолюминесценции – I_0 .

Измерения кинетических параметров биолюминесцентной триферментной системы ($\text{ЛДГ}+\text{Р}+\text{Л}$) проводили в смеси следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 7,2), 7,5 мкл раствора ЛДГ, 5 мкл раствора фермента (Л + Р), 50 мкл 0,0025% (v/v) раствор тетрадеканала, 10 мкл 15 мм раствора молочной кислоты, 10 мкл 0,5 мм раствора ФМН и 50 мкл 0,5 мм раствора НАД+, а также 50 мкл дистиллированной воды (контроль)

или анализируемого образца. Для регистрации интенсивности свечения ферментативной системы все компоненты реакционной смеси добавляли в кювету люминометра и быстро перемешивали, а затем измеряли значения интенсивности свечения.

Показателем влияния слюнной жидкости на активность биферментной Р + Л и триферментной системы была остаточная интенсивность свечения, которую рассчитывали как отношение максимальной интенсивности свечения в присутствии слюны к контрольному (в %). Для определения влияния слюны на интенсивность свечения биферментной системы рассчитывали величину люциферазного индекса (ЛИ):

$$\text{ЛИ} = I_0/I_k \times 100 \%$$

Активность биферментной и триферментной системы в определенный момент времени определяли по величине максимальной интенсивности свечения I_{\max} , выраженной в относительных единицах или милливольтах. Каждая экспериментальная точка – результат не менее трёх последовательных измерений.

2.4 Препараты и приготовление растворов

Комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ) (Институт биофизики СО РАН, Красноярск), содержит 0,5 мг люциферазы (Л) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*Photobacterium leiognathi*) и 0,15 ед. активности НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (Р) ЕС 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*).

Во флакон КРАБа вносят 5 мл калий-фосфатного буфера pH 6,8, полученный раствор выдерживают на льду в течение 1–2 часов, затем замораживают. Перед началом работы раствор с ферментами вновь выдерживают на льду в течение указанного времени.

В качестве субстратов Л+Р. использовали НАДН (Gerbu, Германия Germany), тетрадеканаль («Merck»), ФМН (Serva, Германия).

Раствор тетрадеканала [0,0025% (в/в)] готовили путем смешивания 50 мкл 0,25% (в/в) этанольного раствора альдегида и 5 мл 0,05 М калий-fosфатного буфера (рН 6,8). Препарат ФМН растворяли в дистилированной воде. Раствор НАДН готовили путем разведения в 0,05 М калий-фосфатным буфером (рН 6,8).

В качестве субстратов ЛДГ использовали НАД⁺ (AppliChem, Дармштадт, Германия), DL-молочную кислоту (Sigma, Штайнхайм, Германия); ФМН (Serva, Гейдельберг, Германия) и тетрадеканал (Merck, Штайнхайм, Германия).

Раствор фермента (ЛДГ) ЕС 1.1.1.27 из кроличьей мышцы Sigma (Type XI, catalogue no. L1254, 5000 ед.) получают путем разведения 0,5 мкг лиофилизированного препарата ЛДГ в 5 мл калий-фосфатного буфера рН 6,8, полученный раствор выдерживают на льду в течение 1 часа, затем замораживают. Перед началом работы раствор с ферментами вновь выдерживают на льду в течение указанного времени. Раствор НАД⁺ (AppliChem, Германия) готовили в 0,05 М калий-фосфатном буфере (рН 6,8).

2.5 Методы определения характеристик слюны

Для выявления факторов, влияющих на анализ, было проведено анкетирование участников эксперимента по самооценке состояния организма, включающее информацию о вредных привычках, режиме питания, стаже работы, самооценке стрессового состояния. Результаты медицинских осмотров, содержащие общеклинические анализы крови и мочи и другие терапевтические показатели здоровья, были предоставлены ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД- медицина».

Определение уровня лактата для сравнения работы триферментной системы был проведен колориметрическим методом Баркера и Саммерсона (Barker, Summerson 1941). В кювету добавляли 2 мл глицин-гидразинового буфера (рН 9,5), 0,2 мл образца слюны и 2,2 мл 0,05 М ФМН⁺ и регистрировали оптическую плотность (E1) раствора при 340 нм

спектрометром UV-1800 (Shimadzu, Киото, Япония), в течение 5 минут при 25°C. Когда в кювету добавляли 0,05 мл 0,05 М раствора ЛДГ и регистрировали оптическую плотность (E₂) этого раствора при 340 нм спектрометром UV-1800 (Shimadzu, Киото, Япония) в течение 5 мин при 25°C. Была проведена корректировка оптической плотности (E_c) раствора, в котором 0,2 мл образца слюны заменили на 0,2 мл дистиллированной воды. Концентрацию лактата, выраженную в М/г, рассчитывали по формуле:

$$X = (\Delta E * V * K) / 6.22,$$

где ΔE – изменение оптической плотности раствора до и после добавления ЛДГ — ($\Delta E = (E_2 - E_1) - E_c$), V - общий объем раствора (2,45 мл), 6,22 (Л/ммоль/см) - молярный коэффициент экстинкции для НАДН или НАД(Ф)Н при 340 нм, K - коэффициент разбавления, который равен 22,5.

Для исследования физической стрессовой нагрузки испытуемых концентрацию лактата в образцах слюны определяли спектрофотометрически в кювете объемом 1 мл при смешивании с 250 мкл слюны, 740 мкл дистиллированной воды и 10 мкл 0,4 М раствора хлорида железа (III) (Solins, Россия), (Храмов и Савин, 1995). При этом происходило окрашивание раствора в бледно-желтый цвет (реакция Ван ден Берга). Оптическую плотность раствора регистрировали на спектрометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Содержание лактата в пробе рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной по разведениям 0,01 М водного раствора лактата лития.

Активность каталазы определяли путем смешивания слюнной жидкости с 0,03 % раствором перекиси водорода, 4% раствором молибдата аммония и измеряли при длине волны 410 нм (Бельская и др., 2015). Уровень триеновых конъюгатов определяли по степени светопоглощения в гептан-изопропанольных экстрактах (Волчегорский и др., 1989). Определение неорганических катионов и анионов в слюне производилось методом капиллярного электрофореза. Для определения катионов (ионы аммония, калия, натрия, магния, кальция) (Бельская, 2017) использовали ведущий

электролит - 20 мМ бензимидазол, 5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6 («Флук», Швейцария), для определения анионов (хлориды, нитриты, нитраты, фосфаты) использовали ведущий электролит - 10 мМ CrO₃, 30 мМ диэтаноламин (ДЭА, «Флук», Швейцария), 2 мМ цетилtrimетиламмония гидроксид (ЦТА-ОН, «Флук», Швейцария).

Исследование элементного статуса K, Na, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn, Fe проводили методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротемпературной атомизацией в графитовой печи поперечного нагрева в технике микроанализа в соответствии с нормативным документом (GOST 23862.6–79, 2003), применяемым к биологическим объектам (Siddharth et.al., 2015). Измерения проводились с использованием атомно-абсорбционного спектрометра Solaar M6 (Thermo Electron Corporation, США) с четырехлинейной коррекцией фона. Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования СФУ «Наукоемкие методы исследования и анализа новых материалов, наноматериалов и минерального сырья» и Лаборатории биолюминесцентных биотехнологий СФУ.

Концентрация кортизола в слюне измерялась иммуноферментным методом с помощью набора реагентов Кортизол-ИФА-БЕСТ для иммуноферментного определения концентрации кортизола в сыворотке крови. Диапазон измерений: 0–1200 нмоль/л.

Индекс массы тела (ИМТ), рассчитывали по формуле: ИМТ=МТ/P², где МТ – масса тела (кг), Р – длина тела (м), что позволило выявить наличие отклонений массы тела от нормы (ВОЗ, 1991). При значении индекса менее 18,5 кг/м² статус обследованного расценивался как дефицит массы тела, от 25 до 29,9 кг/м² – как избыточная масса тела и выше 30 кг/м² – как ожирение.

Для оценки стрессоэмоционального состояния в состоянии покоя и во время стресса проводили психологическое тестирование. Для определения стрессоэмоционального состояния использовались общепринятые специализированные психологические тесты: тест Спилбергера-Ханина – для

выявления общего уровня тревожности, тест Немчина и Тейлора – для определения склонности к развитию стресса. Показатели стрессоустойчивости (СУ), ситуативной (СТ) и личностной (ЛТ) тревожности оценивали по баллам: до 30 баллов – низкая, 31–45 баллов – умеренная, 46 и более – высокая. Вероятность развития стресса оценивали по уровню тревоги: при показателях 5–15 баллов – низкий уровень тревоги, при показателях выше 15 – повышенный уровень тревоги (снижение стрессоустойчивости), при показателях 40–50 – развитие дистресса. Для прогноза эустресса рассматривалась количественная сторона утверждений до 25 баллов (Ханин, 1976; Спилбергер, 2001).

2.6 Методы обработки данных

Полученные данные были занесены в таблицу, тщательно отсортированы и разделены на соответствующие группы. Каждый из параметров получил индивидуальный шифр. Группировка данных была произведена с помощью пакета программ Excel (Microsoft, США). Полученные данные объединены в таблицу, пригодную для дальнейшего анализа. Названия всех параметров в таблице зашифрованы – каждой пробе присвоен индивидуальный шифр.

Предобработка данных проводилась с помощью языка Python, с использованием библиотеки Pandas. Пропущенные значения для количественных переменных были заполнены средним значением для рассматриваемого столбца, пропущенные значения для категориальных переменных заполнены медианной.

Для выявления факторов, влияющих на анализ, был использован метод К-средних, метод главных компонент, Random Forest Classifier, Random Forest Regressor (Zarrin et.al., 2020; Murata et.al., 2019; Kuwabara et.al., 2022). Метод K – mean основан на разделении данных на кластеры в ходе итерационного процесса, сводящегося к минимизации суммарных

квадратичных отклонений точек кластеров от центроидов (средних координат) этих кластеров. Алгоритм был реализован с помощью языка программирования Python. Параметры работы алгоритма:

KMeans (n_clusters =2, n_init = 2), где

n_clusters – количество выделяемых кластеров.

n_init – количество запусков алгоритма с разными центроидами, результат с минимальной ошибкой (минимальным отклонением точек кластеров от центроидов своего кластера).

Была проведена оптимизация модели для достижения стабильного результата. Подобранные параметры моделей:

```
rf = RandomForestClassifier (n_estimators = 1000, max_depth=7,  
min_samples_split=3, min_samples_leaf=1)
```

```
rf = RandomForestRegressor (n_estimators = 2000, max_depth=7,  
min_samples_split=3, min_samples_leaf=2)
```

n_estimators – количество деревьев в ансамбле; max_depth – максимальная глубина построения дерева; min_samples_split – минимальное количество объектов необходимых для разбиение внутреннего узла; min_samples_leaf – минимальное количество объектов необходимое для нахождения в листе каждого дерева.

В работе использовался Google Colab - бесплатный сервис от Google, позволяющий запускать и редактировать Python-ноутбуки в облаке.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 10. по непараметрическому критерию с подсчетом медианы (Me) и интерквартильного разброса (C25-C75 перцентили). Межгрупповые различия оценивали по критерию Вилкоксона (t_b), корреляционную связь - по критерию Спирмена и U-тест Манна-Уитни.

Достоверность данных рассматривалась при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$) (Makarova et.al., 2012; Berestneva et.al., 2012).

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ МОНИТОРИНГА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА

В работе представлены результаты экспериментального изучения механизмов влияния слюны на биолюминесцентную реакцию для создания персонализированной технологии мониторинга перегрузок и стрессовых состояний. Выявлены изменения информативного сигнала в форме относительного свечения Р+Л системы при различных функциональных состояниях организма человека при влиянии физической, умственной и трудовой нагрузки. Подобраны условия проведения мониторинга перегрузок и стрессовых состояний. Для выявления закономерности влияния слюнной жидкости на сигнал ферментативной системы в работе были исследованы образцы слюны, полученные после физической, умственной и трудовой нагрузки. Для оценки влияния физической нагрузки на организм, возможно, использовать как методы избирательного анализа (биолюминесцентный метод оценки содержания молочной кислоты), так и интегральный метод – биолюминесцентный ферментный биотест. Представлены влияния количественного и качественного состава метаболитов слюны (минерального состава(фосфаты, фториды, нитраты, нитриты, сульфаты), ионный состав (K, Na, Mg, Cu, Mn, Zn, Fe, Ca), продуктов перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые коньюгаты, основания Шиффа), органический состав (лактат, глюкоза, каталаза, мочевина, общий белок), водородный показатель pH, кортизол) на информативный сигнал в виде остаточного свечения биолюминесцентной системы, а также другие факторы, влияющие на результат анализа. Показана разработка регламента мониторинга перегрузок и стрессовых состояний путем модификации платформенной технологии с учетом особенностей анализа слюнной жидкости. Предложено решение проблемы сбора информации индивидуальных показателей и анализа полученных данных исследований.

3.1 Специфический метод анализа лактата в слюне

Одним из коррелирующих показателей при исследовании слюны являлся лактат, поэтому было определена возможность измерения лактата в слюне с помощью биолюминесцентной системы. Главной отличительной особенностью сопряженной ферментной системы НАДН:ФМН - оксидоредуктаза-люцифераза является возможность регистрации испускаемого кванта света, который может быть способом оценки при использовании биолюминесцентной системы в различных аналитических методах и возможностью конструирования этой системы для различных компонентов. Для определения влияния лактата была исследована полиферментная система лактатдегидрогеназа- НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза которая представляет из себя сопряженную систему, состоящую из трех ферментов. В результате первой реакции происходит восстановление окисленной формы НАД до НАДН благодаря лактатдегидрогеназе, которая в последствии используется люциферазой. Таким образом, по изменению свечения системы оценить степень воздействия на каждый из трех ферментов, в данном случае оценивался вклад лактатдегидрогиназы который выступал окислителем НАД до НАДН, квант света, получаемый в ходе реакции, был получен малой интенсивности, при увеличении концентрации лактата происходило соответственное увеличение свечения системы.

Для определения влияния слюны на сигнал биолюминесцентной реакции была подобрана концентрация нормы лактата содержащаяся в слюне здорового человека 0.2; 0.4 ммоль\л и подобраны концентрации лактата в слюне подготовленных спортсменов 1,2,3,4,6,8 ммоль\л в соответствии с распределением зон интенсивности аэробной и анаэробной формы (Педанов и др., 1992; Тарасенко и др., 2008). На основе полученных точек для каждой концентрации построен колибровочный график зависимости интенсивности свечения от различных концентраций лактата (рисунок 3.1).

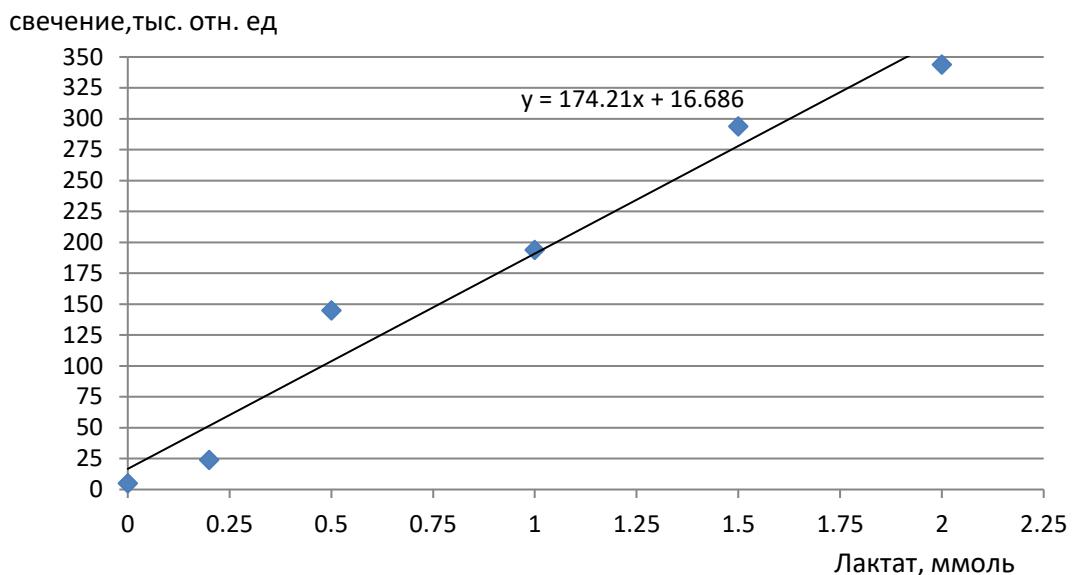


Рисунок 3.1 – Зависимость свечения триферментной системы лактатдегидрогеназа-оксидоредуктаза-люцифераза от концентрации лактата

В построении графика за точку ноль используется уровень свечения триферментной системы без добавления главного исследуемого субстрата молочной кислоты. Данная точка дает возможность абстрагироваться от влияния базовых компонентов системы.

Нам известно, что слюна очень сложная биологическая жидкость, вырабатываемая специализированными железами и выделяемая в ротовую полость. Количество и состав слюны человека варьируется в широких пределах. Для того чтобы избежать влияния других компонентов слюны на триферментную систему лактатдегидрогеназа-оксидоредуктаза-люцифераза был высчитан коэффициент ингибирования слюны. Для этого регистрировалось свечение трехферментной системы с лактатом и затем свечение системы с добавлением лактата и слюны с той же концентрацией лактата что и в первом случае. Эксперимент по каждой из предложенных ранее концентраций проделывали в трех повторностях, во избежание возможных погрешностей. Полученный коэффициент учитывался при построении градировочного графика зависимости свечения от концентрации лактата.

Концентрация лактата (молочной кислоты) является очень важным показателем, который может служить критерием оценки интенсивности нагрузки. Уровень лактата измеряется в милях лактата на литр. В покое у здорового человека концентрация лактата составляет 0,2–0,44 ммоль/л. Для физически подготовленного человека норма составляет 1–2 ммоль/л. После энергичных физических действий этот показатель повышается. Для определения уровня лактата в слюне была взята группа студентов одного возраста. Отбор проб производился до занятия физической культурой и после интенсивного занятия в течение 60 минут. Регистрировалось свечение в спокойном состоянии и после физической нагрузки.

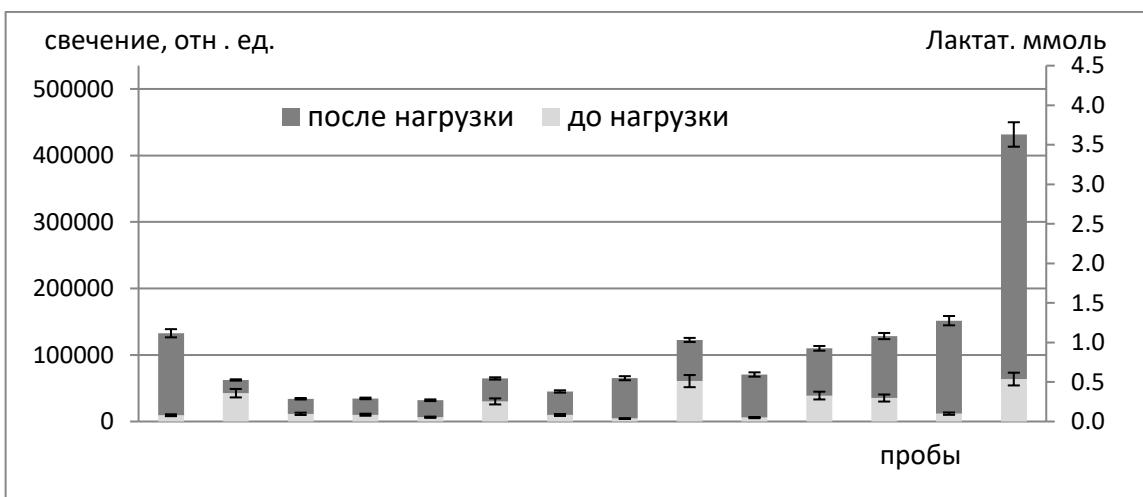


Рисунок 3.2 – Влияние на биолюминесцентные системы слюны до и после нагрузки в зависимости от количественного и качественного состава метаболитов (лактат)

Как видно из графика у всех испытуемых уровень свечения возрос в разных количествах, что свидетельствует о индивидуальной подготовленности каждого студента (рисунок 3.2). Уровень концентрации лактата соответствующий уровню свечения системы в каждом случае определялся по поколибровочному графику (рисунок 3.1).

В качестве альтернативного метода определения концентрации лактата (молочной кислоты) в слюне, был использован колориметрический метод Баркера и Саммерсона

Были изучены спектры поглощения проб слюны до добавления к ним лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и после добавления ЛДГ, с целью определения концентраций лактата содержащихся в слюне (рисунок 3.3). Для экспериментальных спектров, полученных в данной работе, величина оптической плотности D_{340} до добавления ЛДГ в пробу составляет 0,03–0,3, а после добавления ЛДГ величина оптической плотности D_{340} составляет 0,5–0,65.

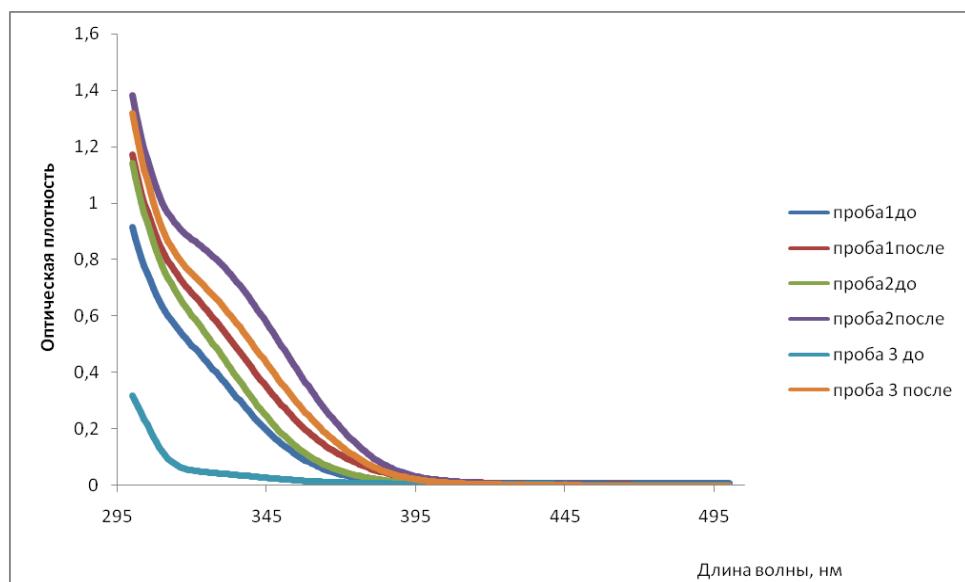


Рисунок 3.3 – Спектры поглощения проб слюны

Исследуемые пробы слюны так же были исследованы с использованием трехферментной системы лактатадегидрогеназа-НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза.

Таблица 3.1 – Концентрации лактата в слюне полученные колометрическим и триферментным методом

№	Колориметрический метод [лактат], мМ	Трехферментная система ЛДГ + Р + Л [лактат], мМ
1	0,12±0,012	0,2±0,02
2	0,76±0,07	0,8±0,08
3	1,23±0,01	1,5±0,15

Показано (таблица 3.1), что значения интенсивности свечения триферментной системы могут быть рассчитаны в соответствии с концентрациями лактата, зарегистрированными в образцах слюны. Кроме того, полученные значения интенсивности свечения триферментной системы в присутствии образцов слюны, содержащих лактат, подтверждались стандартным колориметрическим методом определения молочной кислоты по Баркеру и Саммерсону. Таким образом, предлагаемая биолюминесцентно-сопряженная триферментная система ЛДГ + Р + Л может быть использована в качестве биологической части биосенсора для профилактического скрининга и неинвазивного инструмента для мониторинга уровня молочной кислоты во время физической активности. Показана возможность применения созданного подхода для проведения специфического метода определения лактата в слюне. Найдены и подобраны условия для максимальной чувствительности метода к изменению состояния спортсменов, используя концентрацию метаболита (лактата) в слюне.

