

На правах рукописи



Жукова Галина Викторовна

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

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Красноярск – 2026

Работа выполнена на кафедре биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск.

Научный руководитель: **Кратасюк Валентина Александровна,**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Базарный Владимир Викторович,**
доктор медицинских наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России), главный научный сотрудник отдела общей патологии Центральной научно-исследовательской лаборатории

Ломакина Галина Юрьевна,
кандидат химических наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н. Ф. Измерова» (ФГБНУ «НИИ МТ»)

Защита диссертации состоится «14» апреля 2026 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте <https://www.ibp.ru/diser/diser.php>

Автореферат разослан «___» февраля 2026 года

Учёный секретарь
диссертационного совета



Дементьев Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Известно о наличии связи между уровнем стресса и содержанием определенных биомаркеров в слюне (Marvin et al. 2017), таких как концентрация кортизола и активность α -амилазы (Henckens et al., 2016; Birditt et al., 2018), а также изменением ионного или биохимического состава слюны (Сарф и Бельская, 2023; Bel'skaya et al., 2017). Так, повышенная активность α -амилазы при физических и умственных перегрузках коррелирует с повышением содержания катехоламинов (норадреналина или адреналина) (Briguglio G., 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 вышперечисленные 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 неблагоприятной ситуации и указывающих на необходимость анализа с использованием комплекса вышперечисленных лабораторных методов для выяснения причин неблагополучия.

Для создания такого экспрессного метода оценки состояния организма человека в качестве прототипа предлагается использовать платформенную технологию билюминесцентного 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 загрязнителей 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 и задачи исследования:

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

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

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 персонифицированных 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 персонифицированного экспрессного неинвазивного теста для оценки физиологического состояния организма человека.

Научная новизна. Предложен новый подход к разработке экспрессных интегральных биолюминесцентных ферментных биотестов для персонифицированного мониторинга нормального и отклоняющегося от нормы состояния организма человека. Создана база данных и адаптирована информационная платформа Multiforms для экспрессного анкетирования, сбора и анализа персонифицированных 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 конъюгаты, основание Шиффа),

органического состава (лактат, глюкоза, каталаза, мочеви́на, общий белок), водородного показателя рН.

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.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Степень ингибирования интенсивности свечения биферментной 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 конъюгаты, основание Шиффа), органических компонентов (лактат, глюкоза, каталаза, мочеви́на, общий белок), водородного показателя рН.

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

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

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 подтверждаются 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 (Me) и интерквартильных интервалов (C25 и C75). Кластерный анализ проведен методом K-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 года, Красноярск); Междисциплинарной конференции молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXVII) (Красноярск 10 апреля 2024), III отчетная конференция 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 г.); 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 «Перспективны – 2022», посвященной Международному году фундаментальных наук в интересах устойчивого развития (Красноярск, 25-30 апреля 2022 г.); Международном биолюминесцентном семинаре СФУ под руководством профессора О. Шимомуры и академика ИИ. Гительзона (Красноярск, 13-14 июня 2012 г.); Международной Рап-REC конференции «Российские университеты: эволюция и реформы» (Ярославль, 20-21 сентября 2012, г.); семинарах лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета (Красноярск 2013-2024), XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективны – 2024», (Красноярск, 25-30 апреля 2024 г.)

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; получен 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор видов стресса, современных методов саливадиагностики и методы определения стрессовых состояний организма человека, отражены их преимущества и недостатки. Обоснован выбор биолюминесцентной биферментной системы Л+Р для метода оценки влияния слюны на биолюминесценцию. Рассмотрены характеристики и состав смешанной слюны как сложной многокомпонентной системы. Проанализированы перспективы использования смешанной слюны для диагностики. Обоснована актуальность и необходимость разработки научных основ для создания экспрессной персонифицированной биолюминесцентной ферментной технологии мониторинга физиологического состояния организма человека по слюнной жидкости.

В главе 2 описаны материалы, объекты и методы исследования.

Для разработки ферментативной диагностической системы были исследованы образцы смешанной слюны (n=769): специалистов оперативно-диспетчерского состава Красноярской железной дороги-филиала ОАО «РЖД» (n=310), спортсменов разной квалификации (n=336), студентов университета г. Красноярска (n=123). Предварительно данные об участниках испытаний были обезличены, от каждого испытуемого получено информированное согласие на обработку данных и добровольное участие в эксперименте. Сбор биоматериала (слюна) производился натошак или через час после приема пищи, самостоятельно – участниками эксперимента, путем свободного сплевывания в пластиковую стерильную пробирку посредством пассивного слюноотделения без дополнительной стимуляции до и после нагрузки.

В работе использовали лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов (КРАБ), изготовленный в Лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск), содержащий 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*); препарат L-лактатдегидрогеназы из мышц кролика (тип XI) (Sigma Aldrich, Германия).

Для проведения биолюминесцентного анализа *in vitro* в качестве тест-объекта применяется биферментная система НАДН:ФМН -оксидоредуктаза-люцифераза (Р+Л) (реакции 1 и 2) (Жукова Г. В. и др., 2024).

Р



Л



Оценку ингибирующего действия слюнной жидкости на активность биферментной системы Р+Л проводили в присутствии образцов слюны по величине максимальной интенсивности свечения согласно разработанной методике. Показателем влияния слюны на активность биферментной Р+Л системы была остаточная интенсивность свечения, которую рассчитывали, как отношение максимальной интенсивности свечения в присутствии слюны к контрольному (ЛИ %). Измерение свечения проводили на планшетном люминометре TriStar LB 941 (TriStar LB 941, Германия) и кюветном люминометре («PromegaGloMax» 20/20 Luminometer, USA).

В качестве альтернативных методов определения компонентного состава и диагностируемых показателей слюнной жидкости были использованы стандартизированные методы определения компонентного состава (Жукова и др., 2024; Степанова и др., 2024; Zhukova et al., 2022; Kratasyuk et al., 2020). Для анализа использовались анкетные данные и карты медицинского обследования. Результаты медицинских осмотров, содержащие общеклинические

анализы крови и мочи и другие терапевтические показатели здоровья, были предоставлены ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД- медицина».

Статистическая обработка имеющихся данных была проведена в программе Statistica StatSoft, США) с использованием методов корреляции Спирмена и Утеста Манна-Уитни (Бельская и др. 2018), а также машинным обучением на задачах классификации и регрессии методом Random Forest (Жукова и др. 2025).

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики и одобрены локальным этическим комитетом Сибирского федерального университета (г. Красноярск, протокол № 5 от 11.11.2019 года).

Глава 3 разработка технологии мониторинга физиологического состояния организма человека на основе биолюминесцентного метода. 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.

3.1 Проведение специфического метода определения лактата в слюне

Одним из распространенных методов оценки мышечных перегрузок принято использовать метод оценки содержания молочной кислоты (лактат) в крови испытуемых. Данный метод применим для объективной количественной оценки уровня анаэробной метаболической нагрузки на организм во время и после физической нагрузки. По концентрации лактата в крови можно судить о том, насколько интенсивно работали мышцы и перешли ли они в анаэробный режим энергообеспечения. Это позволяет точно определить пороги аэробной и анаэробной производительности и оптимизировать тренировочные нагрузки. Более простой альтернативой для мониторинга физиологического состояния в режиме реального времени является оценка лактата в слюне. Поэтому была выявлена возможность измерения лактата в слюне с помощью системы биолюминесцентного тестирования. Для определения влияния лактата была исследована полиферментная система лактатдегидрогеназа- НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза (ЛДГ + Р + Л) которая представляет из себя сопряженную систему, состоящую из трех ферментов. В результате первой реакции происходит восстановление окисленной формы НАД⁺ до НАДН благодаря лактатдегидрогеназе, которая впоследствии используется люциферазой. Таким образом, по изменению свечения системы можно оценить степень воздействия на каждый из тех ферментов. В частности, в данной работе оценивался вклад лактатдегидрогеназы, который выступал окислителем НАД⁺ до НАДН. Получаемый в результате такой реакции квант света обладает малой интенсивностью и поэтому при увеличении концентрации лактата происходит 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, 1992; Тарасенко, 2008). На основе полученных точек, для каждой концентрации построен калибровочный график зависимости интенсивности свечения от различных концентраций лактата.

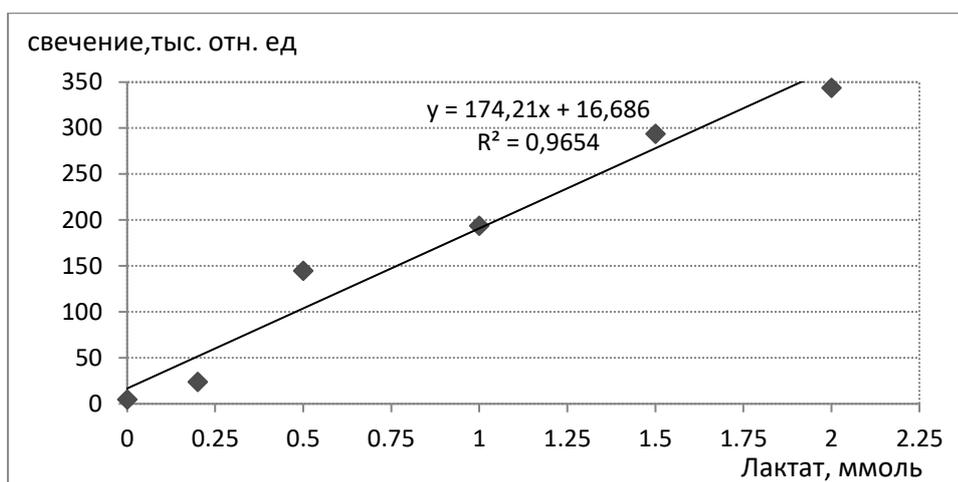


Рисунок 1 – Зависимость свечения триферментной системы ЛДГ + Р + Л от концентрации лактата. За точку ноль используется уровень свечения триферментной системы без добавления главного исследуемого субстрата – молочной кислоты. Данная точка дает возможность абстрагироваться от влияния базовых компонентов системы

Чтобы избежать влияния других компонентов слюны на триферментную систему ЛДГ + Р + Л, был высчитан коэффициент ингибирования слюны. Для этого регистрировалось свечение триферментной 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 зависимости свечения от концентрации лактата.