Составлен колибровочный график зависимости интенсивности свечения от различных концентраций лактата, который упрощает процедуру обработки результатов. Проведено альтернативное исследование по измерению уровня лактата в слюне. Показано, что уровень свечения трехферментной системы показывает те же концентрации лактата, что и спектроскопический метод. Проведена апробация разрабатываемого метода на фокус группе. Полученные

результаты позволили определить уровень лактата разрабатываемым методом (Zhukova et al., 2023).

3.2 Интегральный биолюминесцентный ферментный биотест

Биотестирование, основанное на ингибировании активности ферментов, является важным звеном в создании технологии мониторинга, отражающим действие сложных систем, таких как слюна, на биохимическом и молекулярном уровне. Принципы выбора ферментативных систем основаны на отслеживании полного набора функций жизнедеятельности организма по активности ключевых ферментов, в том числе основных катаболических и анаболических путей и простоте проведения анализа. Гипотеза данной части исследования состояла в том, что сложные среды, такие как слюна, по-разному влияют на информативный сигнал ферментативной реакции, в зависимости от функционального состояния организма, в том числе – от среды, в которой находится человек.

Для проверки гипотезы были проведены эксперименты по определению состава «биологической части» комплексного ферментативного биотеста, а также влияния разных образцов слюнной жидкости на комплексный биотест.

В качестве предварительного исследования была проведена проверка влияния слюнной жидкости лиц разной категории деятельности, в количестве по 10 человек на ферментативную систему (Л+Р) (рисунок 3.4). Замечены различия влияния слюны испытуемых на свечение в зависимости от их вида деятельности.

В разных сферах деятельности испытывается разная нагрузка на организм и, соответственно, формируются разные виды стресса. Появилась необходимость исследовать эти стрессовые факторы в отдельности, в зависимости от вида нагрузки, влияющей на организм.

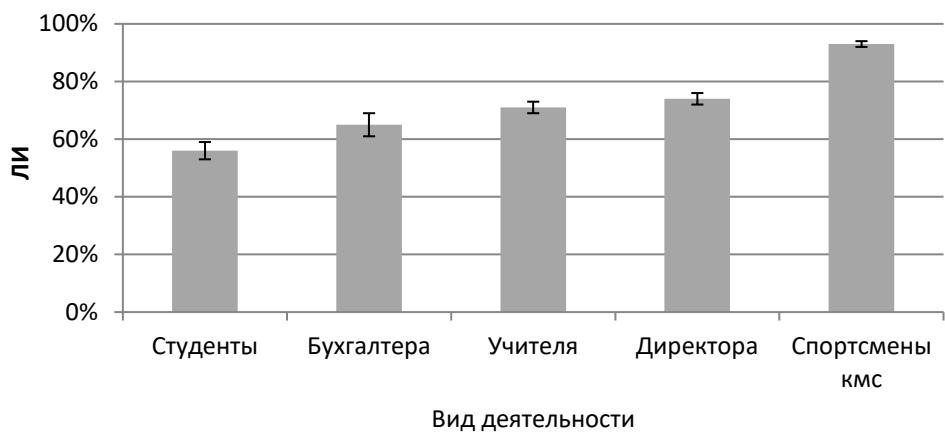


Рисунок 3.4 – Влияние вида деятельности на величину люциферазного индекса (ЛИ)

Для выявления закономерности влияния слюнной жидкости на сигнал ферментативной системы были исследованы: физическая, умственная и трудовая нагрузка. Известно, что изменение катаболического состава слюны может меняться под воздействием, как физических нагрузок, так и умственных, а также под влиянием стрессового состояния, полученного от различных трудовых нагрузок. Из источников литературы известно, что разные виды стресса, вызванные различными нагрузками, по-разному влияют на состав метаболитов в слюне. Поэтому важно увидеть влияние разных видов нагрузки на остаточное свечение биолюминесцентной системы.

3.2.1 Влияние физической нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны

Для определения влияния физической нагрузки выбрана группа испытуемых, состоящая из студентов, без специальной подготовки (контрольная группа), спортсменов с квалификацией КМС, спортсменов с квалификацией мастер спорта. При исследовании влияния физической нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны испытуемых показано, что величина ингибирования биолюминесцентного

свечениея тест-системы зависело от уровня тренированности. Показано, что слюна экспериментальных групп спортсменов разной квалификации после тренировок меньше ингибировала свечение биолюминесцентной тест-системы, чем в контрольной группе имеющую базовую физическую подготовку (рисунок 3.5). Уровень свечения ферментативной системы у спортсменов до тренировки и после меняются незначительно, в отличие от контрольной группы, у которой люциферазный индекс достоверно выше по отношению к результатам, полученным после тренировки.

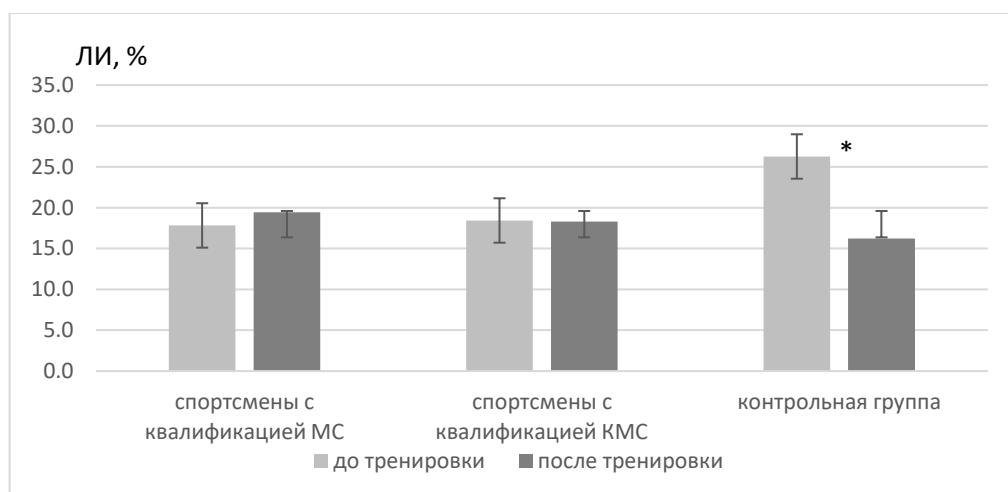


Рисунок 3.5 – Изменение остаточного свечения биферментной системы в присутствии слюны контрольной группы и экспериментальных групп с разными спортивными квалификациями до и после тренировок.

*- достоверность различий между показателями контрольной группы и спортсменов квалификации МС и КМС при $p \leq 0,05$

Биолюминесцентное тестирование слюны испытуемых на протяжении 5-и тренировочных дней показало, что характер физической нагрузки по-разному влиял на изменение величины остаточного свечения (рисунок 3.6). Величина остаточного свечения после тренировки уменьшалась при низкой физической нагрузке и увеличивалась - при высоких нагрузках. По величине изменения остаточного свечения биферментной системы можно полагать, что

экспериментальная группа испытывала большую физическую нагрузку на организм, чем контрольная.

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

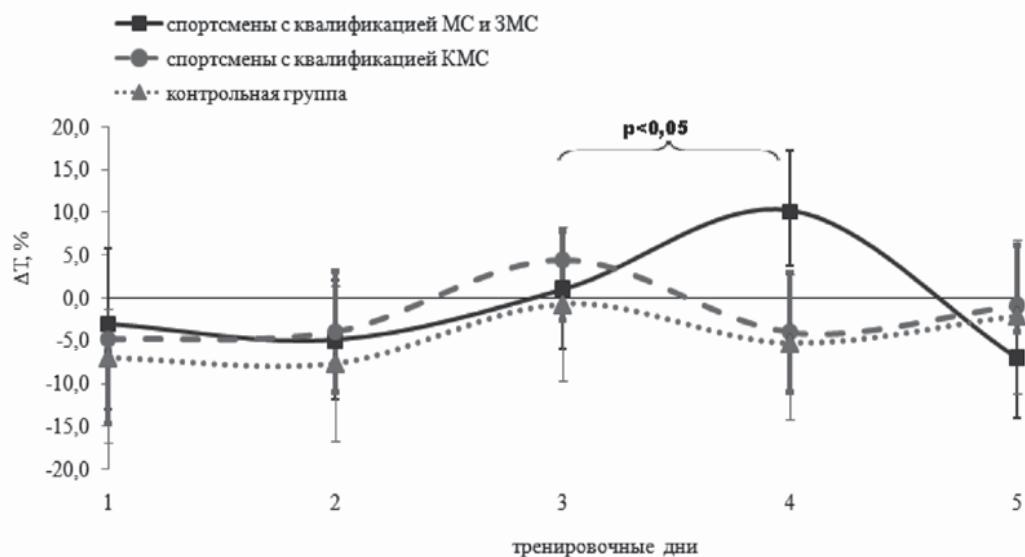


Рисунок 3.6 – Изменение остаточного свечения в тренировочных днях с увеличивающейся физической нагрузкой в контрольной группе и экспериментальных группах с разной спортивной квалификацией

Спортсмены высшей квалификации имели наибольшие показатели изменения остаточного свечения биферментной системы в 4-й тренировочный день. Изменение остаточного свечения у спортсменов средней квалификации (со спортивным разрядом КМС) достигало максимума на 3-й тренировочный день с меньшей величиной, чем у высококвалифицированных спортсменов. В контрольной группе наблюдали низкую величину изменения остаточного свечения во всех тренировочных днях. Достоверное высокое значение изменения остаточного свечения, наблюдаемое у спортсменов высшей квалификации в день наибольшей физической нагрузки (4-й день), свидетельствовало об их хорошей физической подготовленности. Максимальное значение изменения остаточного свечения биферментной

системы у спортсменов средней квалификации достигалось в середине тренировочного микроцикла (3-й день) и ниже на 5,9 %, чем у спортсменов с высшей квалификацией, что характеризовало их физическую подготовленность не такой высокой. По изменению остаточного свечения биферментной системы после тренировок можно определить характер физической нагрузки на организм спортсменов. Снижение величины остаточного свечения после тренировки происходило при низкой физической нагрузке, возрастание – при большой нагрузке на организм. Таким образом, показано влияние физического стресса на характеристику слюнной жидкости при помощи биолюминесцентного теста.

Для подтверждения физической нагрузки были проведены стандартные исследования функционального состояния организма человека при физической подготовке: ЧСС в покое и после тренировки, ортостатическая проба и форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Показатели функционального состояния организма студентов, не занимающихся спортом (контрольная группа), и спортсменов разной квалификации до и после тренировок

Испытуемые группы	ФЖЕЛ, л	Ортостатическая проба	ЧСС в покое, уд.мин.	ЧСС после тренировки уд.мин.
Контрольная группа	3.3±1.2*	10±4.6*	79.6±8.9*	130±12.8*
Спортивный разряд КМС	4.5±1.3*	15.1±4.6*	66.1±4.9*	143±11.6*
Спортивный разряд МС	5.6±1.2*	21.2±7.3*	62±4.1*	147±8.4*

Примечание: * статистически значимое различие между показателями экспериментальных групп и контрольной группой при $p \leq 0.05$.

Похожие результаты были получены при сравнении студентов ($n=25$) и спортсменов борцов ($n=25$) (рисунок 3.7).

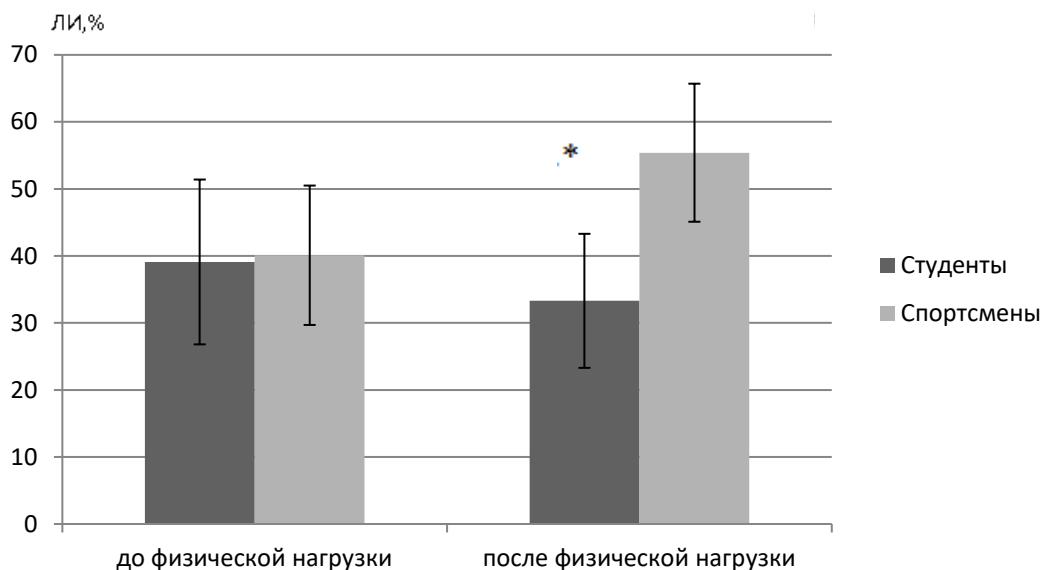


Рисунок 3.7 – Влияние образцов слюны (студентов, борцов) на биолюминесцентную систему до и после физической нагрузки. Остаточную люминесценцию ($I_{exp}/I_c, \%$) рассчитывали как отношение максимальных интенсивностей биолюминесценции экспериментального измерения (I_{exp}) к контрольной (I_c), умноженное на 100

Образцы слюны вызывали ингибирующий ответ на биолюминесценцию (Л+Р) перед физической нагрузкой в обеих группах. Остаточное свечение биолюминесценции, составила $39,1 \pm 12,3\%$ для студентов и $40,1 \pm 10,4\%$ для борцов. После физической нагрузки образцы слюны значительно увеличивали подавление интенсивности биолюминесценции в студенческой группе, в которой величина остаточного свечения составила $33,3 \pm 10,0\%$. Напротив, после физической нагрузки величина остаточного свечения у борцов достоверно ($P < 0,05$) возросла до $55,4 \pm 10,3\%$ (Kratasyuk et. al., 2020). Данные результаты показывают чувствительность биолюминесцентной ферментативной системы к показателям слюнной жидкости, в зависимости от физической подготовленности и, соответственно, полученного стресса организмом при физической нагрузке (Stepanova L.V., et al. 2017).

3.2.2 Влияние умственной нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны

При рассмотрении влияния умственной нагрузки на характер сигнала в форме остаточного свечения биолюминесцентной ферментативной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза была выбрана группа студентов юношеского возраста (18–20 лет). Протестирована слюна до сессии (состояние покоя) и во время сессии (умственное напряжение) (рисунок 3.8).

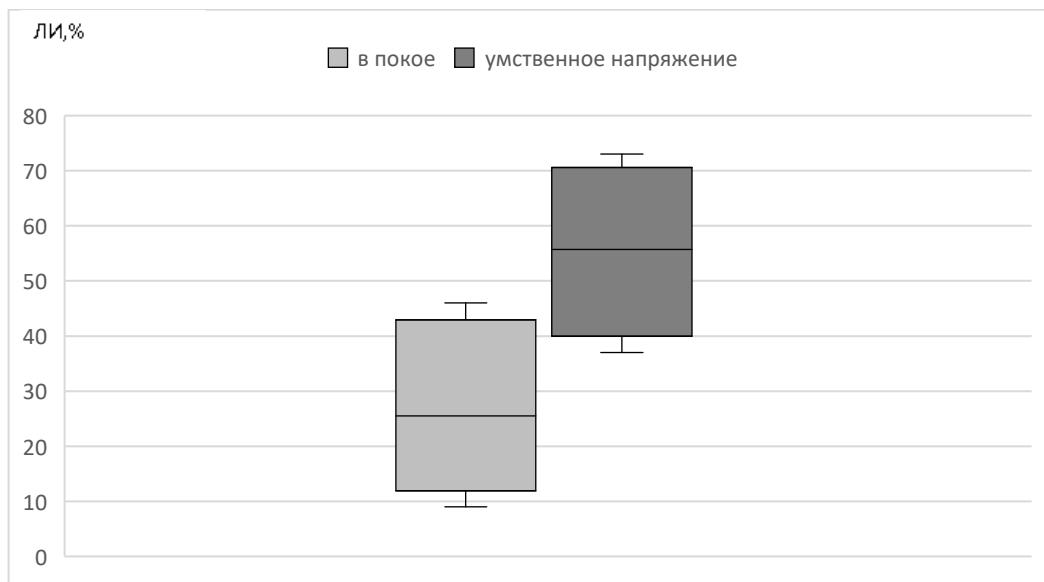


Рисунок 3.8 – Остаточное свечение биферментной биолюминесцентной системы в присутствии слюны представителей юношеского возраста до и после стрессовой нагрузки. Достоверность при $p \leq 0.05$

Результаты биолюминесцентного тестирования слюны представителей юношеского возраста в покое (до нагрузки) показали, что ингибиция свечения биферментной биолюминесцентной системы достигает до 18,8 %. После умственной нагрузки на организм представителей юношеского возраста остаточное свечение биферментной биолюминесцентной системы в присутствии слюны достоверно возрастает до 55,7 % ($p < 0,05$). Таким образом, слюна представителей юношеского возраста в нормальном функциональном состоянии здорового организма ингибирует свечение биферментной

биолюминесцентной системы до 18%. Слюна представителей юношеского возраста при стрессовой нагрузке на здоровый организм в виде умственного утомления достоверно снижает ингибицию свечения биферментной биолюминесцентной системы до 55,7%.

Показатели стрессоустойчивости (СУ), ситуативной (СТ) и личностной (ЛТ) тревожности оценивали по баллам: до 30 баллов – низкая, 31–45 баллов – умеренная, 46 и более – высокая. Вероятность развития стресса оценивали по уровню тревоги: при показателях 5–15 баллов – низкий уровень тревоги, при показателях выше 15 – повышенный уровень тревоги (снижение стрессоустойчивости), при показателях 40–50 – развитие дистресса. Для прогноза эустресса рассматривалась количественная сторона утверждений до 25 баллов.

Таблица 3.3 – Показатели уровня тревожности и стрессоустойчивости по тесту Спилбергера-Ханина – для выявления общего уровня тревожности и тесту Немчина и Тейлора – для определения склонности к развитию стресса

Вид нагрузки	Ситуативная тревожность (баллы)	Личностная тревожность (баллы)	Стрессоустойчивость (баллы)
В состоянии покоя	30	45	11
Умственное напряжение	39*	39*	12

Примечание *- достоверное различие ($p < 0,05$).

Стрессоустойчивость студенческой молодежи характеризуется низким уровнем тревожности, но с умеренной чувствительностью к ситуативной и личной тревожности в состоянии покоя. Во время умственного напряжения тревожность достоверно повышалась до средних показателей за счет возрастания ситуационной тревожности.

Показано, что биолюминесцентная ферментативная система (Л+Р) обладает чувствительностью к изменению слюнной жидкости, вызванной умственным напряжением. В связи с большим разбросом полученных

результатов, выявлена необходимость учета других факторов, влияющих на результаты анализа (Zhukova et. al., 2022). Полученные результаты закономерного влияния слюнной жидкости на сигнал в форме остаточного свечения биолюминесцентной ферментативной системы, при умственной и физической нагрузке послужило основой для создания метода определения рабочей трудовой нагрузки для работников предприятий с целью сохранения здоровья сотрудников и человеческих ресурсов для организации. Определено, что в результате тестирования слюнной жидкости биолюминесцентным методом происходит разделение на группы по уровню подготовки организма к нагрузке, этот результат мы учитывали при дальнейшей разработке системы мониторинга трудовой нагрузки работников.

3.2.3 Влияние трудовой нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны

В исследовании приняли участие работники оперативно-диспетчерского состава Красноярской железной дороги-филиала ОАО «РЖД». Предварительно данные об участниках испытаний были обезличены, от каждого испытуемого получено информированное согласие на обработку данных и добровольное участие в эксперименте.

Для выявления факторов, влияющих на анализ, было проведено анкетирование по самооценке состояния организма, включающее информацию о вредных привычках, режиме питания, стаже работы, самооценке стрессового состояния. Результаты медицинских осмотров, содержащие показатели общеклинических анализов крови и мочи и другие терапевтические показатели здоровья, были предоставлены ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-медицина». На основании анкет и результатов медицинских осмотров работники были поделены на 2 группы. Первую группу участников составляли работники преимущественно без вредных привычек, имеющие стаж работы более 10 лет и показатели медицинского

осмотра, соответствующие нормам здорового человека. Участниками второй группы были работники, имеющие разный стаж работы, отклонения в показателях медицинского осмотра и вредные привычки.

По результатам биолюминесцентного тестирования участники, входящие в первую группу относительно здоровых сотрудников, отличались устойчивой реакцией на нагрузку, что выражалось в том, что величины остаточного свечения для каждого испытуемого либо всегда увеличивалась после рабочей смены, либо всегда уменьшалась. Поэтому участники первой группы разделились еще на 2 подгруппы. Для обследуемых первой подгруппы характерно устойчивое повышение уровня остаточного свечения после рабочего дня (рисунок 3.9А). Для обследуемых второй подгруппы относительно здоровых сотрудников характерно устойчивое понижение величины остаточного свечения после рабочего дня (рисунок 3.9Б). Измерение концентрации лактата в слюне участников первой группы показало отсутствие физических перегрузок или усталости (рисунок 3.9А и 3.9Б). Такие результаты также хорошо согласуются с результатами анкетирования данных работников, где они утверждают, что не испытывают перегрузок на рабочем месте.

Различия для 1 и 2 подгрупп, возможно, объясняются особенностями окислительно-восстановительного метаболизма организма испытуемых. Схожие результаты были получены при исследовании влияния образцов слюны спортсменов на активность биферментной системы Р + Л, представленные ранее (рисунок 3.5). Важным было получение стабильного ответа показателя на стрессовую нагрузку.

При исследовании влияния слюны испытуемых второй группы на активность Р + Л системы было выявлено как повышение, так и понижение величины остаточного свечения биферментной биолюминесцентной Р + Л системы после трудового дня (рисунок 3.9В). При этом содержание лактата в слюне уменьшалось после рабочей смены во всех изученных случаях, что свидетельствовало о наличии физической нагрузки на организм. Такая неустойчивая реакция биолюминесцентной Р + Л системы на добавление

слюны испытуемых второй группы может быть следствием большого числа факторов, к которым можно отнести и небольшой опыт работы в профессии, курение, частое употребление кофе, привычка не завтракать перед сменой и др. Все эти факторы позволяют отнести испытуемых этой группы к группе риска, так как организм испытуемых не был адаптирован по разным причинам к трудовым нагрузкам. Хорошая корреляция между характеристиками этой группы работников и неустойчивой реакций на рабочую нагрузку показывает возможности биолюминесцентного теста для выявления профессиональной неуспешности работника.

Таким образом, по результатам биолюминесцентного анализа образцов слюны работников железнодорожного транспорта на активность Р + Л системы была показана возможность первичной экспрессной оценки стрессового состояния организма сотрудника, вызванного выполнением трудовых функций. Показана возможность выявления группы риска по изменению интегрального биолюминесцентного показателя слюнной жидкости, а также возможности мониторинга состояния организма в течение рабочей смены.

Определены условия, снижающие влияние рабочей нагрузки на работников, необходимые для создания эффективных мер для профилактики перегрузок и сохранения трудоспособности работников. Биолюминесцентный показатель для слюны после рабочей смены был постоянно повышен или понижен вследствие особенностей окислительно-восстановительного метаболизма организма для стрессоустойчивых работников, которые способны справляться с перегрузками. Величина биолюминесцентного показателя взаимосвязана с пониженной концентрацией лактата, минеральным обменом и продуктами перекисного окисления липидов. При этом концентрация лактата после трудовой нагрузки у женщин в отличие от мужчин всегда понижена, что характеризовало их способность адаптироваться к трудовой нагрузке в течение дня.