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.

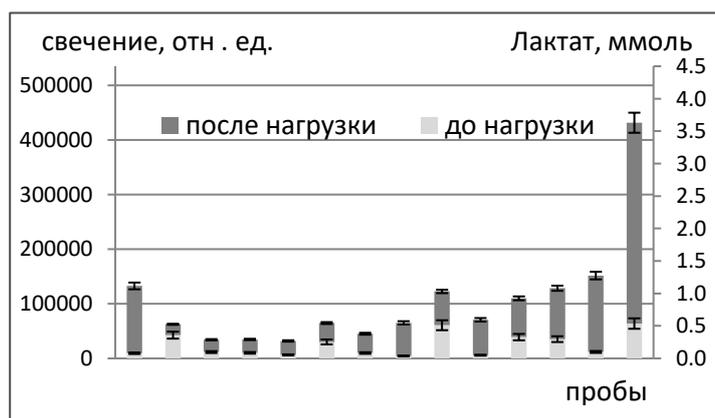


Рисунок 2 – Влияние слюны до и после нагрузки на систему ЛДГ + Р + Л в зависимости от количества лактата. Где ОХ - участники, участвующие в эксперименте

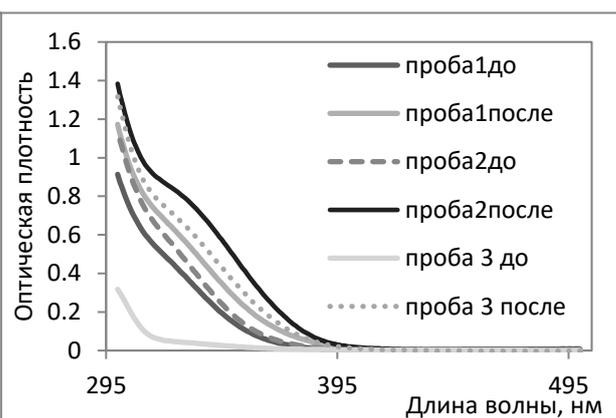


Рисунок 3 – Спектры поглощения проб слюны

Уровень концентрации лактата, соответствующий уровню свечения системы, в каждом случае определялся по калибровочному графику (рисунок 1). В качестве альтернативного метода

определения концентрации лактата в слюне, был использован колориметрический метод Баркера и Саммерсона. Были изучены спектры поглощения проб слюны до добавления к ним лактатдегидрогеназы и после добавления ЛДГ, с целью определения концентраций лактата содержащихся в слюне. Для экспериментальных спектров, полученных в данной работе, величина оптической плотности D340 до добавления ЛДГ в пробу составляет 0,03-0,3, а после добавления ЛДГ величина оптической плотности составляет 0,5-0,65. Исследуемые пробы слюны также были исследованы с использованием трехферментной системы ЛДГ + Р + Л. Показано, что значения интенсивности свечения триферментной системы могут быть рассчитаны в соответствии с концентрациями лактата, зарегистрированными в образцах слюны.

Исследуемые пробы слюны также были протестированы с использованием трехферментной системы ЛДГ + Р + Л. Показано, что значения интенсивности свечения триферментной системы могут быть рассчитаны в соответствии с концентрациями лактата, зарегистрированными в образцах слюны.

Таблица 1 – Концентрации лактата в слюне полученные колориметрическим 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

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. (Zhukova, 2023).

3.2 Интегральный биолюминесцентный ферментный биотест

Для выявления закономерности влияния слюнной жидкости на сигнал ферментативной системы были исследованы: физическая, умственная и трудовая нагрузка

Влияние физической нагрузки на показатели биолюминесцентного тестирования слюны
Для выявления факта влияния физической нагрузки на биолюминесцентную систему Л+Р были сформированы три группы испытуемых: спортсмены с квалификацией мастера спорта (МС), спортсмены с квалификацией кандидата в мастера спорта (КМС) и контрольная группа (студенты без специальной спортивной подготовки). Такое разделение на группы позволило оценить адаптационные возможности организма спортсмена к систематическим физическим нагрузкам различной степени интенсивности.

Было показано, что величина ингибирования биолюминесцентного свечения тест-системы зависела от уровня тренированности спортсмена, чем выше квалификация спортсмена, тем меньше ингибирование свечения биолюминесцентной тест-системы (рисунок 4). Уровень ингибирования свечения ферментативной системы для слюны спортсменов квалификации МС и КМС до тренировки и после практически не меняются благодаря их адаптированности к

предлагаемой нагрузке. Для группы нетренированных студентов наблюдаются существенные различия в результатах биотеста до и после нагрузки. Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности мониторинга физической нагрузки билюминесцентным методом благодаря изменению состава метаболитов слюны при физическом напряжении.