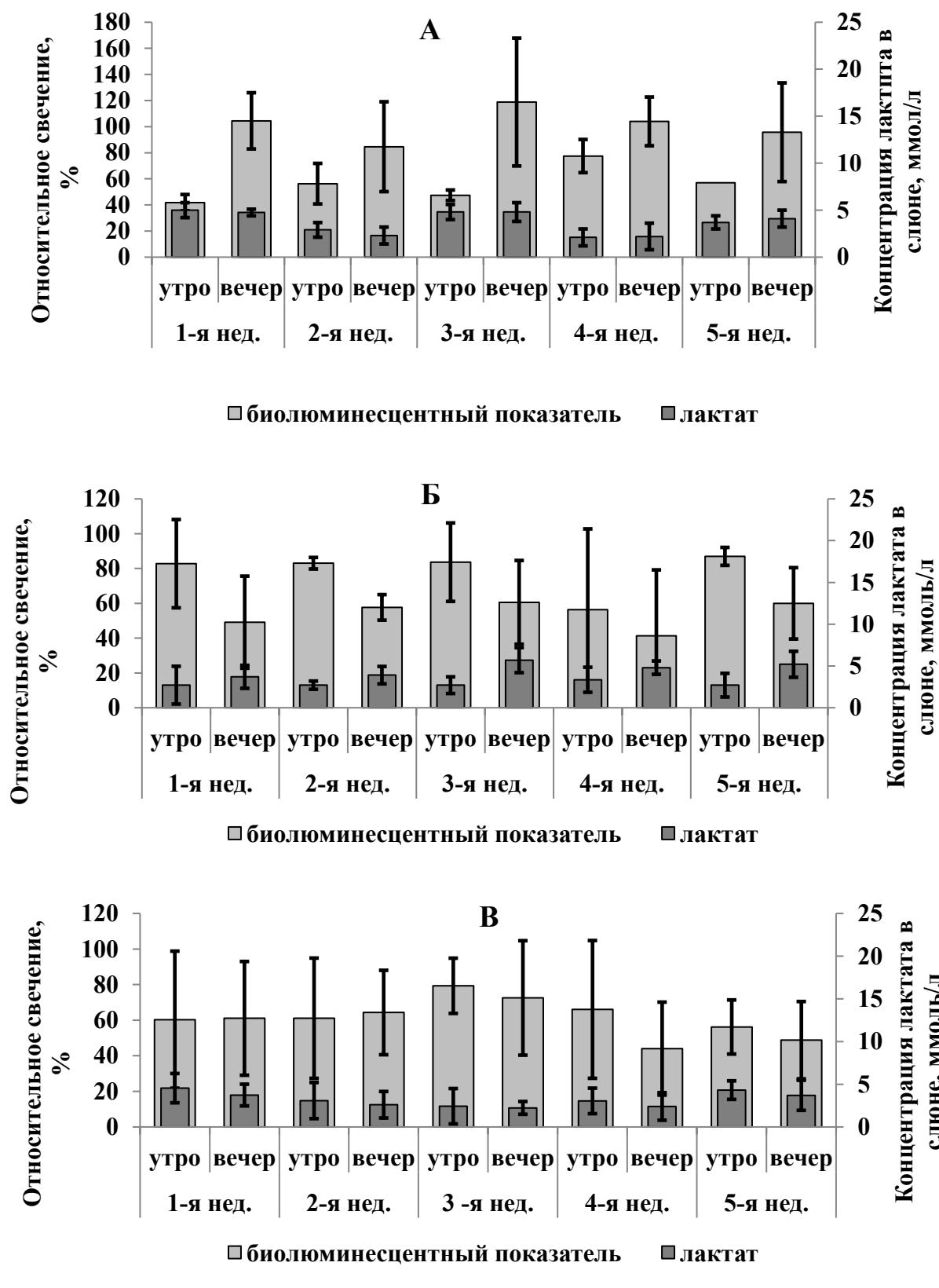


Рисунок 3.9 – Изменение биолюминесцентного индекса слюны при тестировании рабочей нагрузки сотрудников диспетчерского состава. Усредненные показатели. (А-3–первая группа, Б – 2 группа, В – третья группа)

Постоянно изменяющийся биолюминесцентный показатель слюны был характерен для работников группы риска, имеющих хронические заболевания и вредные привычки. Изменение биолюминесцентного показателя было взаимосвязано с повышением концентрации лактата, сдвигом рН, накоплением продуктов перекисного окисления липидов, нарушением баланса «свободные радикалы — АОЗ» и минерального обмена.

Несомненно, слюна является сложным биохимическим веществом с аналитической точки зрения. В наших исследованиях различная нагрузка приводит к изменениям различных аналитических параметров. При исследовании разных групп людей с различной нагрузкой на организм выявлено большое количество факторов жизнедеятельности и индивидуальных показателей организма, существенно влияющих на результаты анализа (Zhukova et. al., 2024; Stepanova et. al., 2024).

3.3 Выявление факторов и установление корреляционных взаимосвязей между результатами биолюминесцентного теста и индивидуальной реакцией организма человека на нагрузку

Смешанная слюна является многокомпонентной биологической жидкостью, в состав которой входят белки, ферменты, гормоны, липиды, углеводы и минеральные компоненты из слюнных желез, сыворотки крови и тканей полости рта. Очевидно, что ее компонентный состав меняется в зависимости от циркадных ритмов. Полость рта рассматривается как комплексная экологическая система, в которой внешние факторы (социальные, индивидуальные, биологические) теснейшим образом взаимодействуют с внутренними (слизистая оболочка, пародонт, бактериальное сообщество, локальная иммунная система, слюна). Множественность функций слюны обусловлена как ее жидкостными характеристиками, так и ее специфическими компонентами, без которых продолжительное функционирование было бы невозможным.

При исследовании слюны биолюминесцентным методом были замечены не всегда однозначные результаты, очевидно кинетику биолюминесцентной реакции могут менять компоненты, меняющиеся в слюне, в том числе микроэлементы. Микроэлементы играют существенную роль в реализации биологических функций организма и содержатся практически во всех физиологических жидкостях организме, в том числе и слюне (Троегубова, 2014). Были исследованы образцы слюны группы спортсменов с аэробным и анаэробным типом нагрузки до и после тренировочного процесса. Исследование элементного статуса проводили методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротемпературной атомизацией в графитовой печи поперечного нагрева в технике микроанализа. Интегральный показатель определяли биолюминесцентным методом тестирования.

Таблица 3.4 – Показатели состава слюны до и после физической нагрузки у спортсменов с аэробной и анаэробной нагрузкой

параметры	аэробная нагрузка		анаэробная нагрузка	
	до	после	до	после
Интегральный показатель, %	84 ± 5.9	71 ± 6.3	42 ± 4.1	53 ± 4.5
Cu мг/л	0.008 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.003 ± 0.001
Mn, мг/л	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0.002 ± 0.005
Fe, мг/л	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.08	0.05 ± 0.01
Zn, мг/л	0.35 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.25 ± 0.1	0.07 ± 0.02
K, ммоль/л	9.8 ± 3.6	9.7 ± 2.5	8.4 ± 3.3	8.9 ± 3.1
Na, ммоль/л	16.8 ± 9.3	9.3 ± 2.6	24.9 ± 8.5	21.4 ± 7.9
Mg, ммоль/л	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Ca, ммоль/л	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.2

По результатам исследования у спортсменов с аэробной нагрузкой достоверно выше концентрация Cu, Mn, Zn. Выявлено снижение концентрации Cu и Zn после тренировки в обеих группах ($P < 0,05$). Концентрации Mn и Fe имеют незначительные изменения после тренировки. При исследовании концентрации K, Na, Mg, Ca наблюдалось

преимущественно уменьшение концентрации после физической нагрузки (Kratasyuk et. al., 2020). Биолюминесцентный интегральный показатель также достоверно ниже в группе с анаэробной нагрузкой, что отражает суммарный эффект воздействия нагрузки на живой организм и дает возможность первичного диагностирования и контроля тренировочного процесса. Ранее уже показывалась чувствительность сопряженной ферментной системы Red + Luc к ионам тяжелых металлов в присутствии пестицидов (Esimbekova et al. 2021), что подтверждает полученные результаты.

Статистический анализ результатов исследования группы с трудовой нагрузкой показал, что прогностическими критериями и биомаркерами состояния организма участников может быть изменение биолюминесцентного показателя для слюны, коррелирующего с разницей в концентрации лактата в слюне ($r = -0.6$) $p=0,05$ (разница концентрации лактата повышена для пониженного биолюминесцентного показателя и наоборот) и с отклонением в весе ($r = -0.6$) $p=0,05$ (биолюминесцентный показатель понижен для участников с повышенным индексом массы тела, вследствие высокой концентрации холестерина и глюкозы) (Мандра и др. 2016; Arakawa T. et al., 2020). При этом компонентный состав слюны участников при трудовой нагрузке может содержать пониженную концентрацию мочевины ($r = 0.9$) за счет денатурации белков (Soni et al., 2018), снижение интенсивности перекисного окисления липидов за счет повышения активности каталазы ($r = -0.8$), вследствие чего понижается концентрация триеновых конъюгатов (продуктов перекисного окисления липидов) ($r = -0.8$), а также концентрация хлоридов ($r = -0.8$) вследствие нарушения кислотно-щелочного баланса организма, вызванное наличием вредных привычек, в частности курения. К участникам, предрасположенным к трудовым перегрузкам, можно отнести людей, у которых частое употребление кофейных напитков связано обратной зависимостью со стажем работы ($r = -0.5$), степенью утомления ($r = 0.5$) и волнения ($r = -0.5$), вследствие чего понижается концентрация натрия в слюне ($r = -0.9$), что может спровоцировать нервные заболевания. Причиной

снижения адаптаций к трудовым нагрузкам может быть курение, вызывающее понижение концентрации нитратов ($r = -0.8$) и повышение концентрации лактата ($r = 0.6$) в слюне. Пониженная концентрация общего белка ($r = -0.8$), потеря ионов калия ($r = -0.9$), отклонения в весе ($r = -0.8$), связанные с отсутствием завтраков, также являются факторами, увеличивающими влияние на организм трудовых нагрузок.

Для выявления наиболее значимых факторов, влияющих на результаты, исследований, были проанализированы данные из медицинских карт, биохимические показатели крови и данные из специально разработанных анкет, включающие субъективную оценку стресса и работоспособности до и после смены, информацию о режиме дня, потреблении пищи, лекарственных средств, энергетических напитков и табака. Статистическая обработка имеющихся данных была проведена в программе Statistica (StatSoft, США) с использованием методов корреляции Спирмена и U-теста Манна-Уитни (Бельская и др. 2018).

На основе всех полученных факторов и анализов сформирована база данных. Все показатели проанализированы с помощью корреляционного анализа по методу Спирмена, с целью поиска взаимосвязи показателей слюны, биохимических и анкетных данных, была принята гипотеза о том, что распределение полученных данных не является нормальным. Все рассчитанные коэффициенты корреляции были статистически значимыми на уровне $p \leq 0,05$. Анализ проводился на общей выборке с последующим определением факторов, влияющих на тестирование (Р+Л). Были выделены группы мужчины/женщины. Так как значимым фактором у женщин являлось курение ($r = -0,699301$), был проведен суженный анализ по этому параметру. Субъективные оценки испытуемыми своих должностных обязанностей и их отношения к этому тоже являлись факторами, которые оказывали значительное влияние на результаты анализа.

Таблица 3.5 – Показатели, коррелирующие с остаточным свечением биолюминесцентной системы для р-уровня $\leq 0,05$

Маркеры слюны		Анкетные данные		Маркеры крови	
Лактат	$r = -0.6$	уровень утомления	$r = -0.3$	моноциты	$r=0,17$
Глюкоза	$r = 0,44$	возраст	$r = 0.2$	лейкоциты	$r=0,6$
Активность каталазы	$r = -0.8$	стаж работы	$r = -0.5$	эритроциты	$r=0,06$
Концентрация фторидов и фосфатов	$r = 0.6$	вес	$r = -0.6$	гемоглобин	$r=0,06$
Общий белок	$r = 0.5$	отношение к работе (женщины)	$r = -0,618$	Холестерин	$r = 0,671$
Мочевина	$r = 0.9$	за сколько курили до сдачи пробы	$r = -0,699$	Глюкоза	$r=0,47$
Концентрации нитратов	$r = -0.8$	курение	$r = -0.8$	нейрофилы	$r<0.05$
Концентрации хлоридов	$r = 0.6$	употребление кофе	$r = 0.5$	Базофилы	$r<0.05$
Диеновые и триеновые конъюгаты,	$r = 0.5$	отсутствие завтрака	$r = -0.9$	гематокрид	$r<0.05$
Основания Шиффа	$r = -0.8$	проблемы со сном	$r<0.05$	тромбоциты	$r<0.05$

Приведенные значения коэффициентов корреляции при $p \geq 0,95$ указывают на прямую и обратную зависимость между исследуемыми параметрами, среди которых встречаются средние корреляции. Также был проведен анализ двух независимых выборок, сгруппированных по принципу увеличения/уменьшения параметра у одного и того же испытуемого, в рамках среднего значения, за все разы измерения. Независимая выборка для U-тест Манна-Уитни не дала статистически значимых результатов, которые можно интерпретировать как зависимости одних параметров от других. Метод корреляции Спирмена продемонстрировал более высокую эффективность в выявлении взаимосвязей между многочисленными факторами, влияющими на исследуемые параметры. Несмотря на свою действенность для

предварительного анализа, данный метод недостаточен для интегрального биолюминесцентного анализа, направленного на оценку общего состояния организма. В связи с этим его применение было ограничено этапом первичной обработки данных. Базовый статистический анализ не позволяет эффективно определить взаимосвязи всех факторов, значимо влияющие на уровень остаточного свечения, поэтому в работе, для конструирования системы мониторинга, были применены алгоритмы машинного обучения. Эти методы позволили определить факторы, имеющие наибольшее влияние.

В качестве перспективных для анализа алгоритмов были выбраны ансамблевые алгоритмы машинного обучения, основанные на построении деревьев решений: CART, RandomForest, GradientBoosting, XGboost. Эти методы позволили определить факторы, имеющие наибольшее влияние.

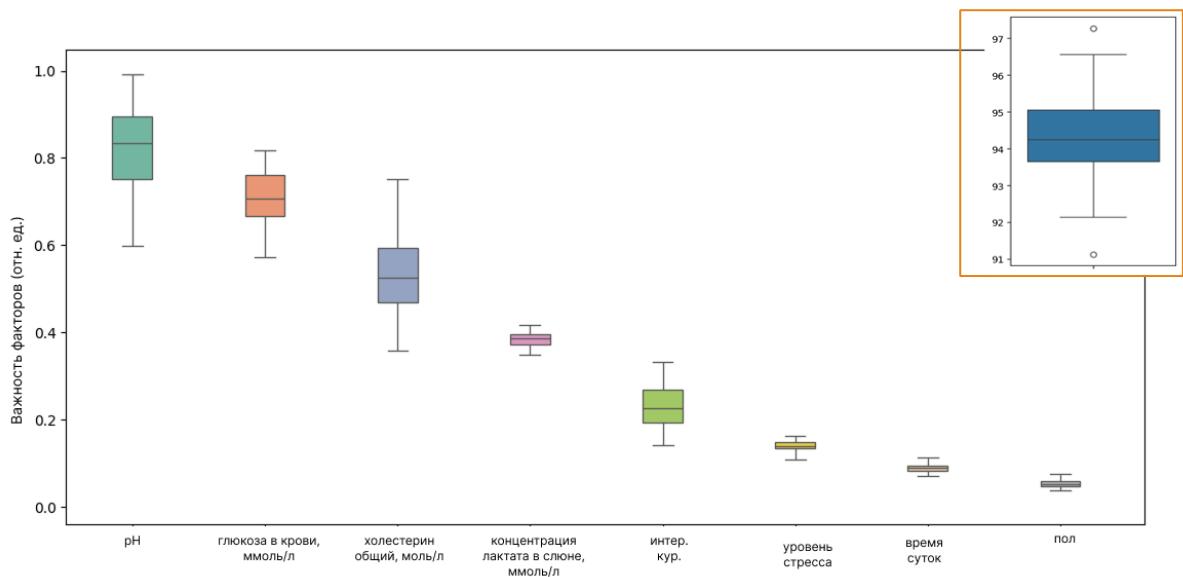


Рисунок 3.10 – Распределение факторов по уровню влияние на прогноз ЛИ% (*-статистическая значимость различий между признаками ($p < 0.05$))

С помощью регрессионного алгоритма машинного обучения Random Forest было получено ранжирование факторов по уровню влияния на прогнозирование уровня остаточного свечения. Среднее значение метрик обучения составило: MAE = 28.73; MS = 880.99; R² = 0.175. Наибольшее

влияние оказывают уровень рН, глюкозы в крови, уровень лактата в слюне, уровень холестерина в крови (рисунок 3.10). Такое распределение факторов по уровню значимости позволяет понять, какие факторы также нужно учитывать при оценке состояния организма с помощью биолюминесцентного метода тестирования. С помощью классификационного алгоритма случайного леса был предсказан уровень стресса работников РЖД (рисунок 3.11). Алгоритм был повторен 100 раз, что позволило понять разброс точности и значимости факторов.

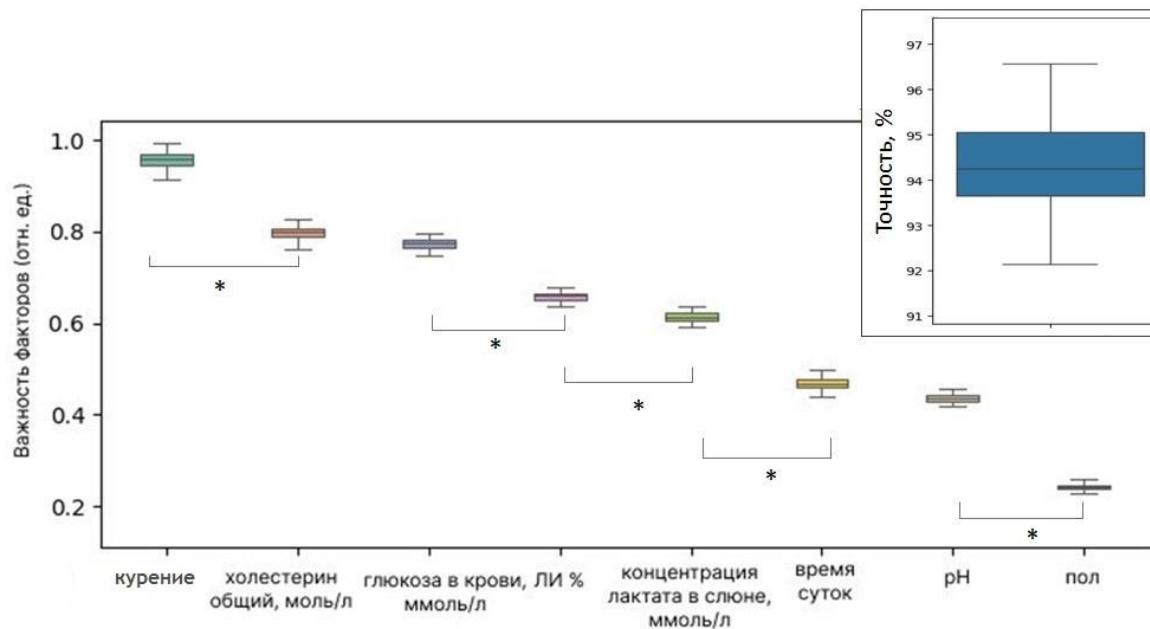


Рисунок 3.11 – Распределение факторов по уровню влияния на целевое значение (стрессовую нагрузку) методом Случайного леса (Random Forest) для алгоритма регрессии и классификации. Значимость фактора указана в условных единицах программы. Значимость рассчитана по коэффициенту Джини (рисунок 3.12)

Из диаграммы (рисунок 3.11) видно, что наиболее значимыми факторами являются: курение, уровни холестерина и глюкозы в крови, уровень остаточного свечения (ЛИ %).

Стоит отметить разную важность фактора курения. Если сам факт курит исследуемый человек или нет, обладает практически нулевой важностью, то

временной интервал между курением и забором пробы существенно выше. Такое расхождение можно объяснить быстрым нивелированием эффекта курения у слюны.

Таким образом, был проведен анализ данных методом деревьев решений, так как они имеют достаточную мощность для анализа табличных данных и позволяют оценить влияние различных факторов на результат. Было получено распределение факторов по уровню влияния. Данный метод обработки был нами включен в систему мониторинга физиологического состояния организма человека (Zhukova et al., 2025).

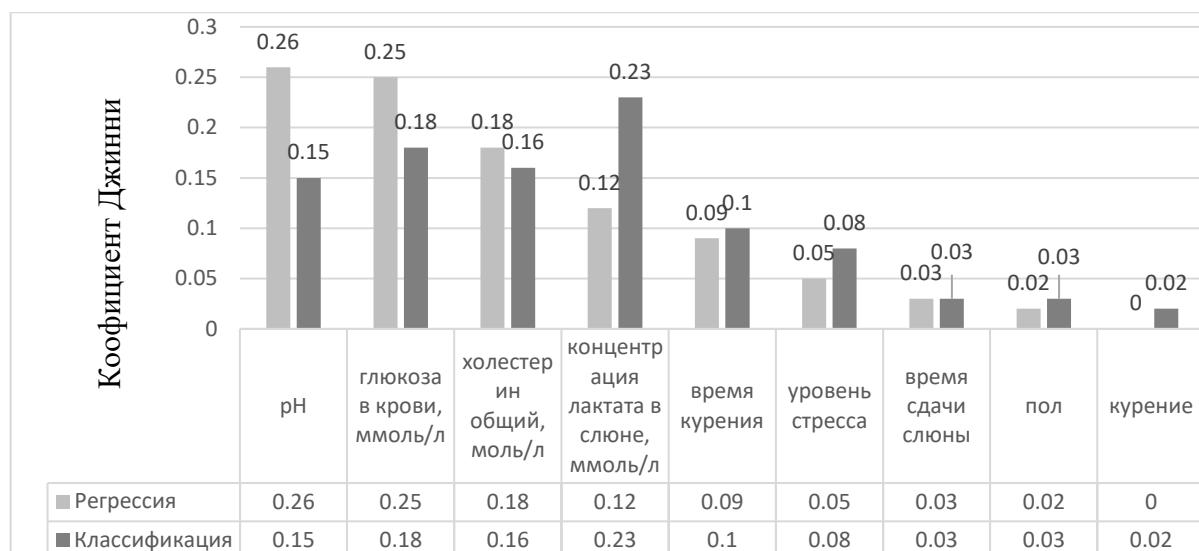


Рисунок 3.12 – Распределение факторов по уровню влияния на целевое значение для алгоритма Random Forest. Значимость фактора указана в условных единицах программы

Таким образом, был проведен анализ данных методом деревьев решений, так как они имеют достаточную мощность для анализа табличных данных и позволяют оценить влияние различных факторов на результат. Было получено распределение факторов по уровню влияния (pH, уровень глюкозы, холестерина, лактата, уровня стресса, курения), которое в дальнейшем использовалось для составления программного комплекса по выявлению главных факторов, влияющих на общее состояние исследуемых групп.

Данный метод обработки был нами включен в систему мониторинга организма с помощью биолюминесцентного метода.

3.4 Разработка программы сбора и анализа персонализированных данных

Применение машинного обучения позволило создать алгоритм, эффективно прогнозирующий состояние организма с реализацией на платформе Multiforms. Для автоматического сбора и анализа была создана база данных на основе информационной платформы Copyright © 2024 Multiforms v.1.4.1 <https://app.multiforms.ru/#/> (Коробко, 2024), содержащая всю анкетную информацию, которую необходимо учитывать при исследовании организма. Программа обеспечивает удобство сбора информации за счет самостоятельного заполнения данных испытуемыми. Для этого необходимо зайти на сайт, пройти небольшую регистрацию и заполнить поля, проставив «галочки» в желаемых окошках (рисунок 3.13).

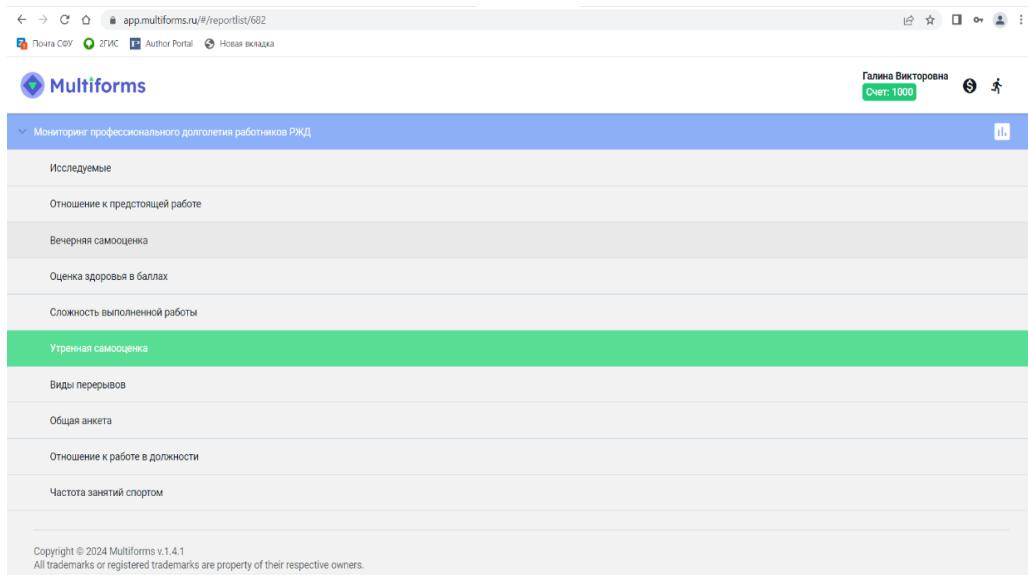


Рисунок 3.13 – Демонстрация входа в базу данных от имени модератора

Соответственно, в этой же программе испытуемый может увидеть результат своего исследования. Электронная анкета обеспечивает

анонимность, информацию о персональных данных, которую возможно увидеть, только зайдя под своим логином и паролем. Для исследователя, осуществляющего анализ, при открытии программы доступны только индивидуальные шифры и результаты анкетирования, для корректировки или подробного анализа.

Получены функциональные требования к искомому программному обеспечению: построение произвольных форм ввода данных, реализация механизма связывания отдельных фрагментов данных за счет использования общих справочников, обеспечение качества данных за счет определения множества допустимых значений или оценок для выбранных параметров, многопользовательский доступ с ограничением прав доступа к данным и формам, возможность оперативного аналитического исследования всех данных эксперимента, применение предобученных прогностических моделей к результатам анализа в виде скрипта. Ключевая особенность задачи информационно-аналитической поддержки изучения биологических маркеров профессионального здоровья и долголетия работников в сфере железнодорожного транспорта заключается в том, что эксперимент предполагает самостоятельное заполнение анкет испытуемыми. Система ввода данных должна поддерживать не только многопользовательский доступ к данным, но и разделение ролей на испытуемых и исследователей. Выполнен анализ современных программных средств анализа данных: MS Excel, Google Forms, MS Power BI, Multiforms. MS Excel, как табличный редактор, предоставляет широкие возможности по вводу данных и их анализу, но не обеспечивает консистентность и согласованность данных. Google Forms позволяет фиксировать информацию в режиме формы ввода (анкеты), но не поддерживает связывание фрагментов данных и анализа собранной информации. MS Power BI – мощнейший инструмент анализа данных с поддержкой применения методов искусственного интеллекта, который ориентирован на работу с ранее собранными и проверенными данными. Сравнение существующих инструментов ввода и анализа данных показало,

что отечественная программная платформа Multiforms удовлетворяет всем предъявленным требованиям.

Для создания программного продукта собрана следующая информация: медицинские карты, результаты лабораторных исследований проб слюны, утренние и вечерние анкеты испытуемых. Медицинские карты содержат 54 параметра, характеризующих здоровье испытуемых: заключения узкими специалистами, хронические заболевания, результаты общеклинических, биохимических и гематологических исследований. Лабораторные исследования проб слюны включают кислотно-щелочной показатель; концентрацию лактата; лиофилизованный реагент (КРАБ) (остаточное свечение); иммобилизованный реагент (Энзимолюм), остаточное свечение, и кортизол в слюне. Утренняя и вечерняя анкета содержат по 10 вопросов, 5 из которых – логические (требуют ответа «да» или «нет», 1 открытый вопрос, предполагающий развернутый ответ, 2 числовых, подразумевающих ввод конкретного числа, и 2 вопроса с оценкой по заданной шкале.

На основе рекомендаций для создания электронной квалификационной карты работников железнодорожного транспорта для ввода и хранения указанной информации на платформе Multiforms было разработано 18 форм ввода. Справочники, используемые для связывания отдельных форм ввода: исследуемые, время отбора проб и реестр проб. Справочники для фиксации допустимых значений в ответах на вопросы анкеты: Отношение к предстоящей работе, Оценка здоровья в баллах, Сложность выполненной работы, Виды перерывов, Отношение к работе в должности, Частота занятий спортом, Особые режимы питания, Группы лекарственных средств, Пол. Формы ввода для испытуемых, доступные в режиме электронной анкеты: Общая анкета, Утренняя самооценка и Вечерняя самооценка (рисунок 3.24). Формы ввода, доступные лаборантам и исследователям: Биохимические исследования, КРАБ, Лактат, Тестирование на Энзимолюме, pH слюны. В совокупности разработанные формы ввода составляют Систему информационно-аналитического сопровождения исследования биологических

маркеров профессионального здоровья и долголетия работников в сфере железнодорожного транспорта. В системе зарегистрирован 21 пользователь с ролью «Оператор» с доступом к формам ввода, предназначенным для испытуемых; 4 пользователя с ролью «Оператор» для лаборантов с доступом к формам ввода результатов лабораторных исследований и один пользователь с ролью «Модератор», обеспечивающий общее руководство проектом, анализ данных и, при необходимости, развитие Системы.

The screenshot shows a user interface for an electronic survey. At the top, there are two input fields: 'Дата заполнения' (Fill date) set to '07.06.2023' and 'Шифр *' (Code *). Below these are two questions with dropdown menus:

- 'Укажите продолжительность рабочего дня' (Specify working day duration): The value '8' is selected.
- 'Был полноценный обед' (Was there a full meal): A checked checkbox.

Below these are two more questions with dropdown menus:

- 'Были ли перерывы на отдых в течении рабочего дня? *' (Were there breaks during the working day? *): The dropdown menu includes options like 'нет' (no), 'только обед' (only lunch), 'каждый час' (every hour), '3-6 раза за день' (3-6 times a day), and '2-3 раза за день' (2-3 times a day).
- 'Употребляли энергетические напитки в течение рабочего дня' (Did you consume energy drinks during the working day): An unchecked checkbox.

At the bottom right are two buttons: 'СОХРАНИТЬ' (Save) and 'ОТМЕНИТЬ' (Cancel).

Рисунок 3.14 – Электронная анкета испытуемого "Вечерняя самооценка"

Рекомендован следующий порядок работы с Системой после построения форм ввода:

- 1) Деперсонализированная регистрация испытуемых работников. Фиксируется только шифр исследуемого (модератор).
- 2) Внесение предварительных данных медицинского обследования (модератор, лаборант).

3) Заполнение электронной анкеты Утренней\Вечерней самооценки (испытуемый). Доступ к анкете предоставляется удаленно через браузер, интерфейс адаптирован к экрану мобильного телефона.

4) Внесение результатов лабораторных исследований утренней\вечерней пробы слюны испытуемого (лаборант).

5) Просмотр прогнозируемого уровня стресса на основе анкеты и данных лабораторных исследований (испытуемый).

6) Просмотр и анализ всех данных о ходе эксперимента (модератор).

Прогноз уровня стресса на основе внесенных в систему данных рассчитывается на основе предобученной модели.

Механизм реализации прогноза предполагает предоставление доступа к накопленным в Системе данным в режиме обновляемого набора данных (датасета), доступного по ссылке в онлайн средах программирования типа Jupyter для анализа данных и обучения прогнозной модели. Готовая модель сохраняется в виде архива и загружается на платформу Multiforms. Загруженная модель при обращении применяется к вновь поступившим данным и возвращает прогнозное значение в виде диаграммы (рисунок 3.15).

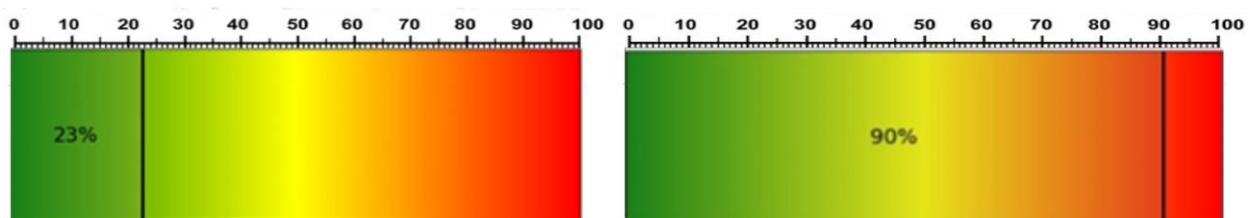


Рисунок 3.15 – Диаграмма, отображающая расчетное прогнозное значение уровня нагрузки. Где: 0% - отсутствие стрессового состояния; 25% - Умеренный уровень стресса. Здоровое напряжение; 50% - Пик профессионального напряжения; 75% - Повышенный уровень стресса (перегрузка, усталость, потеря концентрации), 100% - Высокий уровень стресса (появление сильной тревожности, развития заболеваний, профессиональное выгорание

При создании Системы на базе платформы Multiforms формирование базы данных, содержащей полную информацию об исследуемых, происходит автоматически. Открытый код программы подразумевает возможность включения в базу данных различных образцов слюны, необходимых для дальнейшего анализа, а также корректировать анкетные данные и вносить другие изменения. В результате, такой подход может приблизить к решению проблем анализа сред сложного состава, связанных с их комплексным влиянием на биотесты. Программа создана совместно с Коробко А. В. и Шуваевым А. Н.

3.5 Разработка лабораторного макета ферментной технологии для мониторинга физиологического состояния организма человека

При создании технологии мониторинга физиологического состояния организма произведен подбор условий анализа, в котором в качестве рабочей пробы брали слюну человека. Был подобран состав реакционной смеси, а именно рабочий объём и концентрации всех необходимых реагентов Л+Р, ФМН, НАДН и альдегида С14 для двух типов биолюминометров – кюветного и планшетного таким образом, чтобы интенсивность свечения, чувствительность к образцам слюны и повторяемость результатов была одинаковой для разных приборов.

3.5.1 Варьирование компонентов реакционной смеси для биотестирования

Для проведения подбора необходимого количества комплекса реактива аналитической биолюминесценции (КРАБ) были взяты пробы слюнной жидкости у спортсменов во время тренировочного процесса. Состав реакционной смеси использовали из авторской платформенной технологии биолюминесцентного ферментативного биотестирования профессора В.А. Кратасюк. Для определения рабочего объёма КРАБа, ФМН, НАДН и

альдегида С14 в реакционную смесь добавляли разное количество реагентов и выявляли минимальную разницу между показателем I_k и I_0 . Для поиска наиболее чувствительного объема была использована физическая нагрузка 100 приседаний. Подбор условий осуществлялся на кюветном приборе Люминометр 20/20n (Turner BioSystems, США), без использования инжекторов (рисунок 3.16–3.19).

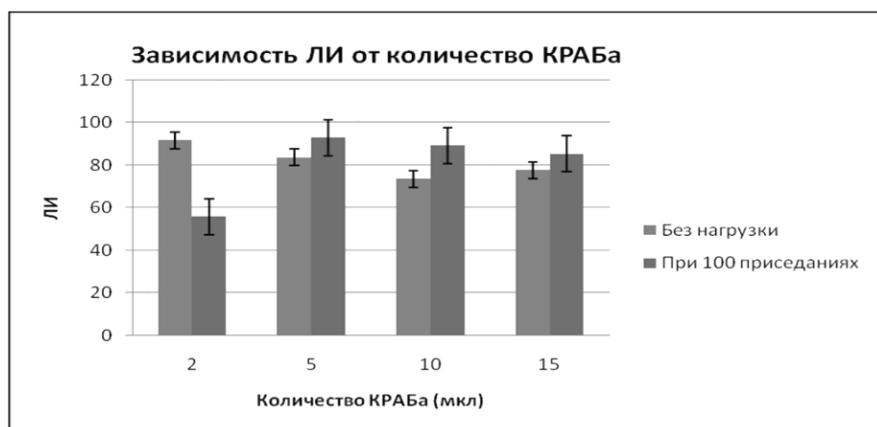


Рисунок 3.16 – Определение количества добавляемого комплекса реагентов аналитической биолюминесценции

По результатам тестирования наибольшая схожая чувствительность с нагрузкой и без, в присутствии анализируемой жидкости, достигается уже на 5мкл анализируемого образца КРАБ (комплекс реагентов аналитической биолюминесценции). Использование большего объема реагентов нецелесообразно, так как не повышает чувствительность метода, но увеличивает стоимость анализа.

Для свечения биолюминесцентной реакции необходима восстановленная форма никотинамидаадениндинуклеотида (НАДН). Рабочую дозу кофактора измеряли при тех же условиях, с анализируемой жидкостью, взятой у спортсменов во время тренировочного процесса.

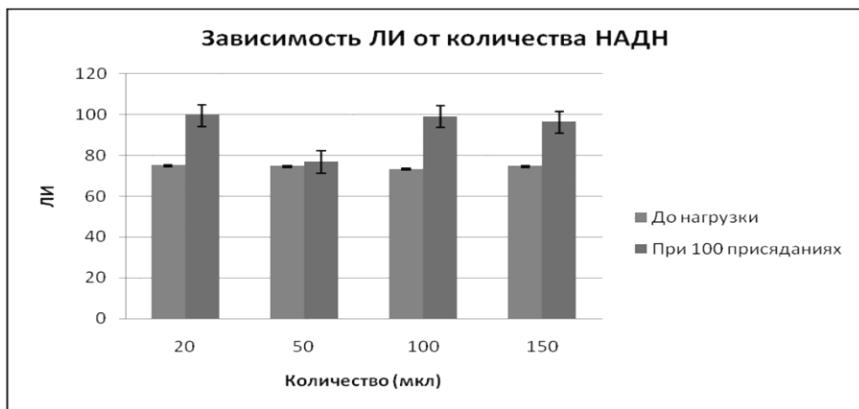


Рисунок 3.17 – Определение количества никотинамида денидинуклеотида для реакционной смеси

В результате одинаковую чувствительность, с нагрузкой и без нее, в присутствии образца, показал объем 50 мкл никотинамида денидинуклеотида (НАДН). Что может быть связано с оптимальной концентрацией кофактора. Данный объем (50 мкл) обеспечивает насыщение ферментативной системы, при котором достигается максимальная скорость биолюминесцентной реакции. Дальнейшее увеличение концентрации НАДН не приводит к усилению сигнала, так как все активные центры ферментов заняты. Несмотря на физическую нагрузку, концентрация НАДН в анализируемом образце слюны оставалась в пределах, не влияющих на общую концентрацию кофактора в реакционной смеси. Это указывает на то, что добавленного количества (50 мкл) было достаточно, чтобы нивелировать возможные колебания НАДН в пробах от спортсменов. Также, высокий уровень тренированности спортсменов мог способствовать эффективному поддержанию концентрации ключевых метаболитов (включая НАДН) даже в условиях физического стресса, что и отразилось в стабильности оптимального объема добавляемого кофактора.

Аналогично был проверен кофермент flavinmononukleotid (ФМН). Однаковую устойчивую чувствительность, с учетом погрешностей, при добавлении в реакционную смесь показал объем 5 и 10 мкл. Нами был выбран

объем 10мкл, для удобства использования в практике, при добавлении раствора в реакционную смесь вручную.

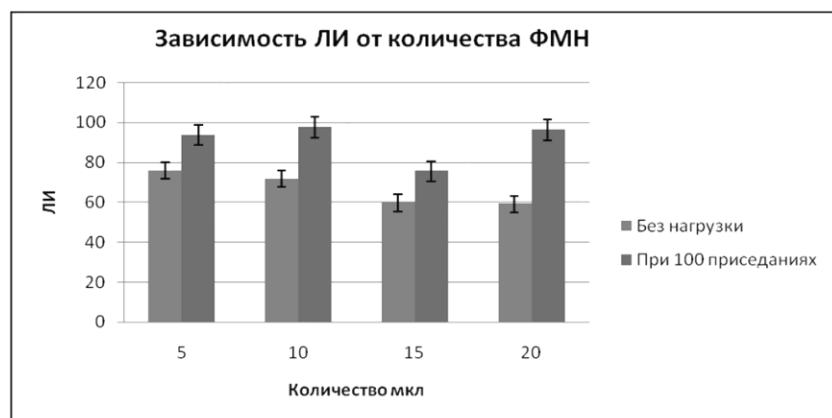


Рисунок 3.18 – Определение рабочего количества, добавляемого флавиномононуклеотида

Рабочий объем алифатического альдегида гексадеканаль С14 определяли аналогичным образом, как и другие компоненты аналитической системы. Наиболее устойчивая максимальная чувствительность для реакционной смеси с нагрузкой и без нагрузки приходилась на объемы 50 и 100мкл, нами был выбран наименьший объем.

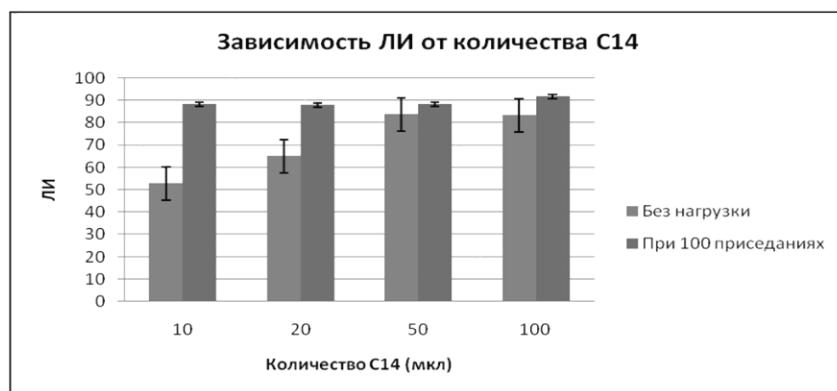


Рисунок 3.19 – Определение количества альдегида С14 для реакционной смеси

В результате эксперимента по подбору реакционной смеси с максимальной чувствительностью на приборе Люминометр 20/20n (Turner

BioSystems, США) был получен следующий состав: 250 мкл 0.25 М фосфатного буфера; 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида; 5мкл смеси ферментов Л+Р; 10 мкл $5,4 \times 10^{-4}$ М раствора ФМН; 50 мкл 4×10^{-4} М раствора НАД(Ф)Н; 50 мкл слюны.

Также были подобраны условия максимальной чувствительности реагентов на планшетном люминометре TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader, чтобы интенсивность свечения, чувствительность к образцам слюны и повторяемость результатов была одинаковой для разных приборов. Работа на данном приборе отличается быстрой получения желаемого результата анализа за счет возможности измерения нескольких проб одновременно. Для проведения эксперимента в каждую лунку планшета добавляли необходимые реагенты, чередуя их количество и учитывая объем лунок (рисунок 3.20–3.23).

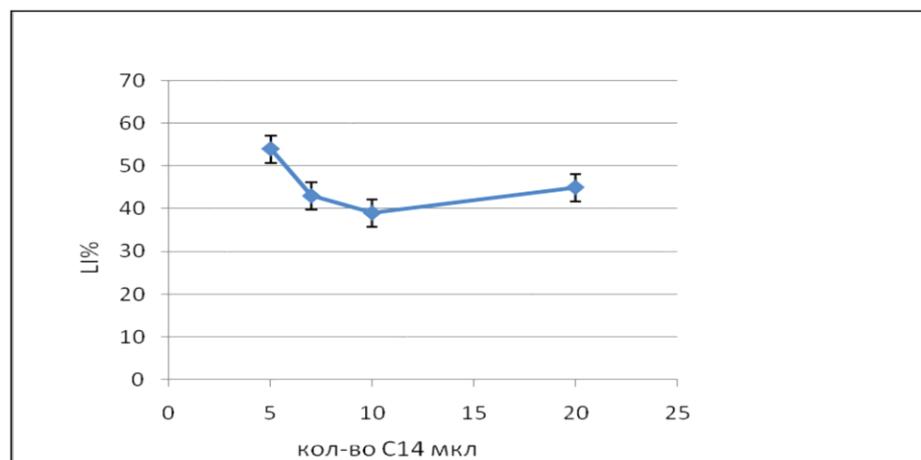


Рисунок 3.20 – Определение количества альдегида С14

На графике представлена зависимость интенсивности биолюминесцентного сигнала от концентрации или объема добавляемого альдегида (С14). Целью исследования было определить оптимальное количество данного реагента, при котором достигается максимальная светимость реакции. Кривая, предположительно, имеет оптимум (пик), указывающий на концентрацию, необходимую для максимальной эффективности свечения. Дальнейшее увеличение количества альдегида,

вероятно, не усиливает сигнал или даже может приводить к его подавлению из-за возможного ингибирующего эффекта.

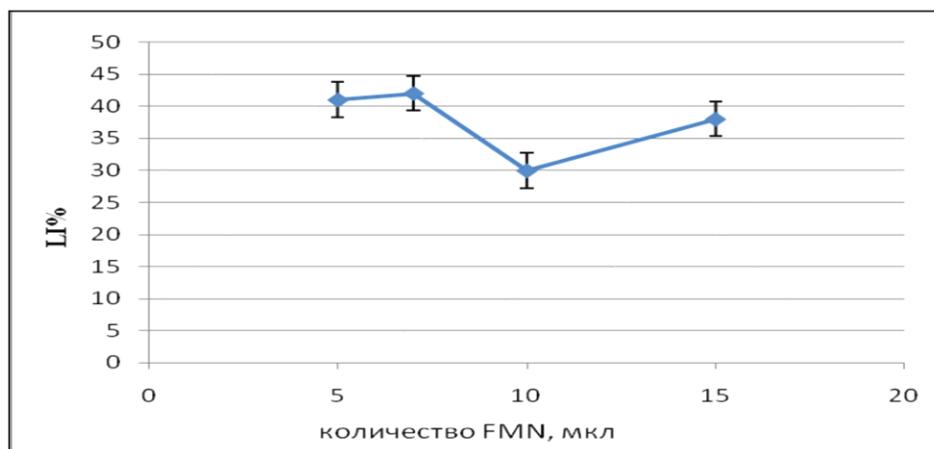


Рисунок 3.21 – Определение рабочей дозы реагента ФМН

Данный график отображает интенсивность люминесценции в зависимости от концентрации флавинмононуклеотида (ФМН). ФМН является ключевым кофактором в бактериальной люциферазной реакции. График демонстрирует, как сигнал растет с увеличением количества ФМН, после чего выходит на плато, что соответствует точке насыщения ферментативной системы, и выбранная "рабочая доза" будет находиться в этой области для обеспечения стабильного и максимального сигнала.