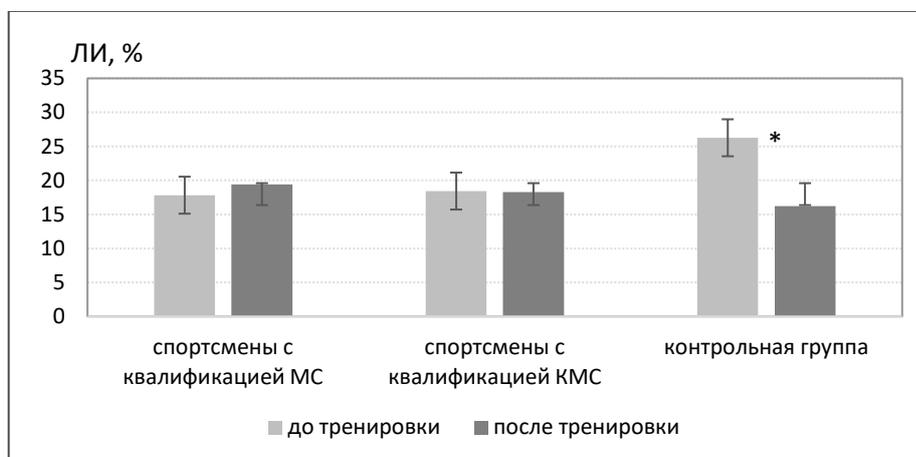


Рисунок 4 – Влияние квалификации спортсменов на результаты билюминесцентного ферментного биотеста до и после тренировок. *- достоверность различий между показателями контрольной группы и спортсменов квалификации МС и КМС при $p \leq 0,05$

Для подтверждения степени тяжести физической нагрузки были проведены стандартные исследования функционального состояния организма человека: ЧСС в покое и после тренировки, ортостатическая проба и форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) (таблица 2).

Таблица 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 $p \leq 0,05$

Влияние умственной нагрузки на показатели билюминесцентного тестирования слюны
 Для подтверждения гипотезы влияния «умственной» нагрузки на характер сигнала в форме остаточного свечения билюминесцентной ферментативной системы Л+Р выбрана группа студентов юношеского возраста (18–20 лет). Протестирована слюна до сессии (состояние покоя) и во время сессии (умственное напряжение).

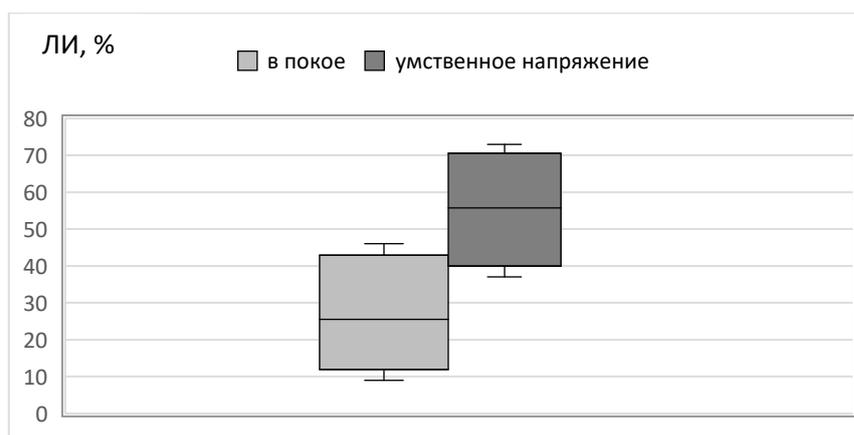


Рисунок 5 – Остаточное свечение биферментной биолуминесцентной системы в присутствии слюны представителей юношеского возраста до и после стрессовой нагрузки. Достоверность при $p \leq 0,05$

В контроле (до нагрузки) ингибирование свечения ферментативной системы P+Л для образцов слюны студентов до сессии составило 25,5 %, после сессии этот показатель достоверно возрастает до 55,7 % ($p < 0,05$). Оценка стрессоэмоционального состояния в состоянии покоя общепринятыми специализированными психологическими тестами показала, что стрессоустойчивость студенческой молодежи характеризуется низким уровнем тревожности, но с умеренной чувствительностью к ситуативной и личной тревожности. После умственного напряжения тревожность достоверно повышалась до средних показателей за счет возрастания ситуационной тревожности (таблица 3).

Таблица 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)
Контроль (до сессии)	30	45	11
Умственное напряжение	39*	39*	12

Примечание *- достоверное различие при ($p \leq 0,05$)

Таким образом, было показано, что биолуминесцентный ферментативный биотест (Л+Р) реагирует на изменения состава слюнной жидкости, вызванной умственным напряжением. Эти результаты согласуются с литературными данными (Павлова М. М. и др., 2019) о дифференцированном влиянии различных стрессоров на биохимический состав слюны и расширяют представления о возможностях использования биолуминесцентных методов для оценки стресс-индуцированных изменений в биологических жидкостях.

Влияние трудовой нагрузки на показатели биолуминесцентного тестирования слюны
Полученные результаты стали основой для создания метода оценки перегрузок в условиях рабочей трудовой смены. Исследования проводили на примере работников оперативно-диспетчерского состава Красноярской железной дороги (филиал ОАО "РЖД"), трудовая активность которых характеризовалась высокой психоэмоциональной нагрузкой, сменным характером работы, повышенной концентрацией внимания, напряженными условиями труда.