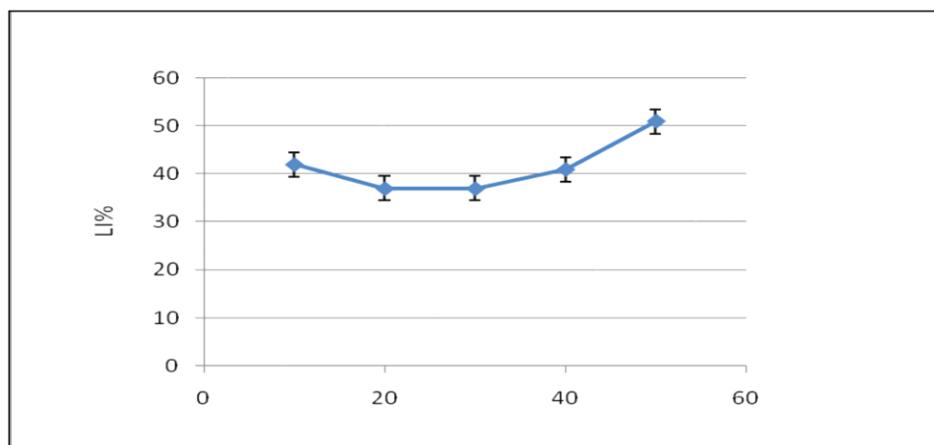


Рисунок 3.22 – Определение рабочей дозы реагента НАДН

На рисунке показана зависимость свечения от объема или концентрации восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН). НАДН служит источником восстановительных эквивалентов для фермента НАДН:ФМН-оксидоредуктазы, который восстанавливает ФМН до ФМН(Н₂), необходимого для реакции люциферазы. Кривая имеет резкий рост при низких концентрациях, который затем выходит на плато. Рабочая доза была выбрана в зоне плато, где сигнал стабилен и не зависит от незначительных колебаний в добавлении реагента. Для всех трех реагентов была обнаружена характерная зависимость: с ростом концентрации наблюдалось увеличение интенсивности биолюминесцентного сигнала до достижения определенного оптимума, после которого дальнейшее добавление реагента не усиливало сигнал, либо приводило к его незначительному снижению. Найденные оптимальные концентрации реагентов позволяют проводить анализ с максимальной чувствительностью и эффективностью, обеспечивая насыщение ферментативной системы всеми необходимыми компонентами. Это гарантирует стабильность и воспроизводимость результатов при одновременном измерении множества образцов, что является ключевым преимуществом использования планшетного люминометра для экспресс-анализа.

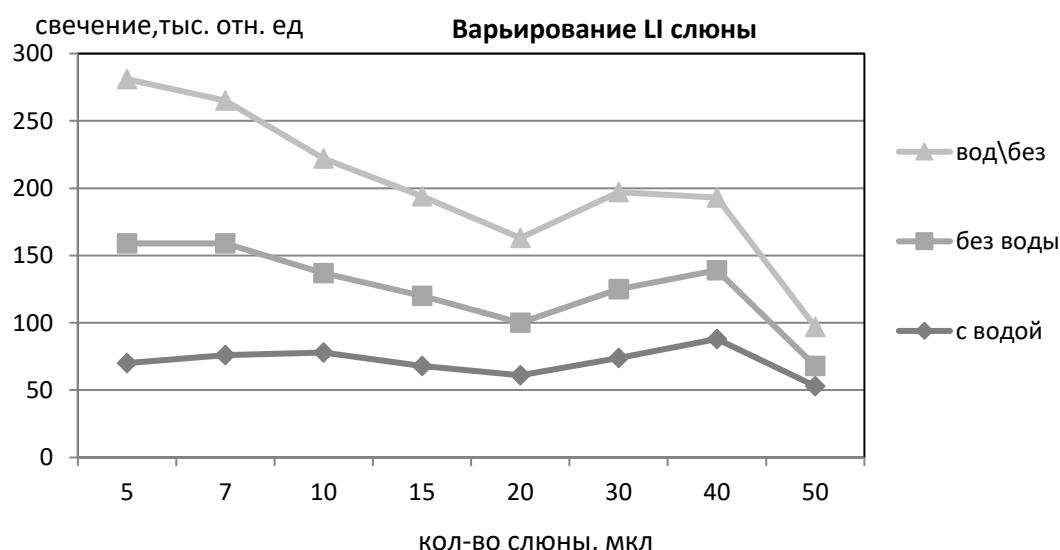


Рисунок 3.23 – Определения количества добавляемой пробы слюны в реакционную смесь

На рисунке 3.23 представлены результаты зависимости люциферазного индекса от контроля с добавлением воды, от контроля без добавления воды и отношение контроля с водой к контролю без воды. Максимальная чувствительность анализа достигается при добавлении 20 мкл образца, что соответствует концентрация слюны- 5.1 % от общего объема реакционной смеси. Этот объем обеспечивает идеальный баланс: он вносит достаточное количество анализируемых веществ из слюны для детекции, но не вызывает чрезмерного ингибиования или разбавления реакционной смеси, которые могли бы подавить свечение. Использование двух видов контроля (с водой и без) позволяет точно учитывать эффект разбавления реакционной смеси самим образцом. Это критически важно для корректной интерпретации данных, так как добавление любого жидкого образца снижает концентрацию реагентов в кювете. Показано, что биолюминесцентный анализ можно адаптировать для работы со сложными биологическими жидкостями, такими как слюна, подбрав условия, при которых влияние матрикса образца на ход реакции минимизировано.

При подборе чувствительности на планшетном люминометре, был получен следующий состав реакционной смеси: 80 мкл 0.25 М фосфатного буфера, pH 7.0; 5мкл смеси ферментов Л+Р; 10 мкл 0.0032%-ного водного раствора альдегида; 30 мкл 7×10^{-5} М раствора НАДН; 10 мкл 1.6×10^{-4} М раствора ФМН; 20 мкл слюны.

При сравнении полученной рабочей дозы реакционной смеси на различных приборах было показано, что оптимальный состав реагентов существенно зависит от технических характеристик и конструкции детектора.

Для люминометра Luminometer 20/20n требуется больший общий объем реакционной смеси (415 мкл), что обусловлено конструкцией кюветного отсека прибора. При этом используются более высокие концентрации ключевых реагентов (альдегида, ФМН, НАД(Ф)Н), что обеспечивает стабильный и интенсивный сигнал в условиях единичных измерений.

В то же время для планшетного люминометра был оптимизирован

значительно меньший общий объем смеси (155 мкл), адаптированный под формат 96-луночного планшета. Концентрации реагентов (альдегида, ФМН, НАДН) были снижены, что позволило минимизировать расход реагентов при сохранении высокой чувствительности метода в условиях многоканального анализа.

Различия в составах реакционных смесей подчеркивают важность индивидуальной оптимизации протокола под конкретный тип детектирующего оборудования для достижения максимальной аналитической эффективности и экономической целесообразности.

3.5.2 Оценка влияния pH оптимума и оптических свойств слюны для работы с биолюминесцентной системой

Важным показателем при конструировании системы диагностики организма по слюнной жидкости является уровень кислотно-щелочного баланса организма pH или активная кислотность среды (концентрация водородных ионов). Кислотность слюны зависит от скорости слюноотделения. Обычно кислотность смешанной слюны человека равна 6,8–7,4 pH, но при большой скорости слюноотделения достигает 7,8 pH. Кислотность слюны околоушных желёз равна 5,81 pH, подчелюстных – 6,39 pH. У детей в среднем кислотность смешанной слюны равна 7,32 pH, у взрослых — 6,40 pH (Денисов, 2003).

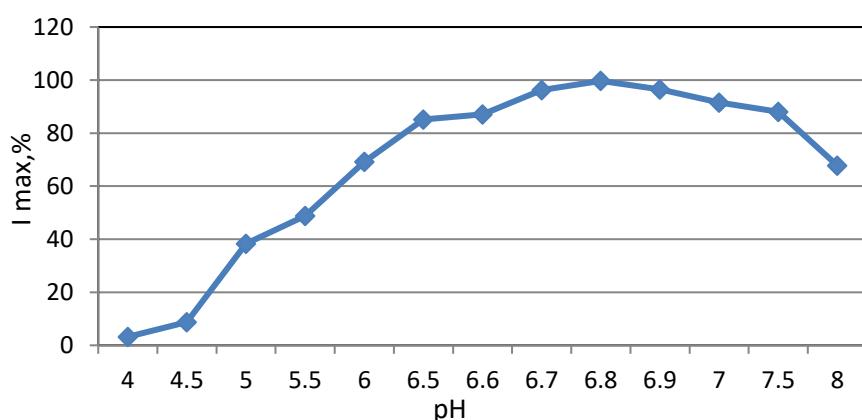


Рисунок 3.24 – Зависимость pH от остаточного свечения ферментативной биолюминесцентной системы

Считается, что pH человеческой слюны в нормальном физиологическом состоянии составляет 6,64. Небольшое изменение измеренного значения pH в диапазоне 7,2–7,3 после физической нагрузки может быть объяснено низкой скоростью переноса CO₂ из циркулирующей крови в слюну (Chicharro et.al., 1998). Кроме того, известно, что изменение pH реакционной смеси в диапазоне 6,8–7,5 не влияет на каталитическую активность ферментной системы Л+Р (Bezrukikh et.al., 2014). Таким образом, незначительные изменения интенсивности свечения биолюминесцентной системы после нагрузки не были связаны с изменением pH реакционной среды. Была показана зависимость уровня pH (концентрация водородных ионов) на кинетические характеристики ферментативной системы НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза (рисунок 3.24).

Из полученных данных видно, что pH оптимум биолюминесцентной системы наблюдается при значении 6,8. При этом значении pH наблюдается максимальная интенсивность биолюминесцентного свечения, что свидетельствует о наивысшей активности ферментов и эффективном сопряжении их работы. Проведенная оптимизация pH позволяет обеспечить максимальную чувствительность и надежность биолюминесцентного метода при тестировании образцов слюны, минимизируя погрешности, связанные с естественными вариациями кислотности биоматериала. Данный фактор необходимо учитывать при тестировании слюны биолюминесцентным методом.

Другим важным показателем является оценка влияния оптических свойств смешанной слюны. При биотестировании с использованием ферментов существенное значение имеет учет оптических характеристик (поглощение и рассеяние света) анализируемых проб, включая образцы слюнной жидкости. В то время как для моноферментных систем достаточно контроля оптической плотности, в случае биолюминесцентных реакций необходима дополнительная проверка на отсутствие спектральных помех в

диапазоне 400–600 нм, где может происходить наложение спектров поглощения и свечения (Kratasyuk et.al., 2020).

Был измерен спектр поглощения слюнной жидкости в диапазоне 400–600 нм, шаг 1 нм, длина оптического пути 1 см, при комнатной температуре. Спектры сканировали с помощью спектрофотометра Cary 5000i (Agilent Technologies). Слюнная жидкость предварительно была центрифужирована и пробоотбор произведен согласно методике.

Было получено, что в изучаемой спектральной области оптическая плотность слюнной жидкости не превышает 0.05, что говорит об отсутствии эффекта фильтра. С учетом того, что по методике биотестирования происходит разбавление образцов слюны в реакционной смеси в 9 раз, можно утверждать, что эффект фильтра не вносит существенных искажений при анализе слюнной жидкости, при условии соблюдения правил сбора материала и предварительной пробоподготовки. Поэтому был сделан вывод об отсутствии необходимости расчета коэффициентов коррекции при каждом измерении биолюминесцентного сигнала.

3.5.3 Пробоподготовка

Для правильной работы системы важна подготовка компонентов реакционной смеси, в особенности объекта исследования - слюнной жидкости (смешанная слюна). Сбор биоматериала (смешанная слюна) необходимо производить натощак или через час после приема еды, для чистоты эксперимента. Отбор проб слюны осуществляется самостоятельно участниками эксперимента, путем свободного сплевывания в пластиковую стерильную микроцентрифужную пробирку посредством пассивного слюноотделения без дополнительной стимуляции, на рабочем месте, до и после рабочей смены. Требуемый минимальный объем пробы 1,0–1,5 мл. В большинстве работ по исследованию состава слюны используют различные варианты пробоподготовки. При определении микроэлементного состава

образцы слюны обычно центрифугируют для удаления клеточного дебриса, муцина и других крупных молекул и частиц (Савинов и др. 2016).

Было показано, что после центрифугирования остаточное свечение проб незначительно повышается практически во всех исследуемых нами пробах, но этап центрифугирования включен нами в процесс пробоподготовки, так как он упрощает процесс анализа, уменьшая вязкость слюны и сокращая вероятность ошибки (рисунок 3.25).

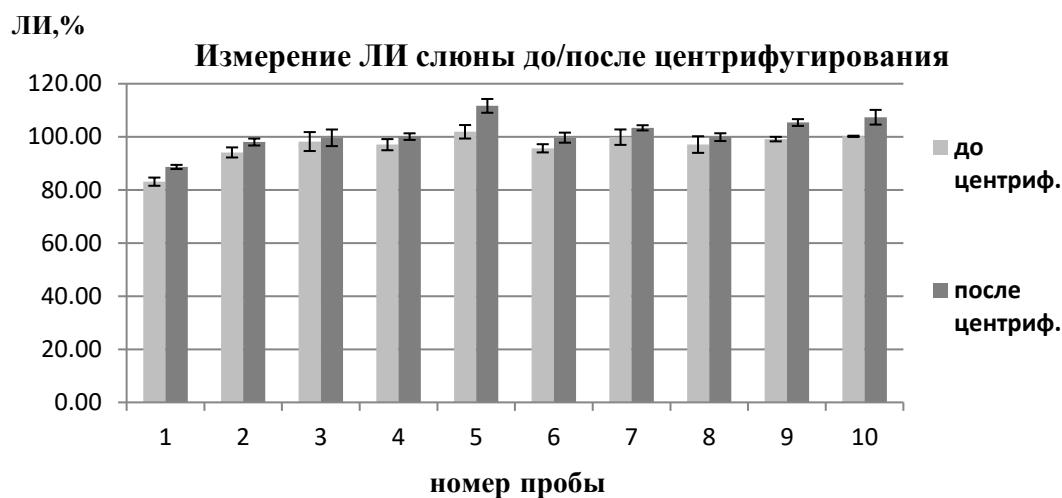


Рисунок 3.25 – Влияние центрифугирования на результаты тестирования анализируемых проб слюнной жидкости

Собранные образцы центрифугируются 10 минут при 5000 оборотах, дальнейшая работа проводится уже с надосадочной жидкостью нативной слюны.

3.5.4 Условия хранения проб слюны

Вопрос хранения полученных образцов является неотъемлемой частью конструирования тест системы (Савинов и др. 2016). Образцы смешанной слюны собираются порой в очень экстремальных условиях и возможности сделать анализ непосредственно на месте нет возможности, поэтому был проделан эксперимент по хранению проб для биолюминесцентного анализа.

В случаях, когда анализ невозможно провести сразу после взятия биологического материала, очень важной задачей является сохранение его качественного и количественного состава. Хранение необходимо также при накоплении образцов для повышения производительности анализа и, благодаря этому, – для снижения стоимости одного измерения. Одним из самых доступных способов консервирования является охлаждение или замораживание образцов.

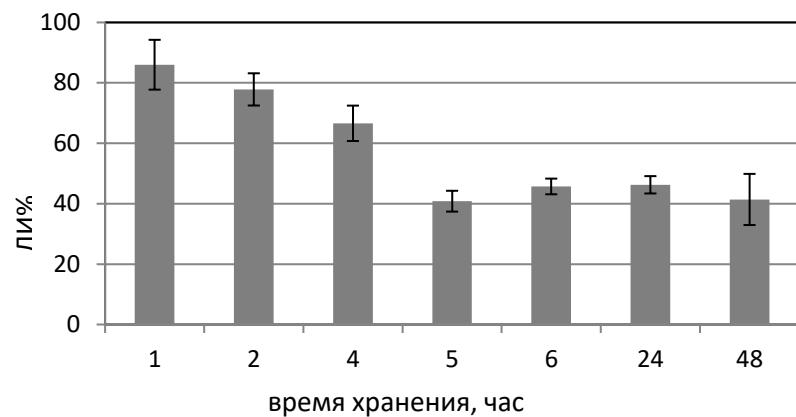


Рисунок 3.26 – Зависимость ЛИ% от времени хранения при температуре +24-26°C

При хранении образцов слюны при комнатной температуре +24-26°C наблюдается быстрое снижение люциферазного индекса (ЛИ%) уже в первые часы хранения (рисунок 3.26). Это свидетельствует о значительной деградации ферментов и кофакторов из-за активации микробных процессов, окислительных реакций и термоденатурации белков. Стабильность образцов повышается при понижении температуры хранения до +6-+8°C (рисунок 3.27).

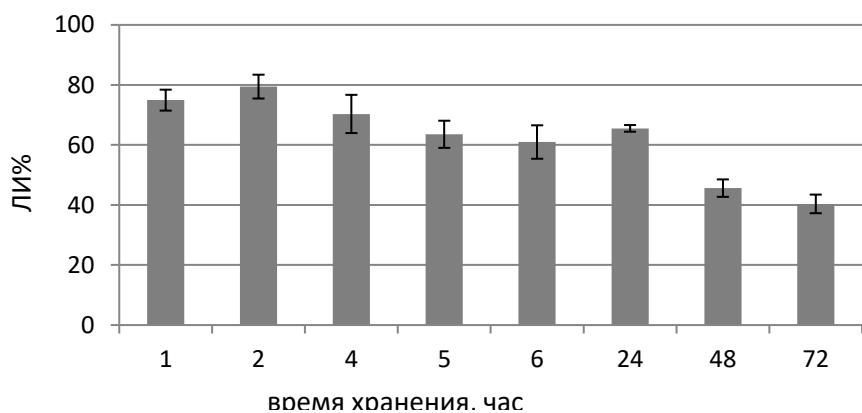


Рисунок 3.27 – Зависимость ЛИ% от времени хранения
при температуре +6-+8°C

Снижение ЛИ% происходит медленнее, но всё же заметно в течение нескольких дней. Это связано с замедлением, но не полным подавлением биохимических и микробиологических процессов.

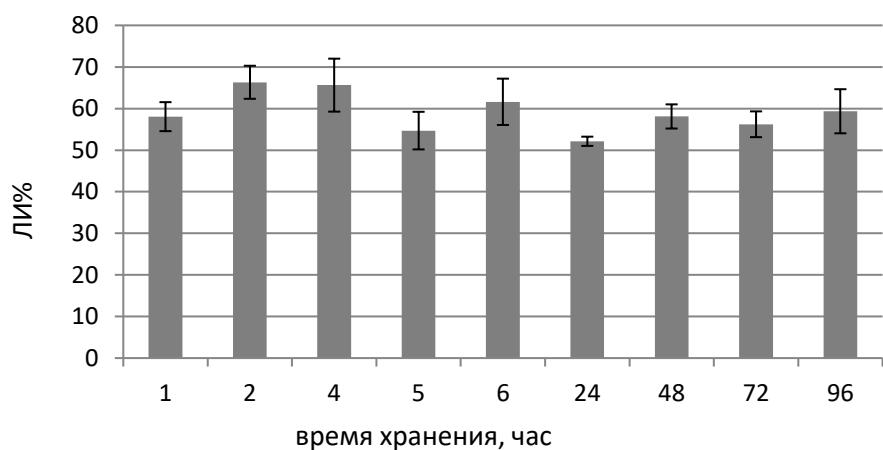


Рисунок 3.28 – Зависимость ЛИ% от времени хранения
при температуре -18°C

При хранении слюны в морозильной камере при температуре -18°C наблюдается минимальное изменение ЛИ% даже в течение длительного периода (рисунок 3.28). Низкая температура практически полностью останавливает биохимические реакции и рост микроорганизмов, сохраняя целостность ферментов и метаболитов. Остаточное свечение биолюминесцентной системы в условиях хранения при температуре 24-26°C

падает до 50% после 4 часов, при 6-8°C после 24 часов, при (-18)-(-20)°C остается стабильно. Замораживание является оптимальным методом для долговременного хранения образцов без значительной потери активности.

Транспортировку проб слюны необходимо осуществлять в специальном контейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре 2-8°C. Хранение отобранный для анализа жидкости должно осуществляться в холодильной камере при температуре 6-8°C, не более 24 часов, при -18°C – до 1 года. Допускается только однократное замораживание материала.

3.5.5 Регламент проведения технологии мониторинга физиологического состояния организма человека

На основе проведенных экспериментов, в сигнальную систему мониторинга физиологического состояния организма человека на основе биолюминесцентного метода для создания персонализированного датчика (биосенсора) мониторинга перегрузок и стрессовых состояний входят: набор репрезентативных ферментных систем, обеспечивающих оптимальный уровень чувствительности, программа сбора и обработки экспериментальных данных. Методика проведения мониторинга организма человека происходит в следующей последовательности:

1. Сбор персональной информации об исследуемом посредством заполнения электронной анкеты в информационной платформе Multiforms.
2. Сбор слюнной жидкости осуществляется путем свободного сплевывания в пластиковую стерильную микроцентрифужную пробирку посредством пассивного слюноотделения без дополнительной стимуляции до еды или спустя 2 часа после еды. Хранение анализируемой жидкости осуществляется в холодильной камере при температуре 6-8°C, не более 24 часов.

3. Центрифугирование образцов слюны в течение 15 минут при частоте 5000 об/мин для осаждения осадка и зубного налета. Для анализа используется надосадочная жидкость.

4. Анализ биологической жидкости биолюминесцентным ферментативным методом. В кювету последовательно вносится реакционная смесь с добавлением буфера (контрольное измерение) или нативной слюны (экспериментальное измерение) и регистрируется величина максимальной интенсивности свечения биолюминесцентной реакции. Показателем влияния слюнной жидкости на активность биферментной Р + Л системы является остаточная интенсивность свечения, которую рассчитывали, как отношение максимальной интенсивности свечения в присутствии слюны к контрольному (в %). Каждая экспериментальная точка – результат не менее трёх последовательных измерений.

5. Обработка результатов анализа. Выявление ферментным методом отклонения от состояния «нормы» организма и прогноз уровня стресса методом машинного алгоритма Случайного леса.

6. Выдача результатов анализа. Осуществляется в личном кабинете испытуемого в информационной платформе Copyright © 2024 Multiforms v.1.4.1.

7. Выдача рекомендаций. В случае выявления отклонения от индивидуальной нормы организма человека предоставляется список факторов, оказывающих наибольшее влияние на текущее состояние организма. Исследование полученных причин рекомендуется диагностировать с помощью общепринятых методов медицинского анализа.

В результате проведения испытаний персонифицированной системы мониторинга на основе Р+Л системы при исследовании группы диспетчеров Красноярской железной дороги-филиала ОАО «РЖД», было показано, что метод может быть использован для выявления утомления работников во время трудовой нагрузки в посменной работе для контроля перегрузок, которые впоследствии могут существенно ухудшить трудоспособность работника.

По результатам анализа слюнной жидкости до начала рабочей смены определяли диапазон нормального состояния работника, с учетом индивидуальных особенностей (физических, образа жизни, здоровья). Норма для каждого работника определялась строго индивидуально по величине максимально близких между собой значений. Показатели утренней пробы условно считали показателями состояния обследуемых без стрессовых нагрузок (контроль). После трудового дня определяли показатели слюны биолюминесцентным методом. Утренние (контроль) и вечерние результаты анализа сравнивали и определяли разницу между показателями до и после рабочего дня (изменение остаточного свечения).

Изменение компонентного состава слюны обусловлено накоплением продуктов перекисного окисления липидов при повышенной антиоксидантной активности, повышенным содержанием органических веществ, при воспалительных процессах в организме, изменении ионного и минерального состава при хронических заболеваниях и наличии вредных привычек. Определение контрольного диапазона для биолюминесцентного показателя при воздействии слюны дает возможность выявить факторы, вызывающие стресс и хроническое утомление для каждого сотрудника, и создать условия, снижающие стрессовую нагрузку (временные интервалы для отдыха во время смены, диспансерное наблюдение и т. п.). Неинвазивный интегральный биолюминесцентный анализ слюны может быть использован для выявления группы риска работников, у которых обнаружено изменение биолюминесцентного показателя во время трудовой смены. Это является сигналом неблагополучного состояния организма (воспалительные заболевания, нарушение режима дня и питания, стрессовые эмоциональные или физические перегрузки во внеборчее время и т. п.). Применение биолюминесцентного тестирования для контроля над функциональным состоянием организма работников ОАО «РЖД» будет способствовать повышению качества и эффективности работы на железнодорожном транспорте, обеспечивать безопасность движения поездов, снижение

производственного травматизма и профессиональной заболеваемости, позволит рационально использовать трудовые ресурсы. Показано, что необходимо уделять больше внимания предварительному исследованию и подготовке образцов слюнной жидкости к анализу при биотестировании.

Предложенный системный подход, разработанный на примере РЖД, может быть использован для контроля трудоспособности и профессионального долголетия в других организациях, где работники подвержены повышенным стрессовым нагрузкам.