Для выявления факторов, влияющих на результаты анализ, было проведено анкетирование работников по самооценке состояния организма, включающее информацию о вредных привычках, режиме питания, стаже работы, самооценке стрессового состояния. На основании анкет и результатов медицинских осмотров работники были поделены на 2 группы. Первую группу составляли работники преимущественно без вредных привычек, имеющие стаж работы более 10 лет и показатели медицинского осмотра, соответствующие нормам здорового человека. Участниками второй группы стали работники, имеющие разный стаж работы, отклонения в показателях медицинского осмотра и вредные привычки.

По результатам 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 работников первой подгруппы характерно устойчивое повышение уровня остаточного свечения после рабочего дня, тогда как для обследуемых второй подгруппы характерно устойчивое понижение величины остаточного свечения после рабочего дня. Измерение концентрации лактата в слюне участников первой группы показало отсутствие физических перегрузок или усталости. 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 (Реммель и др. 2003). Важным было получение стабильного ответа показателя на стрессовую нагрузку.

При исследовании влияния слюны испытуемых второй группы на активность P + L системы было выявлено как повышение, так и понижение величины остаточного свечения биферментной биолюминесцентной P + L системы после трудового дня. При этом содержание лактата в слюне уменьшалось после рабочей смены во всех изученных случаях, что свидетельствовало о наличии физических перегрузок организма. Такая неустойчивая реакция биотеста 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 третьей группы к группе риска, так как организм испытуемых не был адаптирован по разным причинам (стаж работы, режим дня, заболевания) к трудовым нагрузкам.

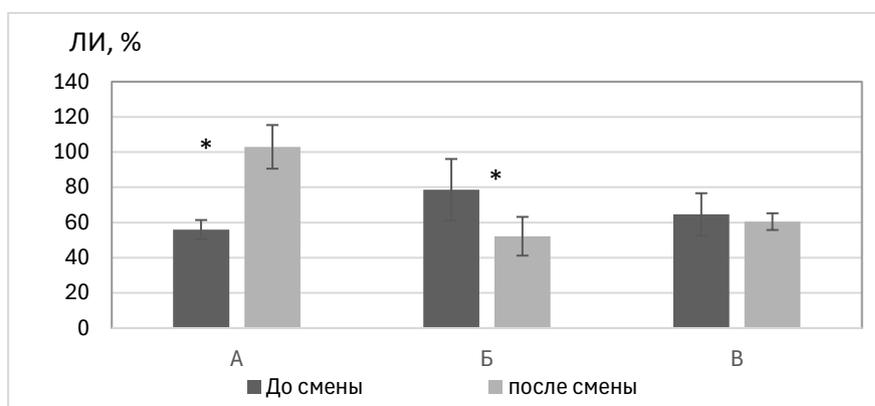


Рисунок 6 – Изменение биолюминесцентного индекса слюны при тестировании рабочей нагрузки сотрудников диспетчерского состава. Усредненные показатели. (А–первая группа, Б– вторая группа, В- третья группа). *- достоверность различий между показателями до и после смены при $p \leq 0,05$

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

3.3 Выявление факторов, влияющих на вариабельность состава слюны

Для установление корреляционных взаимосвязей между результатами билюминесцентного теста и индивидуальной реакцией организма человека на нагрузку при исследовании групп людей с разными типами и уровнями нагрузок был выявлен ряд различных факторов жизнедеятельности и индивидуальных показателей организма, существенно влияющих на результаты анализа. Ранее было показано, что уровень остаточного свечения билюминесцентной реакции зависит от содержания микроэлементов в слюне (Троегубова, 2013). Для оценки изменения содержания микроэлементов в слюне спортсменов под влиянием аэробной и анаэробной нагрузки изучали слюну этих спортсменов до и после тренировки методом атомно-абсорбционной спектрометрии (таблица 4).

Таблица 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 ± 0,001
Fe, мг/л	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,07	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

Примечание *- достоверное различие при ($p < 0,05$), по отношению к пробе до нагрузки.

Выявлено снижение концентрации Cu и Zn после тренировки в обеих группах ($P < 0,05$). Однако у спортсменов при аэробной нагрузке концентрация Cu, Mn, Zn снижалась меньше, чем у спортсменов с анаэробной нагрузкой. Концентрации Mn и Fe имеют незначительные изменения после тренировки. При исследовании концентраций K, Na, Mg, Ca наблюдалось преимущественно уменьшение концентраций после физической нагрузки (Kratasyuk, 2020). Таким образом, было показано, что реакция ферментного биотеста на слюну зависит от содержания в слюне металлов, и отличается для спортсменов с аэробным и анаэробным типом нагрузки.

Для выявления наиболее значимых факторов, влияющих на результаты билюминесцентного анализа, были проанализированы данные из медицинских карт исследуемых, биохимические показатели крови, слюны и данные из специально разработанных анкет, включающие субъективную оценку стресса и работоспособности до и после смены,

информацию о режиме дня, потребления пищи, лекарственных средств, энергетических напитков и табака.

На основе этих результатов сформирована база данных, которая позволила установить взаимосвязь показателей слюны, биохимических и анкетных данных испытуемых. Для анализа была принята гипотеза о том, что распределение полученных данных не является нормальным. Анализ проводился на общей выборке с определением факторов, влияющих на тестирование (Р+Л). Субъективные оценки испытуемыми своих должностных обязанностей и их отношения к ним тоже являлись факторами, которые оказывали значительное влияние на результаты анализа.

Показано, что прогностическими критериями и биомаркерами состояния организма участников под влиянием трудовых нагрузок может быть изменение биолюминесцентного показателя для слюны, коррелирующего с разницей в концентрации лактата в слюне ($r = -0,6$) при $p=0,05$ (разница концентрации лактата повышена при пониженном биолюминесцентном показателе и наоборот), с отклонением в весе ($r = -0,6$) при $p=0,05$ (биолюминесцентный показатель понижен для участников с повышенным индексом массы тела, вследствие высокой концентрации холестерина и глюкозы (Arakawa et al., 2020)). При этом в слюне участников при трудовой нагрузке понижена концентрация мочевины ($r = 0,9$) за счет денатурации белков (Soni et al., 2018), снижается интенсивность 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 ($r = -0,8$) из-за нарушения кислотно-щелочного баланса организма, вызванного наличием вредных привычек, в частности, курения.

Для участников, отнесенных к группе риска частое употребление кофейных напитков связано обратной зависимостью со стажем работы ($r = -0,5$), степенью утомления ($r = 0,5$) и волнением ($r = -0,5$), а также понижением концентрации натрия в слюне ($r = -0,9$).

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.

Таблица 5 – Корреляция между ЛИ% и факторами, изменяющимися под влиянием трудовых нагрузок. Уровень статистической значимости считали достоверными при $p \leq 0,05$

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	$r = 0,671$

Маркеры слюны		Анкетные данные		Маркеры крови	
Мочевина	$r = 0,9$	За сколько курили до сдачи пробы	$r = -0,699$	Глюкоза	$r=0,47$
Концентрации нитратов	$r = -0,8$	курение	$r = -0,8$	нейтрофилы	$r<0,05$
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	$r = -0,02$	тромбоциты	$r<0,05$

Приведенные значения коэффициентов корреляции 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. Тест Манна-Уитни не подтвердил гипотезу отличия 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 биоломинесцентного 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.

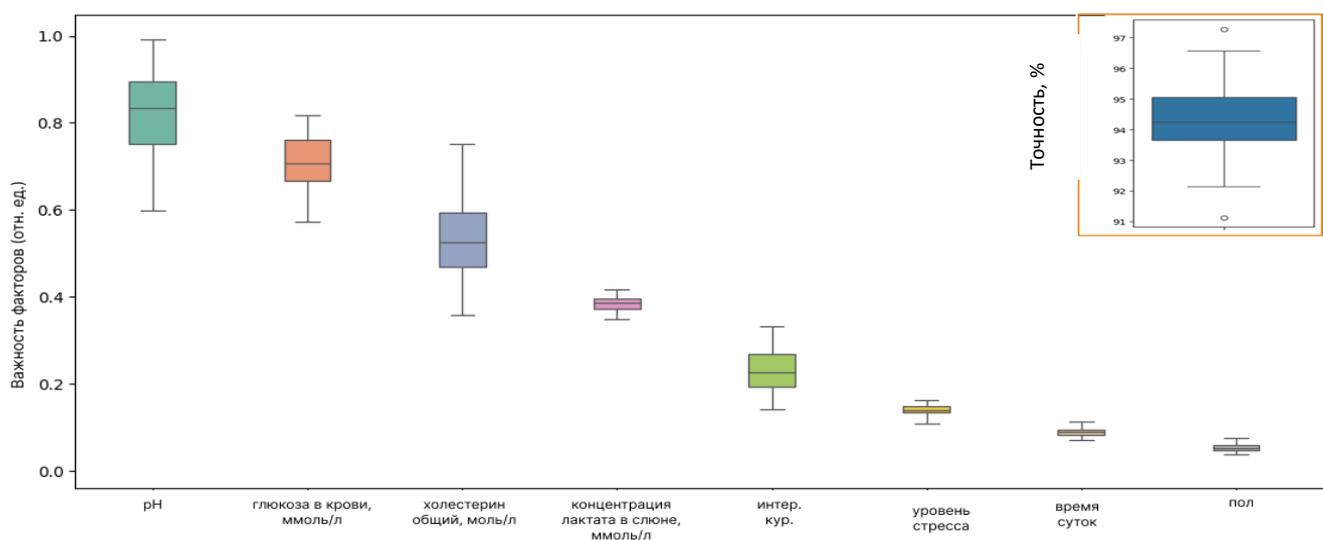


Рисунок 7 – Распределение факторов по уровню влияния на ЛИ% (*- статистическая значимость различий между признаками ($p < 0,05$))

С помощью регрессионного алгоритма машинного обучения Random Forest было получено ранжирование факторов по уровню влияния на ЛИ%. Среднее значение метрик обучения составило: MAE = 28,73; MS = 880,99; $R^2 = 0,175$. Наибольшее влияние оказывают уровень глюкозы в крови, рН, уровень лактата в слюне, уровень холестерина в крови. Такое распределение факторов по уровню значимости позволяет понять какие факторы нужно учитывать при оценке состояния организма с помощью биOLUMИнесцентного метода тестирования. С помощью классификационного алгоритма случайного леса был предсказан уровень стресса работников РЖД. Алгоритм был проведен в размере 100 повторений, что позволило понять разброс точности и значимости факторов.