3.6 Возможность применения созданной системы мониторинга организма для диагностики онкологических заболеваний

При исследовании нами было выявлена возможность применения созданного подхода биотестирования для других направлений. Современная онкология требует ранней и точной диагностики злокачественных образований для своевременного вмешательства и улучшения качества прогноза заболевания пациентов. Традиционные методы диагностики, основанные на клинико-морфологических данных, уже показали свою эффективность, однако часто они требуют инвазивных процедур и обладают ограниченной чувствительностью на ранних стадиях заболевания. В этом контексте использование биолюминесцентного метода исследования слюны может представлять собой инновационный, неинвазивный метод, способный выявлять биохимические изменения, предшествующие морфологическим изменениям в тканях.

Показано влияние заболеваний на показатели Р+Л системы на примере группы пациентов с диагнозом «рак молочной железы» с сопутствующими заболеваниями женского пола и потенциально здоровых людей в возрасте 30-50 лет (рисунок 3.29).

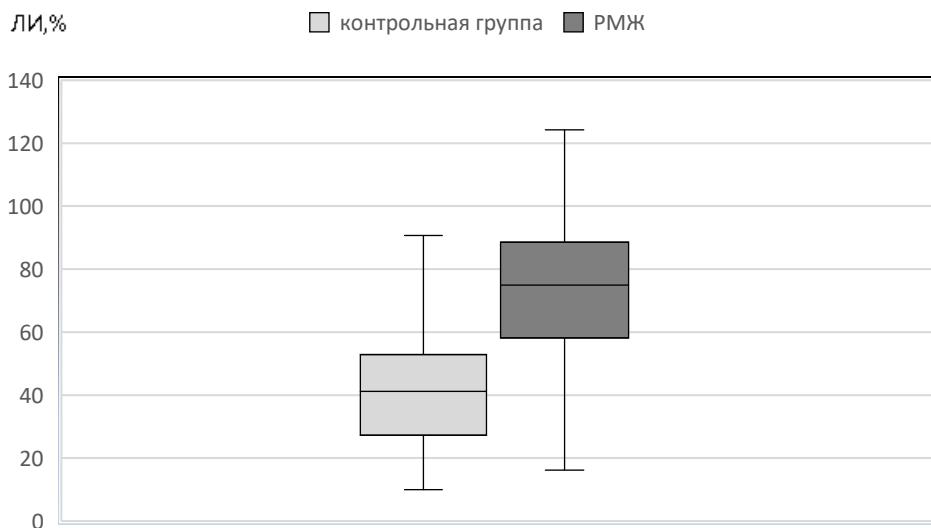


Рисунок 3.29 – Влияние заболевания на кинетические характеристики Л+Р системы в присутствии слюны. Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$)

Примечание: высота столба – медиана (Me) (серединное значение выборки), края усов – межквартильный диапазон между 25-м процентилем (C25) и 75-м процентилем (C75), усы, отходящие вниз и вверх, обозначают минимальное и максимальное значения выборки по критерию Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$).

Повышение уровня остаточного свечения биолюминесцентной системы у пациентов с онкологическими заболеваниями по сравнению с группой условно здоровых людей может быть объяснено изменением биохимического состава слюны, в частности, накоплением перекиси водорода (H_2O_2).

Известно, что в норме слюнная жидкость обладает антиоксидантной активностью, в том числе за счет лактопероксидазной системы, которая катализирует окисление тиоцианата с потреблением H_2O_2 . Однако при онкологических заболеваниях может наблюдаться недостаточность активности лактопероксидазы, что приводит к накоплению перекиси водорода в слюне (Hastings et al., 1978; Воеводина, 1990; Kohler and Jenzer, 1989; Pollock et al., 1992).

Накопленная перекись водорода способна напрямую взаимодействовать с компонентами биолюминесцентной системы. В частности, H_2O_2 может окислять флавинмононуклеотид (ФМН), участвующий в реакции биолюминесценции, что приводит к дополнительной генерации фотонов и увеличению фонового свечения. Это явление особенно проявляется в условиях остаточной люминесценции, когда основная реакция завершена, но система сохраняет чувствительность к внешним окислителям.

Таким образом, наблюдаемое увеличение остаточного свечения может служить косвенным маркером нарушения окислительно-восстановительного баланса в ротовой полости, связанного с онкологическим процессом, и отражать накопление прооксидантных соединений, таких как H_2O_2 , в биологических жидкостях организма.

С помощью классификационного алгоритма случайного леса было проведено распределение пациентов по трем классам (класс 0 – здоров или добро качественное образование, класс 1 – стадия I или II, класс 2 – стадии III или IV). Для решения классификационной задачи рассмотрели несколько наборов признаков: уровень остаточного свечения (ЛИ %) и данные анамнеза, концентрации 14 аминокислот в слюне и уровень остаточного свечения (ЛИ %).

При использовании данных анамнеза и уровня остаточного свечения (ЛИ %) средняя точность работы алгоритма составили 79 % (рисунок 3.30 Б). Было оценено влияние факторов на результат классификации: наибольший вклад вносит уровень остаточного свечения, значимость остальных факторов находится на одном уровне (рисунок 3.30 А).

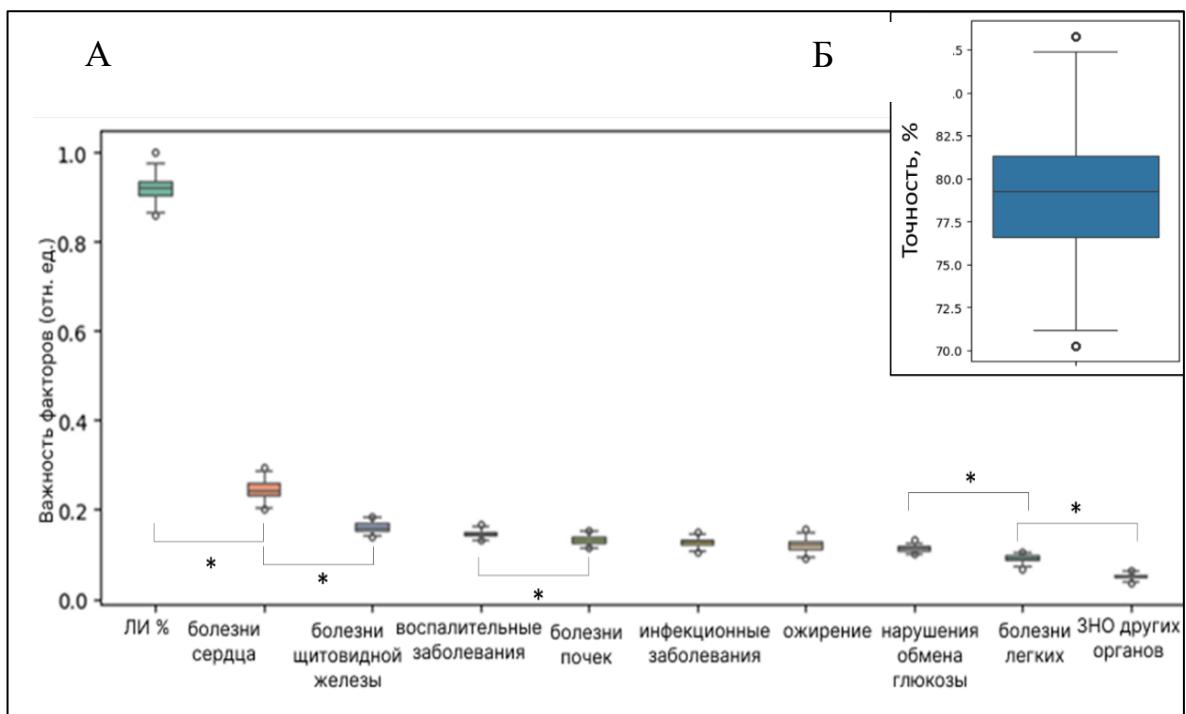


Рисунок 3.30 – Определение класса с использованием данных анамнеза и уровня остаточного свечения (А – распределение факторов по уровню влияния на целевую переменную, Б – точность работы алгоритма, * статистическая значимость различий между признаками ($p < 0.05$))

Подобное распределение факторов по уровню влияния указывает на то, что одних данных анамнеза недостаточно для верного распределения пациентов между классами. Для того чтобы точность работы алгоритма была высокой необходимо использовать и уровень остаточного свечения, и данные анамнеза.

Объединение этих подходов с современными нейросетевыми технологиями позволило создать интегрированную систему поддержки принятия решений, которая повысила точность диагностики, обеспечила интерпретируемость результатов и облегчит работу врачей. Полученные результаты будут полезны как для научного сообщества, так и для практического здравоохранения. Они расширят представления о возможностях неинвазивных методах диагностики, предложат новую методологию интерпретируемого искусственного интеллекта в медицине и

создадут инструмент, способный повысить эффективность раннего выявления онкологических заболеваний. Для пациентов данная разработка может дать возможность более раннего диагностирования без необходимости в инвазивных процедурах, сокращение времени постановки диагноза и ускорение начала лечения. В перспективе созданная системы мониторинга может использоваться и для диагностики заболеваний рака ротовой полости, а также других стоматологических заболеваний. Клинические результаты исследования включают повышение точности диагностики, снижение процента ложноположительных и ложноотрицательных случаев, а также сокращение числа ненужных биопсий и инвазивных диагностических процедур. Разработанные методики могут быть оформлены в виде рекомендаций по внедрению в клиническую практику, а их эффективность будет подтверждена в рамках пилотного исследования. В долгосрочной перспективе ожидается создание условий для дальнейших клинических испытаний, расширения исследований на другие виды онкологических заболеваний и адаптации метода для анализа других биологических жидкостей, таких как кровь или моча.

В целом, разработанные подходы позволяют объединить биофизические методы анализа, передовые технологии искусственного интеллекта и медицинскую практику, создавая новый стандарт диагностики, открывая перспективы для внедрения неинвазивных методов и развития персонализированной медицины.

Выходы к главе

Выявлены изменения информативного сигнала в форме остаточного свечения Р+Л системы при различных функциональных состояниях организма человека при влиянии физической, умственной и трудовой нагрузки. Подобраны условия проведения мониторинга перегрузок и стрессовых состояний. Определены зависимости количественного и качественного состава метаболитов слюны (минерального состава (фосфаты, фториды,

нитраты, нитриты, сульфаты), компонентного состава (K, Na, Mg, Cu, Mn, Zn, Fe, Ca), продуктов перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые коньюгаты, основания Шиффа), органического состава (лактат, глюкоза, каталаза, мочевина, общий белок), водородного показателя pH) на остаточное свечение биолюминесцентной системы, а так же других факторов влияющих на анализ. Разработан регламент мониторинга перегрузок и стрессовых состояний путем модификации платформенной технологии с учетом особенностей анализа слюнной жидкости. Предложено решение проблемы сбора информации индивидуальных показателей и анализа полученных данных исследований. Показана возможность применения созданной системы мониторинга для диагностики онкологических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследований биологического материала (слюной жидкости) участников была показана возможность экспрессной оценки перегрузок работников РЖД биолюминесцентным методом, оценка стрессоустойчивости организма, оценка профпригодности. Метод персонализированный, неинвазивный (осуществляется с использованием слюны), возможна автоматизация анализа и его выполнение в режиме лаборатории или при создании индивидуального датчика. Контроль за состоянием организма работников РЖД может быть осуществлен, если принимать за норму утренние показатели биолюминесцентного ответа, тогда величина отклонения от вечерних результатов будет свидетельствовать о степени или величине перегрузок после рабочей смены. С помощью такого персонализированного мониторинга, возможно, выявить факторы, вызывающие стресс и утомление у каждого сотрудника, и создать условия, снижающие стрессовую нагрузку (временные интервалы для отдыха во время смены, обеспечение завтраком, освещенность рабочего места, температура и кондиционирование, психологическая совместимость и т. п.). Тест-система выявляет на превентивном уровне отклонения реакции организма работника от заданных значений, что является основанием для дальнейшего полного обследования профпригодности работника для данного рабочего места. Предложенный системный подход, разработанный на примере РЖД, может быть использован для контроля трудоспособности и профессионального долголетия в других организациях, где работники подвержены стрессовым перегрузкам.

Несмотря на высокую чувствительность и скорость, биолюминесцентный анализ обладает рядом существенных **ограничений**, которые необходимо учитывать при планировании экспериментов и интерпретации результатов. Эти замечания указывают на перспективу проведенных исследований в плане увеличения точности и чувствительности разработанной технологии и расширения области ее применения.

Анализ проводился исключительно на основе данных, приведенных в диссертационной работе, что исключает возможность сопоставления с данными иных традиционных медицинских обследований.

В настоящем исследовании участвовал коллектив с гендерным разнообразием, что ограничивает возможность распространения полученных результатов на предприятия с преобладанием одного пола. Данное ограничение связано с присутствием влияния пола, как фактора, на результат биолюминесцентного анализа.

Результаты обработки данных, полученные на ограниченной выборке (до 310 строк), не являются универсальными и могут изменяться при анализе других массивов данных. Требуется предобучение модели.

Ферменты биолюминесцентных систем работают в узком диапазоне рН (6,6–7) и его колебания могут значительно искажать сигнал.

Для отсутствия эффекта фильтра, необходимо учитывать оптическую плотность анализируемого раствора, которая не должна оказывать влияния на спектр поглощения бактериальной биолюминесценции в диапазоне 420–630 нм длины волны. В случаях, когда внесение анализируемого раствора в реакционные смеси ферментативных тест-систем приводит к взаимодействию компонентов с последующим образованием взвеси, мутности или окрашиванию раствора, необходимо проводить корректировку методики пробоподготовки, например, путем разведения, для нивелирования вклада нежелательных оптических эффектов.

Биолюминесцентный анализ — это мощный инструмент для экспресс-мониторинга и скрининга, однако его данные должны интерпретироваться с учетом вышеуказанных ограничений. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходима тщательная валидация метода для каждой конкретной задачи и типа биологического образца.

Предложенная методика может быть также применена для контроля за состоянием работников других профессий, например, в ходе медосмотра, перед заступлением на смену сотрудников, для определения оптимальных

периодов «работа-отдых» и других условий работы, в том числе для профилактики стрессовых состояний. Применение биолюминесцентного тестирования с целью динамического контроля функционального состояния работников будет способствовать повышению качества и эффективности работы, обеспечивать безопасность, снижение производственного травматизма и профессиональной заболеваемости, позволит рационально использовать трудовые ресурсы.

В перспективе развития данной работы для целей превентивной оценки профпригодности работников на рабочих местах, связанных с возможными стрессовыми нагрузками, возможна автоматизация анализа, которая может быть сделана в рамках портативной биолюминесцентной лаборатории или путем создания индивидуального биосенсора. Создание иммобилизованного реагента, содержащего реакционную смесь, позволит сделать метод еще более экспрессным за счет отсутствия дополнительных пробирок и пробоподготовки. Простота процедуры анализа заключается в применении в качестве биорецептора (биомодуля) одноразовые измерительные кюветы с иммобилизованной биолюминесцентной системой, такая форма не требует подготовки реагента. Биолюминесцентная лаборатория будет включать в себя созданную методику, программу сбора и обработки данных, а также портативный прибор.

Выражаю огромную благодарность соавторам работ: Степановой Л. В., Кратасюк В. А., Коробко А. В., Шуваеву А. Н., Сутормину О. С., кафедре биофизики, а также сотрудникам Красноярской железной дороги-филиала ОАО «РЖД» - за помощь в проведении экспериментальной части и предоставленные данные.

Работа с сотрудниками Красноярской железной дороги проведена в рамках соглашения о сотрудничестве по долгосрочной программе развития Российских железных дорог и нацпроектах, между ОАО «РЖД» и «СФУ».

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика оценки концентрации молочной кислоты в слюне при нагрузках с использованием сопряженной трехферментной системы: лактатадегидрогеназа+НАДН:ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза. Несмотря на то, что метод демонстрирует достаточную чувствительность, точность и скорость анализа для оценки изменений физиологического состояния организма человека при перегрузках, его высокая сложность и стоимость анализа по сравнению с известными методами оценки содержания лактата, делают этот метод неподходящим для массового рутинного скрининга.

2. Показано, что слюнная жидкость влияет на интенсивность свечения биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза и степень влияния зависит от интенсивности трудовой, физической и умственной нагрузки. Информативный сигнал в форме относительного свечения биолюминесцентной системы зависит от количественных изменений показателей смешанной слюны: минерального состава (фосфаты, фториды, нитраты, нитриты, сульфаты), элементного состава (Na, Cu, Zn, Fe), продуктов перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые коньюгаты, основания Шиффа), органического состава (лактат, глюкоза, каталаза, мочевина, общий белок) и pH. На результаты анализа влияют заболевания, режим дня, курение, пол.

3. На основе платформы Multiforms разработана программа сбора и анализа персонифицированных данных, характеризующих спокойное и напряженное состояние человека.

4. На примере диспетчеров РЖД разработан лабораторный макет персонифицированного неинвазивного биолюминесцентного ферментативного метода мониторинга интенсивности трудовой нагрузки по слюнной жидкости, способный выявлять группу риска и интегрально оценивать общее состояние организма.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

НАД ⁺	– никотинамидаденинуклеотид окисленный
НАДН	– никотинамидаденинуклеотид восстановленный
ФМН	– флавинмононуклеотид
ФМНН ₂	– флавинмононуклеотид восстановленный
RCHO	– тетрадеканаль
RCHOОН	– тетрадекакарбоновая кислота
АДГ	– алкогольдегидрогеназа
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
C14	– миристиновый альдегид, тетрадеканаль
Р	– НАДН:ФМН-оксидоредуктаза
Л	– люцифераза
Р+Л	– биферментная система НАДН:ФМН-оксидоредуктаза+ люцифераза
ЛИ	– люциферазный индекс
<i>I_o</i>	– максимальная интенсивность свечения при добавлении анализируемой пробы
<i>I_k</i>	– максимальная интенсивность свечения в контрольной пробе
ГГНО	– Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось
HSP	– белки теплового шока
APP	– белки острой фазы
CRF	– кортикотропин-рилизинг-фактор
CRF	– кортикотропин-рилизинг-фактор
CRH	– кортикотропин-рилизинг-гормон
АКТГ	– адренокортикотропный гормон
стресс	– неспецифичный ответ организма на любое предъявленное ему требование (Ганс Селье)

Слюна	– смешанная, нестимулированая слюна
lg	– иммуноглобулин
ЖХ-МС	– жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией
РЖД	– Российская железная дорога
ИМТ	– индекс массы тела
КМС	– кандидат в мастера спорта
МС	– мастер спорта
Ферментативный	– в данной работе термин «ферментативный» принимается тождественным термину «ферментный» и означает «составленный из ферментов, использующий ферменты»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барбара Н. А. Оцените свое здоровье сами / Н. А. Барбара, В. И. Шапошникова. – Санкт-Петербург: Питер, 2003. – 256 с.
2. Бельская Л. В. Особенности состава ротовой жидкости в условиях патогенного минералообразования/ Л. В. Бельская, О. А. Голованова // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т. 30, № 5.
3. Бельская Л. В. Применение капиллярного электрофореза для определения минерального состава слюны человека/ Л. В. Бельская // Бюллетень науки и практики. – 2017. – № 2 (15). – С. 132.
4. Бельская Л. В. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов/ Л. В. Бельская, О. А. Голованова, В. Г. Турманидзе, Е. С. Шукайло // Омский научный вестник. – 2011. – № 6 (102). – С. 175–178.
5. Бельская Л. В. Биохимия слюны: методы исследования: методическое пособие/ Л. В. Бельская, Е. А. Сарф, В. К. Косенок – Омск: Омскбланкиздат, 2015. – 70 с.
6. Бельская Л. В. Корреляционные взаимосвязи состава слюны и плазмы крови в норме/ Л. В. Бельская, Е. А. Сарф, В. К. Косенок // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, № 8. – С. 477–482.
7. Бельская Л. В. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов/ Л. В. Бельская // Омский научный вестник. – 2011. – Т. 102, № 6. – С. 175–178.
8. Бодров В. А. Информационный стресс: учебное пособие для вузов. – М.: ПЕР СЭ, 2008. – 352 с.
9. Бодров В. А. Психологический стресс: развитие и преодоление. – М.: ПЕР СЭ, 2006. – 528 с. – ISBN 5-9292-0146-3.
10. Бурдина К.С. От молекул до человека = Molecules to man / под ред. проф. Н. П. Наумова; пер. с англ/ К.С. Бурдина, И. М. Пархоменко– М.: Просвещение, 1973. – 480 с.

11. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. – М.: Медицина, 1981. – 624 с.
12. Воеводина Т. В. Изучение закономерностей влияния на биолюминесцентную реакцию сывороток крови доноров и больных с выраженной эндогенной интоксикацией организма: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02. – Красноярск: АН СССР. Сиб. отд-ние. Ин-т биофиз., 1990. – 80 с.
13. Воеводина Т. В. Изучение степени интоксикации больных при перитоните/ Т. В. Воеводина, О. Е. Нифантьев, А. Н. Ковалевский, В. Р. Шульц, В. А. Кратасюк // Лаб. дело. – 1990. – № 9.
14. Воеводина Т. В. Биолюминесцентный метод оценки степени тяжести состояния больных с выраженной эндогенной интоксикацией организма/ Т. В. Воеводина, О. Е. Нифантьев, А. Н. Ковалевский, В. Р. Шульц, В. А. Кратасюк // Клиническая лабораторная диагностика. – 1990. – № 9. – С. 23–25.
15. Волчегорский И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови/ И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127.
16. Галиулина М.В. Электролитные компоненты смешанной слюны человека в условиях физиологии и патологии полости рта: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1988.
17. Гордашников В.А. Основные составляющие процесса профессиональной адаптации будущего специалиста/ В.А. Гордашников, А.Я. Осин // Современные научноемкие технологии. – 2008. – № 7. – С. 102–102.
18. Гордеева Е. В. Утомление при физической и умственной нагрузке/ Е. В. Гордеева, И.В. Тумашик, С. В. Мусина // Международный студенческий научный вестник. – 2015. – № 5. – С. 4.
19. Горская Г. Б. Мотивационные регуляторы деятельности спортсменов в спорте высших достижений // Актуальные проблемы психологии труда,

- инженерной психологии и эргономики / под ред. А. А. Обознова, А. Л. Журавлева. – М.: Институт психологии РАН, 2013. – Вып. 5. – С. 233–249.
20. Григорьев И. В. Белковый состав смешанной слюны человека: механизмы психофизиологической регуляции/ И. В. Григорьев, Е. А. Уланова, И. Д. Артамонов // Вестник РАМН. – 2004. – № 7. – С. 36–47.
21. Гурбатов С.Н. Акустический анализ слюны человека/ С.Н. Гурбатов, А.В. Клемина, И. Ю. Демин, В.А. Клемин // Известия Южного федерального университета. –2010.
22. Денисов А. Б. Слюнные железы. Слюна. – М., 2003. – 215 с.
23. Джалилов П. Б. Изменение показателей сыворотки крови и слюны тяжелоатлетов под влиянием тренировочной нагрузки // Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта. – 2012. – № 2 (84). - С. 58–62.
24. Гринберг Д. С. Управление стрессом / пер. с англ. Л. Гительман, М. Потапова. - 7-е изд. – СПб.: Питер, 2002. – 496 с.
25. Диценко С. Н. Показатели некоторых гормонов в слюне юных спортсменов, специализирующихся в гандболе/ С. Н. Диценко, Г.Д. Алексанянц // Физическая культура, спорт - наука и практика. –2013. – № 2. – С. 51–53.
26. Долбышев А.В. Классификация методов диагностики психофизиологического стресса/ А.В. Долбышев // Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral". – 2020. – № 4. – С. 92–97.
27. Есимбекова Е. Н. Ферментативное биотестирование: научные основы и применение/ Е. Н. Есимбекова, И.Г. Торгашина, В. П. Калябина, В.А. Кратасюк // Современные проблемы экологии. – 2021. –Т. 28, № 3. – С. 364.
28. Зелтынь А.Е. Хронический стресс и депрессия у больных ревматоидным артритом/ А.Е. Зелтынь, Ю. С. Фофанова, Т.А. Лисицына // Социальная и клиническая психиатрия. – 2009. – № 3. – С. 45–52.