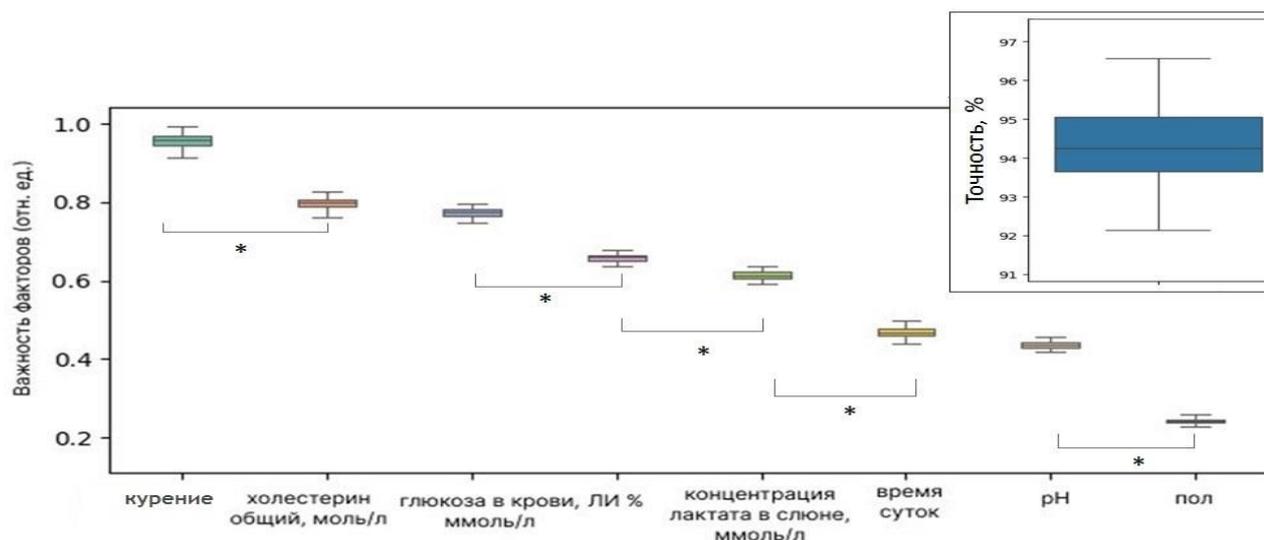


Рисунок 8 – Распределение факторов по уровню влияния на целевое значение (уровень стрессового состояния работника) методом Случайного леса (Random Forest). Значимость фактора указана в условных единицах программы. Значимость рассчитана по коэффициенту Джини

Из диаграммы видно, что наиболее значимыми факторами являются интервал между курением и забором пробы, уровни холестерина и глюкозы в крови, ЛИ %. Стоит отметить разную важность фактора курения. Если сам факт курит ли 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 в слюне.

Таким образом, был проведен анализ данных методом Random Forest, так как они имеют достаточную мощность для анализа больших табличных данных и позволяют оценить влияние различных факторов на результат. Было получено распределение факторов по уровню влияния (рН, 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 физиологического состояния организма человека. Еще одной важной задачей, решаемой таким образом, является минимизация факторов, необходимых для составления «калибровки» паспорта здоровья.

3.4. Разработка программы сбора и анализа персонифицированных данных с использованием платформы Multiforms

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 А.В., 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 регистрацию и заполнить поля, проставив «галочки» в желаемых окошках. Соответственно, в этой же программе испытуемый может увидеть результат своего исследования. Электронная анкета обеспечивает анонимность, так как персональные данные можно 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 анализа (рис.6).