29. Колычева И. В. Влияние факторов трудовой деятельности на содержание натрия в слюне у пожарных/ И. В. Колычева, О. А. Рычагова, А.В. Лизарев // Гигиена и санитария. – 2015. –Т. 94, № 4. – С. 44–47.
30. Коробейникова Э. Н. Количественное определение содержания белка и муцина (гликопротеинов) в слюне/ Э. Н. Коробейникова, Е.И. Ильиных // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 8. – С. 34–35.
31. Коробко А. В. Технология информационно-аналитической поддержки принятия решений на основе федерализации разнородной информации в концепции многомерного представления данных: дис. ... д-ра техн. наук: 05.13.17. - Красноярск: СФУ, 2024. – 298 с.
32. Кратасюк В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе/ В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Успехи микробиологии. –1987. – Т. 21. – С. 3–30.
33. Криштоп В.В. Биохимические показатели окислительного стресса в ротовой жидкости у студентов с разным стоматологическим статусом и качеством жизни/ В.В. Криштоп, М. Г. Курчанинова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 10–2. – С. 81–85.
34. Кудряшева Н. С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: учебное пособие/ Н. С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова – Красноярск: Изд-во КрасГУ, 2002. – 154 с.
35. Кулганов В.А. Психоэмоциональное напряжение и утомление учителя: механизмы, диагностика и профилактика/ В.А. Кулганов // Известия Российской государственной педагогической университета им. А. И. Герцена. – 2009. – № 100. – С. 131–142.
36. Куприянов Р. В. Психодиагностика стресса: практикум / Р. В. Куприянов, Ю.М. Кузьмина, сост. М-во образования и науки РФ, Казан. гос. технол. ун-т. – Казань: КНИТУ, 2012. – 212 с.
37. Лазарус Р. Теория стресса и психофизиологические исследования/ Р. Лазарус // Эмоциональный стресс. – М., 1970. – С. 178–209.

38. Леонова А. Б. Основные подходы к изучению профессионального стресса/ А. Б. Леонова // Вестник Московского университета. Серия 14. Психология. – 2000. – № 3. – С. 4–21.
39. Леонова А. Б. Функциональные состояния и работоспособность человека в профессиональной деятельности/ А. Б. Леонова, А.С. Кузнецова // Психология труда, инженерная психология и эргономика: учебник для академического бакалавриата / под ред. Е. А. Климова, О. Г. Носковой, Г. Н. Солнцевой. – М.: Юрайт, 2015. – Гл. 13. – С. 328–330.
40. Леонова А. Б. На грани стресса/ А. Б. Леонова // В мире науки. – 2004. – № 10. – С. 45–52.
41. Лукомская Н.Я. Ацетилхолин/ Н.Я. Лукомская, М.Я. Михельсон, А.Д. Адо // Большая медицинская энциклопедия: в 30 т. под гл. ред. Б.В. Петровский. – 3-е изд. – М.: Советская энциклопедия, 1975. – Т. 2: Антибиотики – Беккерель. – С. 406. – 608 с.
42. Мандра Ю.В. Динамика изменения биохимического состава слюны под влиянием углеводсодержащих продуктов «Легкого питания»/ Ю.В. Мандра, Л. А. Каминская, Е. Н. Светлакова, И. В. Гаврилов, П.А. Жолондзиовский, А.Д. Тимербулатов// Проблемы стоматологии. – 2016. – №4. – С.10-16.
43. Минутко В. Л. Депрессия. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 320 с. – ISBN 5-9704-0205-2.
44. Михайлов С. С. Слюна как объект биохимического контроля в спорте/ С. С. Михайлов, Е.В. Розенгарт // Ученые записки университета имени П. Ф. Лесгафта. – 2008. – № 6. – С. 57–61.
45. Педанов Ю.Ф. Лабораторные показатели нормы взрослого человека: справочник. – Одесса, 1992. – 123 с.
46. Петрушанко Т. А. Влияние адаптации к коротким стрессовым воздействиям на устойчивость тканей пародонта к острому стрессу/ Т. А. Петрушанко, Л.М. Таоасенко, А.И. Воложин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1994. – № 2. – С. 20–22.

47. Разумов А.Н. Адаптационные резервы организма и их коррекция с применением биоинформационных технологий: монография/ А.Н. Разумов, Л. В. Шарова, Ю. И. Кравцов – Пермь: Пермский государственный педагогический университет, 2011. – 298 с.
48. Реммель Н.Н. Биолюминесцентный контроль интенсивности патологических окислительных процессов в клетках перфузируемой печени крыс после гипертермического воздействия/ Н.Н. Реммель, В.А. Кратасюк, О.М. Мазняк, Е.В. Инжеваткин, В. П. Нефедов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, № 1. – С. 52–54.
49. Рожнов О. И. Оценка адаптивных реакций при психоэмоциональном стрессе, вызванном постановкой онкологического диагноза: дис. ... канд. мед. наук. - Краснодар: Кубанский государственный медицинский университет, 2009. – 145 с.
50. Розенгарт Е.В. Слюна как объект биохимического контроля в спорте/ Е.В. Розенгарт // Ученые записки университета имени П. Ф. Лесгафта. – 2008. – № 6 (40). – С. 57–61.
51. Романенко Е. Г. Способ определения общих гликопротеинов в слюне/ Е. Г. Романенко, И.А. Кленина // Мир медицины и биологии. – 2012. – Т. 8, № 4. – С. 91–93.
52. Савин Г. А. Уровень лактата в кожном экскрете как показатель физической тренированности спортсменов/ Г. А. Савин, Е. В. Ушакова, О.Н. Перфильева // Теория и практика физической культуры. – 2000. – № 1. – С. 34–38.
53. Савинов С. С. Проблемы и оптимизация отбора образцов, их хранения и пробоподготовки при определении микроэлементного состава слюны человека/ С. С. Савинов, А. А. Анисимов, А.И. Дробышев // Журнал аналитической химии. – 2016. – Т. 71, № 10. – С. 1063–1068.
54. Савченко А. А. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека

- биолюминесцентным методом/ А. А. Савченко, Л. Н. Сунцова // Лабораторное дело. – 1989. – № 11. – С. 23–25.
55. Сарф Е.А. Оценка уровня психоэмоционального стресса у обучающихся с использованием биохимического анализа слюны/ Е.А. Сарф, Л.В. Бельская // Наука и образование сегодня. – 2023. – Т. 13, № 4. – С. 218–222.
56. Селье Г. Стресс без дистресса = Stress without distress / пер. с англ.; под общ. ред. Е.М. Крепс; предисл. Ю.М. Саарм. - М.: Прогресс, 1982. – 125 с.
57. Сластенин В.А. Психология и педагогика: учебное пособие для студентов высших учебных заведений/ В.А. Сластенин, В. П. Каширин - 8-е изд., стер. - М.: Академия, 2010. – С.480. ISBN 978-5-7695-6707-0.
58. Совцов С.А. Перспективы использования био- и хемилюминесцентных методов для характеристики хирургических эндотоксикозов/ С.А. Совцов, В.А. Кратасюк: препринт. – Красноярск: Ин-т биофизики СО АН СССР, 1991. – С.17.
59. Совцов С.А. Способ определения эндотоксикоза при хирургических операциях/ С.А. Совцов, В.А. Кратасюк// а.с. 1714512 СССР: МПК A61B 10/00. № 4388027; заявл. 19.01.1988; опубл. 22.10.1991, Бюл. № 7. –С. 91.
60. Соколова Н. И. Спорт высших достижений и актуальные вопросы стоматологической превентологии/ Н. И. Соколова, С.С. Люгайло // Педагогика. –2007. – № 5. – С. 78–83.
61. Спилбергер Ч. Концептуальные и методологические проблемы исследования тревоги // Тревога и тревожность / под ред. В. М. Астапова. – СПб.: Питер, 2001. – С. 88–103.
62. Тарасенко Л. М. Слюнные железы: биохимия, физиология, клинические аспекты/ Л. М. Тарасенко, Г. А. Суханова, В. П. Мищенко, К.С. Непорада – Томск: НТЛ, 2002. – С.124.
63. Тарасенко Л. М. Биохимия органов полости рта: учебное пособие для студентов факультета подготовки иностранных студентов/ Л. М. Тарасенко, К.С. Непорада – Полтава: Полтава, 2008. – С.70.

64. Троегубова Н. А. Микронутриенты в питании спортсменов/ Н. А. Троегубова, Н. В. Рылова, А.С. Самойлов // ПМ. –2014. –№ 1 – С.77.
65. Филонов В. А. Перспективы исследования смешанной слюны у детей при хронических заболеваниях/ В. А. Филонов, Е. А. Ульянова, А. С. Богданова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2014. – № 1. – С. 113–116.
66. Фокин Ю. В. Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения и физической нагрузки фармакодинамики лекарств/ Ю. В. Фокин, В.Н. Каркищенко // Биомедицина. –2010. – № 5. – С. 17–21.
67. Хайтов Р. М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии/ Р. М. Хайтов, Б. В. Пинегин // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. – № 1. – С. 9–16.
68. Ханин Ю. Л. Краткое руководство к применению шкалы реактивной и личностной тревожности Ч.Д. Спилбергера. – Л.: ЛНИИФК, 1976. –18 с.
69. Храмов В.А. Простой метод определения лактата в биологических жидкостях/ В.А. Храмов, Г. А. Савин // Гигиена и санитария. – 1995. – № 4. – С. 52.
70. Цветаева Т. В. Динамика натрия, калия, глюкозы и кортизола слюны как показателей адаптационного синдрома у металлургов/ Т. В. Цветаева, А.В. Гулин // Вестник Тамбовского государственного университета. – 2010. – Т. 15, № 1. – С. 245–250.
71. Чепрасова А. А. Концентрация глюкозы, катионов цинка и показатели оксидативного статуса в слюне как неинвазивные маркеры развития сахарного диабета 2-го типа/ А. А. Чепрасова, С. С. Попов, А. Н. Пашков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – № 5. – С. 34–42.
72. Черкасов Д. В. Сравнительный анализ содержания кортизола в слюне у студентов вуза с различной спортивной подготовкой / Д. В. Черкасов,

- А.В. Гулин // Вестник Тамбовского государственного университета. – 2011. – Т. 16, № 2. – С. 567–571.
73. Шабалин А. В. Информативность психоэмоциональной нагрузочной пробы «математический счет» и ручной дозированной изометрической нагрузки в диагностике стресс-зависимости у больных эссенциальной артериальной гипертензией/ А. В. Шабалин, Е. Н. Гуляева, О. В. Крваленко, Э. М. Веркошанская, Е. Е. Торочкина, А. С. Криковцов // Артериальная гипертензия. – 2003. – Т. 9, № 3. – С. 98–101.
74. Шаленкова М. А. Акустический показатель слюны при стрессе/ М. А. Шаленкова, З. Д. Михайлова, В.А. Клемин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 28–41.
75. Шлепцова В. А. Оценка иммунного статуса спортсменов на разных этапах тренировочного процесса/ В. А. Шлепцова, Н. В. Малюченко, М. А. Куликова // Вестник спортивной науки. – 2006. – № 3. – С. 45–52.
76. Шульженко В. И. Саливадиагностика и определение содержания микроэлементов в организме детей с аномалиями развития верхних отделов желудочно-кишечного тракта/ В. И. Шульженко, Е.Е. Текущая, Ю.А. Васильев // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 5. – С. 158–159.
77. Щербатых Ю.В. Вегетативные проявления экзаменационного стресса: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.00.13 / Воронежский государственный университет. – Воронеж, 2001. – С. 312.
78. Щербатых Ю.В. Методики диагностики психологического стресса // Исследовательский потенциал гуманитарно-экономических наук в современном высшем учебном заведении: межвузовский сборник научных трудов. – Воронеж: Воронежский государственный педагогический университет, 2022. –Вып. 13. – С. 154–161.
79. Arakawa T. A Wearable Cellulose Acetate-Coated Mouthguard Biosensor for In Vivo Salivary Glucose Measurement/ T. Arakawa, K. Tomoto, H. Nitta, K.

- Toma, S. Takeuchi, T. Sekita, S. Minakuchi, K. Mitsubayashi // Analytical Chemistry. – 2020. – V. 15, №92 (18) – P. 12201-12207.
80. Arbuckle M.R. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus/ M.R. Arbuckle, M.T. McClain, M. V. Rubertone, R.H. Scofield, G.J. Dennis, J.A. James // The New England Journal of Medicine. – 2003. – V. 349. – P. 1526–1533.
81. Barker S.B. The colorimetric determination of lactic acid in biological material/ S.B. Barker, W.H. Summerson // Journal of Biological Chemistry. – 1941. – V. 138. – P. 535-554.
82. Bartlett C.A. Disposable screen printed sensor for the electrochemical detection of methamphetamine in undiluted saliva/ C.A. Bartlett, S. Taylor, C. Fernandez, C. Wanklyn, D. Burton, E. Enston, A. Raniczkowska, M. Black, L. Murphy // Chemistry Central Journal. – 2016. – V. 1, №10 – P. 3.
83. Bellingrath S. Cortisol dysregulation in schoolteachers in relation to burnout, vital exhaustion, and effort-reward-imbalance/ S. Bellingrath, T. Weigl, B.M. Kudielka // Biological Psychology. – 2008. – V. 78, № 1. – P. 104.
84. Bel'skaya L. V. Chronophysiological features of the normal mineral composition of human saliva/, V. Kosenok, E. Sarf // Arch. Oral Biology. – 2017. – V. 82. – P. 286.
85. Bel'skaya, L. V. Age and gender characteristics of the biochemical composition of saliva: Correlations with the composition of blood plasma/ L. V. Bel'skaya, E. A. Sarf & V. Kosenok // Journal of oral biology and craniofacial research. – 2020. – V. 10, N 2. – P. 59-65.
86. Berestneva O. G. Methods of studying the structure of medical data/ O. G. Berestneva, I. A. Osadchaya, E. V. Nemerov // Bulletin of Science of Siberia. – 2012. –V. 1, N 2. – P.333-338.
87. Bezrukikh A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology/ A. Bezrukikh, E. Esimbekova, E. Nemtseva, V. Kratasyuk // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2014. – V. 406 – P. 5743.

88. Birditt K.S. Daily social interactions and the biological stress response: Are there age differences in links between social interactions and alpha-amylase? / K.S. Birditt, L.A. Tighe, M.R. Nevitt, S.H. Zarit // Gerontologist. – 2018. – V. 58, N 6. – P. 1114.
89. Briguglio G. Salivary biomarkers and work-related stress in night shift workers / G. Briguglio, M. Teodoro, S. Italia // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2021. – V. 18. N 6. –P. 3184.
90. Burg M.M. Role of behavioral and psychological factors in mental stress-induced silent left ventricular dysfunction in coronary artery disease/ M.M. Burg, D. Jain, R. Soufer, R. D. Kerns, B. L. Zaret // Journal of the American College of Cardiology. – 1993. – V. 22, N 2. –P.440-448.
91. Burlage F. R., Variability of flow rate when collecting stimulated human parotid saliva/ F. R. Burlage, J. Pijpe, R.P. Coppes, M.E. Hemels, H. Meertens, A. Canrinus, A. Vissink // European journal of oral sciences. – 2005. – V. 113, N 5. – P.386–390.
92. Carvalho J. Determination of Antiepileptic Drugs Using Dried Saliva Spots/ J. Carvalho, J. Rosado, T. Barroso, M. Gallardo // Journal of Analytical Toxicology. –2018. – V. 43, N1. – P.61-71.
93. Chapman C.J. EarlyCDT-Lung test: Improved clinical utility through additional autoantibody assays/ Chapman C.J., Healey G.F., Murray A., Boyle P., Robertson C., Peek L.J. // Tumor Biology. – 2012. – V. 33. – P.1319–1326.
94. Chianeh Y.R. Biochemical markers in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma/ Y.R. Chianeh, K. Prabhu // Asian Pacific Journal of Tropical Disease. – 2014. – V. 4. – P.33–40.
95. Chiang S.H. Development and validation of a quantitative, non-invasive, highly sensitive and specific, electrochemical assay for anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in saliva/ S.H. Chiang, M. Tu, J. Cheng, F. Wei, F. Li, D. Chia, O. Garner, S. Chandrasekaran, R. Bender, C.M. Strom, D.T.W. Wong // PLOS One. – 2021. – V. 16(7) – P.0251342.

96. Chiappin S. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation/ Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF// Clinica Chimica Acta. – 2007. – V. 383. – P.30–40.
97. Chicharro J. L. Saliva composition and exercise/ Chicharro J. L., A. Lucía, M. Pérez, A. F. Vaquero, R. Ureña // Sports Medicine. – 1998. – V. 26. – P. 17.
98. Chrousos G. P. Stress and disorders of the stress system/ G. P. Chrousos // Nature Reviews Endocrinology. –2009. – V. 5(7). – P. 374-381.
99. Chrousos G. Stress: Basic Mechanisms and Clinical Implications. New York, NY: New York Academy of Sciences. –1995. –V. 771. – P. 130–135
100. Cohen S. Psychological stress and disease / S. Cohen, D. Janicki-Deverts, G. E. Miller // JAMA. – 2007. – V. 298, N 14. – P. 1685–1687.
101. Comabella M. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis / M. Comabella, X. Montalban // The Lancet Neurology. – 2014. – V. 13. – P. 113–126.
102. Cuzzubbo A. J. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection / A. J. Cuzzubbo, D. W. Vaughn, A. Nisalak, S. Suntayakorn, J. Aaskov, P. L. Devine // Journal of Clinical Microbiology. – 1998. – V. 36. – P. 3737–3739.
103. Dawes C. The effects of different stimuli on the composition of saliva in man / C. Dawes, G. N. Jenkins // The Journal of Physiology. – 1964. – V. 170. – P. 86–100.
104. Denny P. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions / P Denny, F.K. Hagen, M. Hardt, L. Liao, W. Yan, M. Arellanno, S. Bassilian, G.S. Bedi, P. Boontheung, D. Cociorva, C.M. Delahunty, T. Denny, J. Dunsmore, K.F. Faull, J. Gilligan, M. Gonzalez-Begne, F. Halgand, S.C. Hall, X. Han, B. Henson, J. Hewel, S. Hu, S. Jeffrey, J. Jiang, J.A. Loo, R.R. Ogorzalek Loo, D. Malamud, J.E. Melvin, O. Miroshnychenko, M. Navazesh, R. Niles, S.K. Park, A. Prakobphol, P. Ramachandran, M. Richert, S. Robinson, M. Sondej, P. Souda, M.A. Sullivan, J. Takashima, S. Than, J. Wang, J.P. Whitelegge, H.E. Witkowska, L. Wolinsky, Y. Xie, T. Xu, W. Yu, J. Ytterberg, D.T. Wong, J.R. Yates,

S.J. Fisher // Journal of Proteome Research. – 2008. – V. 7, N 5. – P. 1994–2006.

105. Ball D. Metabolic and endocrine response to exercise: sympathoadrenal integration with skeletal muscle / D. Ball // The Journal of Endocrinology. – 2015. – V. 224, N 2. – P. 79–95.
106. Doenhoff M. J. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: Can it be done with antibodies? / M. J. Doenhoff, P. L. Chiodini, J. V. Hamilton // Trends in Parasitology. – 2004. – V. 20. – P. 35–39.
107. Eftekhari A. Bioassay of saliva proteins: The best alternative for conventional methods in non-invasive diagnosis of cancer / A. Eftekhari, M. Hasanzadeh, S. Sharifi, S. M. Dizaj, R. Khalilov, E. Ahmadian // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 124. – P. 1246–1255.
108. Elemental analysis of Biological Materials. Current problems and Techniques with Special Reference to Trace Elements. – Vienna: IAEA, 1980. – P. 45–49.
109. Deans E. Stress: The Killer Disease / E. Deans // Psychology Today. – 2012.
110. Esimbekova E. N. Enzyme Inhibition-based assay to estimate the contribution of formulants to the effect of commercial pesticide formulations / E. N. Esimbekova, V. P. Kalyabina, K. V. Kopylova, V. I. Lonshakova-Mukina, A. A. Antashkevich, I. G. Torgashina, K. A. Lukyanenko, E. V. Nemtseva, V. A. Kratasyuk // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24, N 3. – P. 2268.
111. Esimbekova E. N. Bioluminescent method to determine non-specific endotoxicosis in therapy / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, V. V. Abakumova // Luminescence. – 1999. – V. 14, N 4. – P. 197–198.
112. Esimbekova E. N. The Effects of Commercial Pesticide Formulations on the Function of In Vitro and In Vivo Assay Systems: A Comparative Analysis / E. N. Esimbekova, V. P. Kalyabina, K. V. Kopylova, V. I. Lonshakova-Mukina, A. A. Antashkevich, I. G. Torgashina, K. A. Lukyanenko, V. A. Kratasyuk // Chemosensors. – 2022. – V. 10, N 8. – P. 328.

113. Esimbekova E. N. Design of bioluminescent biosensors for assessing contamination of complex matrices / E. N. Esimbekova, V. P. Kalyabina, K. V. Kopylova, I. G. Torgashina, V. A. Kratasyuk // Talanta. – 2021. – V. 233. – P. 122509.
114. Esimbekova E. N. Enzymatic Biotesting: Scientific Basis and Application / E. N. Esimbekova, I. G. Torgashina, V. P. Kalyabina, V. A. Kratasyuk // Contemporary Problems of Ecology. – 2021. – V. 14, N 3. – P. 290–304.
115. Feijen S. Monitoring the swimmer's training load: A narrative review of monitoring strategies applied in research / S. Feijen, A. Tate, K. Kuppens, L.A. Barry, F. Struyf// Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports. – 2020. – V. 30, N 11. – P. 2037–2050.
116. Amado F. M. L. One decade of salivary proteomics: current approaches and outstanding challenges / F. M. L. Amado, R. P. Ferreira, R. Vitorino // Clinical Biochemistry. – 2013. – V. 46, N 6. – P. 506–517.
117. Folkman S. Stress: Appraisal and Coping / S. Folkman // Encyclopedia of Behavioral Medicine / ed. by M. D. Gellman, J. R. Turner. – New York: Springer, 2013. – P. 1913–1915.
118. Frampas C. F. Untargeted saliva metabolomics by liquid chromatography-Mass spectrometry reveals markers of COVID-19 severity / C. F. Frampas, K. Longman, M. Spick, H. M. Lewis, C. D. S. Costa, A. Stewart, D. Dunn-Walters, D. Greener, G. Evetts, D. J. Skene, D. Trivedi, A. Pitt, K. Hollywood, P. Barran, M. J. Bailey // PLoS One. – 2022. – V. 17, N 9. – P. e0274967.
119. Franco-Martínez L. Changes in Serum and Salivary Proteins in Canine Mammary Tumors / L. Franco-Martínez, A. Gelemanović, A. Horvatić, M. D. Contreras-Aguilar, R. Dąbrowski, V. Mrljak, J. J. Cerón, S. Martínez-Subiela, A. Tvarijonaviciute // Animals. – 2020. – V. 10, N 4. – P. 741. DOI: 10.3390/ani10040741.
120. Frenkel E. S. Salivary mucins in host defense and disease / E. S. Frenkel, K. Ribbeck // Current Opinion in Cell Biology. – 2015. – V. 35. – P. 92–98.

121. Frundzhyan V. Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water / V. Frundzhyan, N. Ugarova // Luminescence. – 2007. – V. 22, N 3. – P. 241–244.
122. Gallagher P. Assessing cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva: effects of collection method / P. Gallagher, M. M. Leitch, A. E. Massey, R. H. Mcallister-williams, A. H. Young // Journal of Psychopharmacology. – 2006. – V. 20, N 5. – P. 643–649.
123. Girotti S. Luminescent enzymatic flow sensor for D- and L-lactate assay in beer / S. Girotti, M. Muratori, F. Fini, E. N. Ferri, G. Carrea, M. Koran, P. Rauch // European Food Research and Technology. – 2000. – V. 210. – P. 216–219.
124. GOST 23862.6-79– 2003 Rareearth metals and their oxides. Methods for the determination of sodium, potassium and calcium. – Moscow: Russian National Standards Institute, 2003. – 15 p.
125. Gonzalez-Gallardo C. L. Electrochemical creatinine detection for advanced point-of-care sensing devices: a review / C. L. Gonzalez-Gallardo, N. Arjona, L. Álvarez-Contreras, M. Guerra-Balcázar // RSC Advances. – 2022. – V. 12, N 47. – P. 30785–30802.
126. Greenwald J. L. A rapid review of rapid HIV antibody tests / J. L. Greenwald, G. R. Burstein, J. Pincus, B. Branson // Current Infectious Disease Reports. – 2006. – V. 8, N 2. – P. 125–131.
127. Gritsenko E. V. Bioluminescent control of the training process / E. V. Gritsenko // Collection of materials of the 7-th All-Russian conference on homeostasis. – Krasnoyarsk, 1996. – P. 232–233.
128. Gröschl M. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs / M. Gröschl, K. Henrik, H. Topf, T. Rupprecht, M. Rauh // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2008. – V. 47, N 3. – P. 478–486.
129. Hansen A. M. Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and their impact on measurement among healthy adults: a review / A.

- M. Hansen, A. H. Garde, R. Persson // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2008. – V. 68, N 6. – P. 448–458.
130. Hartenbach F. A. R. R. Proteomic analysis of whole saliva in chronic periodontitis / F. A. R. R. Hartenbach, É. Velasquez, F. C. S. Nogueira, G. B. Domont, E. Ferreira, A. P. V. Colombo // Journal of Proteomics. – 2020. – V. 213. – P. 103602.
131. Hastings J. W. Bioluminescence from the reaction of FMN, H₂O₂ and long chain aldehyde with bacterial luciferase / J. W. Hastings, S. C. Tu, J. E. Becvar, R. P. Presswood // Photochemistry and Photobiology. – 1979. – V. 29. – P. 383–387.
132. Henckens M. J. A. G. Interindividual differences in stress sensitivity: Basal and stress-induced cortisol levels differentially predict neural vigilance processing under stress / M. J. A. G. Henckens, F. Klumpers, D. Everaerd // Social Cognitive and Affective Neuroscience. – 2016. – V. 11, N 4. – P. 663–673.
133. Heo C. K. Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers / C. K. Heo, Y. Y. Bahk, E. W. Cho // BMB Reports. – 2012. – V. 45, N 12. – P. 677–685.
134. Hettegger P. High similarity of IgG antibody profiles in blood and saliva opens opportunities for saliva-based serology / P. Hettegger, J. Huber, K. Paßecker, R. Soldo, U. Kegler, C. Nöhammer, A. Weinhäusel // PLoS One. – 2019. – V. 14, N 6. – P. e0218456.
135. Hickson R.C. Intervention in strength development by simultaneous strength and endurance training over a long period of time/ R.C. Hickson // European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology. –1980. – V. 45, N 2-3. – P.255-263.
136. Hynne H. Saliva Metabolomics in Dry Mouth Patients with Head and Neck Cancer or Sjögren's Syndrome / H. Hynne, E. M. Sandås, K. B. P. Elgstøen, H. Rootwelt, T. P. Utheim, H. K. Galtung, J. L. Jensen // Cells. – 2022. – V. 11, N 3. – P. 323.

137. Inoue H. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes / H. Inoue, K. Ono, W. Masuda // Archives of Oral Biology. – 2006. – V. 51, N 12. – P. 1055–1060.
138. James B. Self-presentational sources of competitive stress during performance / B. James, D. Collins // Journal of Sport and Exercise Psychology. – 1997. – V. 19, N 1. – P. 17–35.
139. Jasim H. Saliva as a medium to detect and measure biomarkers related to pain / H. Jasim, A. Carlsson, B. Hedenberg-Magnusson, B. Ghafouri, M. Ernberg // Scientific Reports. – 2018. – V. 8, N 1. – P. 3220.
140. Pollock J. R. Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion: a carbon-13 nuclear magnetic resonance study of the oxidation products / J. R. Pollock, H. M. Goff // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. – 1992. – V. 1159, N 3. – P. 279–285.
141. Kamat H. A. Detection of antibodies to HIV in saliva / H. A. Kamat, M. Adhia, G. V. Koppikar, B. K. Parekh // National Medical Journal of India. – 1999. – V. 12, N 4. – P. 159–161.
142. Karasek R. The Job Content Questionnaire (JCQ): An instrument for internationally comparative assessments of psychosocial job characteristics / R. Karasek, C. Brisson, N. Kawakami // Journal of Occupational Health Psychology. – 1998. – V. 3, N 4. – P. 322–355.
143. Kataoka H. Online In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Automated Analysis of Four Sulfated Steroid Metabolites in Saliva Samples / H. Kataoka, D. Nakayama // Molecules. – 2022. – V. 27, N 10. – P. 3225.
144. Kaur J. Salivary biomarkers for oral cancer and pre cancer screening: a review / J. Kaur, R. Jacobs, Y. Huang, N. Salvo, C. Politis // Clinical Oral Investigations. – 2018. – V. 22, N 2. – P. 633–640.
145. Klaassens E. R. Trauma exposure in relation to basal salivary cortisol and the hormone response to the dexamethasone/CRH test in male railway employees without lifetime psychopathology / E. R. Klaassens, E. J. Giltay, T. van Veen,

G. Veen, F. G. Zitman // Psychoneuroendocrinology. – 2010. – V. 35, N 6. – P. 878–886.

146. Kohler H. Interaction of lactoperoxidase with hydrogen peroxide. Formation of enzyme intermediates and generation of free radicals / H. Kohler, H. Jenzer // Free Radical Biology and Medicine. – 1989. – V. 6, N 3. – P. 323–339.
147. Kolosova E. M. Bioluminescent-inhibition-based biosensor for full-profile soil contamination assessment / E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, A. A. Shpedt, L.V. Stepanova, V.A. Kratasyuk // Biosensors. – 2022. – V. 12, N 5. – P. 353.
148. Kratasyuk V. Bioluminescent enzyme assay for the indication of plant stress in enclosed life support systems / V. Kratasyuk, E. Esimbekova, M. Correll, R. Bucklin // Luminescence. – 2011. – V. 26, N 6. – P. 543–546.
149. Kratasyuk V. A. A noninvasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' responses to physical exertion / V. A. Kratasyuk, L. V. Stepanova, R. Ranjan, O. S. Sutormin, S. Pande, G. V. Zhukova, O. M. Miller, N. V. Maznyak, O. A. Kolenchukova // Luminescence. – 2020. – V. 36, N 2. – P. 384–390.
150. Kratasyuk V. A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova, M. I. Gladyshev, E. B. Khromichek, A. M. Kuznetsov, E. A. Ivanova // Chemosphere. – 2001. – V. 42, N 8. – P. 909–915.
151. Kubala E. A Review of Selected Studies That Determine the Physical and Chemical Properties of Saliva in the Field of Dental Treatment / E. Kubala, P. Strzelecka, M. Grzegocka, D. Lietz-Kijak, H. Gronwald, P. Skomro, E. Kijak // BioMed Research International. – 2018. – V. 2018. – P. 6572381.
152. Kudryasheva N. S. Bioluminescence and exogenous compounds. Physico-chemical basis for bioluminescent assay / N. S. Kudryasheva // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2006. – V. 83, N 1. – P. 77–86.
153. Kuwabara H. Salivary metabolomics with machine learning for colorectal cancer detection / H. Kuwabara, K. Katsumata, A. Iwabuchi, R. Udo, T. Tago,

- K. Kasahara, J. Mazaki, M. Enomoto, T. Ishizaki, R. Soya, M. Kaneko, S. Ota, A. Enomoto, T. Soga, M. Tomita, M. Sunamura, A. Tsuchida, M. Sugimoto, Y. Nagakawa // Cancer Science. – 2022. – V. 113, N 9. – P. 3234–3243.
154. Kyrou I. Stress mechanisms and metabolic complications / I. Kyrou, C. Tsigos // Hormone and Metabolic Research. – 2009. – V. 41, N 2. – P. 98–103.
155. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4/ U.K. Laemmli // Nature. –1970. – V. 227 – P. 680-685.
156. Lazarus R. S. Psychological stress and the coping process / R. S. Lazarus. – New York: McGraw-Hill, 1966. – P. 466.
157. Lazarus R. Stress, Appraisal, and Coping / R. Lazarus, S. Folkman. – New York: Springer, 1984. – P.456.
158. Liu X. Salivary Electrochemical Cortisol Biosensor Based on Tin Disulfide Nanoflakes / X. Liu, S. P. C. Hsu, W. C. Liu, Y. M. Wang, X. Liu, C. S. Lo, Y. C. Lin, S. C. Nabilla, Z. Li, Y. Hong, C. Lin, Y. Li, G. Zhao, R. J. Chung // Nanoscale Research Letters. – 2019. – V. 14, N 1. – P. 189.
159. Loo J. A. Comparative human salivary and plasma proteomes / J. A. Loo, W. Yan, P. Ramachandran, D. T. Wong // Journal of Dental Research. – 2010. – V. 89, N 10. – P. 1016–1023.
160. Madar R. Detection of antibodies in saliva—an effective auxiliary method in surveillance of infectious diseases / R. Madar, S. Straka, T. Baska // Bratislavské Lekarske Listy. – 2002. – V. 103, N 1. – P. 38–41.
161. Maina G. Associations between two job stress models and measures of salivary cortisol / G. Maina, M. Bovenzi, A. Palmas, F. Larese Filon // International Archives of Occupational and Environmental Health. – 2009. – V. 82, N 9. – P. 1141–1150.
162. Makarova N. V. Statistical analysis of biomedical data using statistical software packages Statistica, SPSS, NPSS, SYSTAT / N. V. Makarova; ed. by S. S. Aleksanin. – St. Petersburg: Printing Center of St. Petersburg State University. Fire Service of the Ministry of Emergency Situations of Russia, 2012. – P.117.

163. Marvin R. K. Salivary changes in response to acute stress in medical residents performing advanced clinical simulations: A pilot proteomics study / R. K. Marvin, M. B. Saepoo, S. Ye // Biomarkers. – 2017. – V. 22, N 3-4. – P. 372–382.
164. McEwen B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain / B. S. McEwen // Physiological Reviews. – 2007. – V. 87, N 3. – P. 873–904.
165. Millea K. M. Comparative profiling of human saliva by intact protein LC/ESI-TOF mass spectrometry / K. M. Millea, I. S. Krull, A. B. Chakraborty, J. C. Gebler, S. J. Berger // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. – 2007. – V. 1774, N 7. – P. 897–906.
166. Miller C. S. Current developments in salivary diagnostics / C. S. Miller, J. D. Foley, A. L. Bailey, C. L. Campell, R. L. Humphries, N. Christodoulides, P. N. Floriano, G. Simmons, B. Bhagwandin, J. W. Jacobson, S. W. Redding, J. L. Ebersole, J. T. McDevitt // Biomarkers in Medicine. – 2010. – V. 4, N 1. – P. 171–189.
167. Mitsuyama K. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease / K. Mitsuyama, M. Niwa, H. Takedatsu, H. Yamasaki, K. Kuwaki, S. Yoshioka // World Journal of Gastroenterology. – 2016. – V. 22, N 3. – P. 1304–1310.
168. Modena M. G. Echocardiographic monitoring of mental stress test in ischemic heart disease / M.G. Modena, F. Corghi, G. Fantini, G Mattioli // Clinical Cardiology. – 1989. – V. 12, N 1. – P. 21–24.
169. Murata T. Salivary metabolomics with alternative decision tree-based machine learning methods for breast cancer discrimination / T. Murata, T. Yanagisawa, T. Kurihara, M. Kaneko, S. Ota, A. Enomoto, M. Tomita, M. Sugimoto, M. Sunamura, T. Hayashida, Y. Kitagawa, H. Jinno // Breast Cancer Research and Treatment. – 2019. – V. 177, N 3. – P. 591–601.

170. Nam Y. Salivary biomarkers of inflammation and oxidative stress in healthy adults / Y. Nam, Y.Y. Kim, J.Y. Chang, H.S. Kho // Archives of Oral Biology. – 2019. – V. 97. – P. 215–222.
171. Navazesh M. Methods for collecting saliva / M. Navazesh // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1993. – V. 694. – P. 72–77.
172. Christensen N. J. The biochemical assessment of sympathoadrenal activity in man / N. J. Christensen // Clinical Autonomic Research. – 1991. – V. 1, N 2. – P. 167–172.
173. Nunes L. A. S. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population / L. A. S. Nunes, R. Brenzikofe, D. V. Macedo // Clinical Biochemistry. – 2011. – V. 44, N 17-18. – P. 1440–1444.
174. Oliveira G. M. Simultaneous separation of naproxen and 6-O-desmethylnaproxen metabolite in saliva samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Pharmacokinetic study of naproxen alone and associated with esomeprazol / G. M. Oliveira, T. J. Dionísio, N. L. D. H. Polanco, V. S. Siqueira-Sandrín, F. A. C. Faria, C. F. Santos, A. M. Calvo // PLoS One. – 2022. – V. 17, N 12. – P. 278411.
175. Olusakin A. M. Stress: The Silent Killer / A. M. Olusakin, F. A. Nwolisa // Topical Issues in Social-Personal Guidance and Counselling / A. M. Olusakin, T. D. O. Adewuyi, B. K. Odu, K. Olagunju. – Lagos: Brightways Publishers, 2012. – P. 77–87.
176. Ota A. The Effort-reward Imbalance work-stress model and daytime salivary cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) among Japanese women / A. Ota, J. Mase, N. Howteerakul, T. Rajatanun, N. Suwannapong, H. Yatsuya, Y. Ono // Scientific Reports. – 2015. – V. 4. – P. 6402.
177. Pappa E. Saliva in the "Omics" era: A promising tool in paediatrics / E. Pappa, E. Kousvelari, H. Vastardis // Oral Diseases. – 2019. – V. 25, N 1. – P. 16–25.

178. Pappa E. Proteomic advances in salivary diagnostics / E. Pappa, K. Vougas, J. Zoidakis, H. Vastardis // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. – 2020. – V. 1868, N 11. – P. 140494.
179. Park N. J. Characterization of RNA in saliva / N. J. Park, Y. Li, T. Yu, B. M. N. Brinkman, D. T. Wong // Clinical Chemistry. – 2006. – V. 52, N 6. – P. 988–994.
180. Perry K. R. Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay / K. R. Perry, D. W. G. Brown, J. V. Parry, S. Panday, C. Pipkin, A. Richards // Journal of Medical Virology. – 1993. – V. 40, N 3. – P. 235–240.
181. Rana M. Highly Specific Detection of Oxytocin in Saliva / M. Rana, N. Yildirim, N. E. Ward, S. P. Vega, M. J. Heffernan, A. A. Argun // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24, N 5. – P. 4832.
182. Rimatskaya N. V. Bioluminescent assays for monitoring air pollution / N. V. Rimatskaya, E. V. Nemtseva, V. A. Kratasyuk // Luminescence. – 2012. – V. 27, N 2. – P. 154.
183. Roehr B. FDA approves “instant” HIV home test / B. Roehr // BMJ. – 2012. – V. 345. – P. e4636.
184. Nath S. Effects of stress in psychological health and its management ad valorem / S. Nath, V. Singh // Journal of Law. – 2019. – V. 6, N 1. – P. 1–12.
185. Schulz B. L. Saliva proteome research: current status and future outlook / B. L. Schulz, J. Cooper-White, C. K. Punyadeera // Critical Reviews in Biotechnology. – 2013. – V. 33, N 3. – P. 246–259.
186. Segal A. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better / A. Segal, D. T. Wong // European Journal of Dental Education. – 2008. – V. 12, N Suppl 1. – P. 22–29.
187. Sembler-Møller M. L. Proteomics of saliva, plasma, and salivary gland tissue in Sjögren's syndrome and non-Sjögren patients identify novel biomarker candidates / M. L. Sembler-Møller, D. Belstrøm, H. Locht, A. M. L. Pedersen // Journal of Proteomics. – 2020. – V. 225. – P. 103877.

188. Shan Z. Rotating night shift work and adherence to unhealthy lifestyle in predicting risk of type 2 diabetes: results from two large US cohorts of female nurses / Z. Shan, Y. Li, G. Zong, Y. Guo, J. Li, J.E. Manson, F.B. Hu, W.C. Willett, E.S. Schernhammer, S.N. Bhupathiraju // BMJ. – 2018. – V. 363. – P. 4641.
189. Shi W. An electrochemical biosensor based on multi-wall carbon nanotube-modified screen-printed electrode immobilized by uricase for the detection of salivary uric acid / W. Shi, J. Li, J. Wu, Q. Wei, C. Chen, N. Bao, C. Yu, H. Gu // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2020. – V. 412, N 26. – P. 7275–7283.
190. Siddharth R. Saliva as a detection tool for dental caries: a systematic review / R. Siddharth, R. Gautam, P. Chand, K. K. Agrawal, R. D. Singh, B. P. Singh // The Journal of Indian Prosthodontic Society. – 2015. – V. 15, N 3. – P. 206–211.
191. Siegrist J. Adverse health effects of high-effort/low-reward conditions / J. Siegrist // Journal of Occupational Health Psychology. – 1996. – V. 1, N 1. – P. 27–41.
192. Soni J. Evaluation of determinant factors of nickel release by conventional orthodontic brackets / J. Soni, S. Goje, N. Kulkarni, T. R. Shyagal, D. P. Bhayya // International Orthodontics. – 2018. – V. 16, N 1. – P. 31–41.
193. Stepanova L. V. Of bioluminescent saliva testing in evaluating of physical preparedness of athletes with different qualifications / L. V. Stepanova, A. M. Vyshedko, O. A. Kolenchukova, G. V. Zhukova, V. A. Kratasyuk // Siberian Medical Review. – 2017. – N 6. – P. 63–69.
194. Stepanova L. V. Bioluminescence Enzymatic Bioassay of Saliva for Occupational Monitoring of the Functional State of the Body in Rail Transportation Workers / L. V. Stepanova, O. A. Kolenchukova, G. V. Zhukova, O. S. Sutormin, V. A. Kratasyuk // Biophysics. – 2024. – V. 69, N 3. – P. 575–583.

195. Streckfus C. Saliva as a diagnostic fluid / C. Streckfus, L. Bigler // Oral Diseases. – 2002. – V. 8, N 2. – P. 69–76.
196. Tabak L. A. Point-of-care diagnostics enter the mouth / L. A. Tabak // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2007. – V. 1098. – P. 7–14.
197. Tan E. M. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system / E. M. Tan, J. Zhang // Immunological Reviews. – 2008. – V. 222, N 1. – P. 328–340.
198. Tan H. T. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection / H. T. Tan, J. Low, S. G. Lim, M. C. M. Chung // The FEBS Journal. – 2009. – V. 276, N 23. – P. 6880–6904.
199. Tartaglia G. M. Antioxidant capacity of human saliva and periodontal screening assessment in healthy adults / G. M. Tartaglia, N. Gagliano, L. Zarbin, G. Tolomeo, C. Sforza // Archives of Oral Biology. – 2017. – V. 78. – P. 34–38.
200. Teruya T. Human age-declined saliva metabolic markers determined by LC-MS / T. Teruya, H. Goga, M. Yanagida // Scientific Reports. – 2021. – V. 11, N 1. – P. 18135.
201. Thomadaki K. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics / K. Thomadaki, E. J. Helmerhorst, N. Tian, X. Sun, W. L. Siqueira, D. R. Walt, F. G. Oppenheim // Journal of Dental Research. – 2011. – V. 90, N 11. – P. 1325–1330.
202. Topkas E. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of proteins / E. Topkas, P. Keith, G. Dimeski, J. Cooper-White, C. Punyadeera // Clinica Chimica Acta. – 2012. – V. 413, N 13-14. – P. 1066–1070.
203. Veerman E. C. I. Saliva: Secretion and Functions / E. C. I. Veerman, A. V. Nieuw Amerongen, A. Vissink // Oral Biochemistry / ed. by A. V. Nieuw Amerongen, E. C. I. Veerman. – Berlin: Springer, 2008. – P. 11–28.
204. Vengerova N. N. Aerobic abilities of young women organism as an indicator of their exercise performance / N. N. Vengerova // Uchenye Zapiski. – 2009. – N 5 (51). – P. 27–31.

205. Veronesi F. Gene Expression in Osteolysis: Review on the Identification of Altered Molecular Pathways in Preclinical and Clinical Studies / F. Veronesi, M. Tschan, M. Fini // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – V. 18, N 3. – P. 499.
206. Vetrova E. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. Vetrova, E. Esimbekova, N. Remmel, S. Kotova, N. Beloskov, V. Kratasyuk, I. Gitelson // Luminescence. – 2007. – V. 22, N 3. – P. 206–214.
207. Vetter C. Night shift work, genetic risk, and type 2 diabetes in the UK Biobank / C. Vetter, H. S. Dashti, J. M. Lane // Diabetes Care. – 2018. – V. 41, N 4. – P. 762–769.
208. Weisshaar D. Enzymatische Cholesterinbestimmung: Norm-(Referenz-) Bereiche / D. Weisshaar // Medizinische Welt. – 1975. – V. 26, N 19. – P. 940–944.
209. Wong D. T. Salivary diagnostics: scientific and clinical frontiers / D. T. Wong // Journal of Dental Research. – 2011. – V. 90, N 4. – P. 115–118.
210. Yao Y. An electrochemiluminescence cloth-based biosensor with smartphone-based imaging for detection of lactate in saliva / Y. Yao, H. Li, D. Wang, C. Liu, C. Zhang // Analyst. – 2017. – V. 142, N 19. – P. 3715–3724.
211. Yeh L. The Effect of Stress Coping Techniques in Sports / L. Yeh // Claremont McKenna College Senior Theses. – 2016. – P. 45.
212. Zarrin P. S. In-Vitro Classification of Saliva Samples of COPD Patients and Healthy Controls Using Machine Learning Tools / P. S. Zarrin, N. Roeckendorf, C. Wenger // IEEE Access. – 2020. – V. 8. – P. 168053–168060.
213. Zhukova G.V. Bioluminescent-Triple-Enzyme-Based Biosensor with Lactate Dehydrogenase for Non-Invasive Training Load Monitoring (Активность трехферментной биолюминесцентной системы в присутствии концентрации лактата в слюне: перспективы разработки неинвазивного биосенсора для мониторинга тренировочной нагрузки) / G.V. Zhukova, O.S. Sutormin, I.E. Sukovataya, N.V. Maznyak, V.A. Kratasyuk // Sensors. – 2023. – V. 23(5) – P. 2865.

214. Zhukova G. V. Comprehensive assessment of the health of young people living in the far north / G. V. Zhukova, O. A. Kolenchukova, L. V. Stepanova, E. M. Ryzhikova, V. A. Kratasyuk // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. – 2022. – V. 14, N 5. – P. 226–245.
215. Zhukova G. V. Prediction of Professional Success of Employees under Stress: A New Approach / G. V. Zhukova, O. S. Sutormin, L. V. Stepanova, V. A. Kratasyuk // Human Physiology. – 2024. – V. 50, N 5. – P. 515–520.
216. Zhukova G.V. Random Forest method for interpreting results obtained by bioluminescence analysis of saliva in personalized diagnostics / G.V. Zhukova, P.A. Martyshuk, E.R. Afer, A.N. Shubaev, N.A. Rozanova, D.V. Sergeev, V.A. Kratasyuk // Health Risk Analysis. – 2025. –V. 2. – P. 166–174.
217. Wang-Kechik N. H. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) analysis in determining the saliva protein of orthodontic patients during retention phase / N. H. Wang-Kechik, R. Ahmad, S. R. Doustjalali, N. S. Sabet, A. N. Abd-Rahman // Journal of Clinical and Experimental Dentistry. – 2019. – V. 11, N 3. – P. 269–274.
218. Hellriegel K. P. Advanced non-small-cell lung cancer. The significance of personalized therapy / K. P. Hellriegel // Siberian Medical Review. – 2017. – N 6 (108). – P. 5–13.