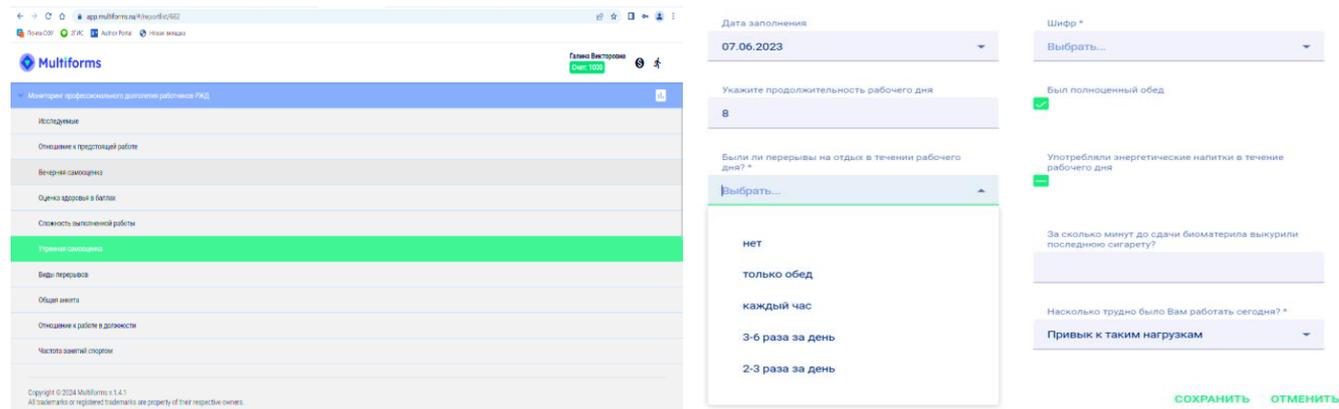


Рисунок 9 - Внешний вид программы по сбору информации

В электронную платформу включена следующая информация: медицинские карты, результаты лабораторных исследований проб слюны, утренние и вечерние анкеты испытуемых. Медицинские карты содержат 54 параметра, характеризующих здоровье испытуемых. Лабораторные исследования проб слюны включают кислотно-щелочной показатель; концентрацию лактата; ЛИ%, кортизол в слюне. Утренняя и вечерняя анкета содержат по 10 вопросов. Прогноз уровня стресса на основе внесенных в систему данных рассчитывается на основе предобученной по алгоритму Random Forest модели. Механизм реализации прогноза предполагает предоставление доступа к накопленным в Системе данным в режиме обновляемого набора данных (дата сета), 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.

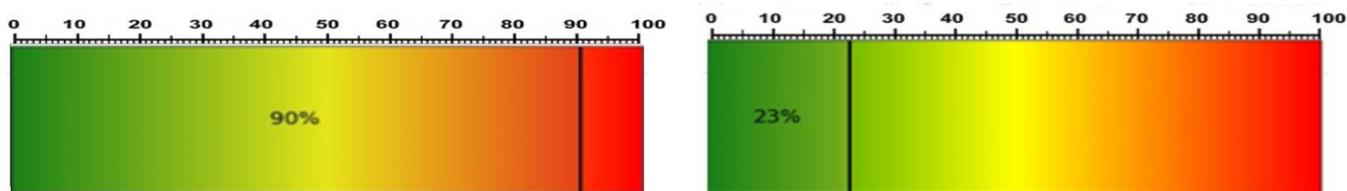


Рисунок 10 – Диаграмма, отображающая расчетное прогнозное значение уровня нагрузки. Где: 0%- отсутствие стрессового состояния; 25%- Умеренный уровень стресса. Здоровое напряжение; 50%- Пик профессионального напряжения; 75%- Повышенный уровень стресса (перегрузка, усталость, потеря концентрации), 100% - Высокий уровень стресса (появление сильной тревожности, развития заболеваний, профессиональное выгорание)

Открытый код программы подразумевает возможность включения в базу данных различных образцов слюны, необходимых для дальнейшего анализа, возможность дообучения модели на новых данных, а также корректировки анкетных данных и других изменений. 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

Выбор условий для проведения анализа

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 биолюцинометров –кюветного и планшетного (Таблица 5) таким образом, чтобы интенсивность свечения, чувствительность к образцам слюны и повторяемость результатов была одинаковой для разных приборов.

Таблица 6 – Результаты подбора реакционной смеси для проведения биолюминесцентного анализа слюнной жидкости на планшетном и кюветном биолюцинометрах

Компоненты реакционной смеси	Кюветный люцинометр Turner 20/20n BioSystems, США	Планшетный люцинометр TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader
Фосфатный буфер	300 мкл 0,25 М, рН 6,8	80 мкл 0,25 М, рН 6,8
Смесь ферментов Л+Р	5мкл	5мкл
Водный раствор альдегида	50 мкл 0,0025%	10 мкл 0,0032%
Раствор ФМН	10 мкл $5,4 \times 10^{-4}$ М	10 мкл $1,6 \times 10^{-4}$ М
Раствор НАДН	100 мкл 4×10^{-4} М	30 мкл 7×10^{-5} М
Слюнная жидкость	50 мкл	20 мкл

Регламент проведения измерений включал в себя этапы сбора биоматериала и пробоподготовки. Была показана необходимость проведения сбора слюны натошак или через час после приема еды. Отбор проб слюны должен осуществляться 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, включая центрифугирование для удаления клеточного дебриса, муцина и других крупных молекул и частиц (Савинов и др. 2016, 2022). Нами было показано, что в результате центрифугирования влияние проб на интенсивность свечения незначительно повышается практически во всех исследуемых нами пробах, поэтому этап центрифугирования можно из методики исключить, особенно для случая индивидуального датчика. В лабораторных условиях этап центрифугирования следует оставить, так как уменьшается вязкость слюны, удаляются остатки пищи, что снижает вероятность ошибки. Собранные образцы центрифугируют 10 минут при 5000 оборотах/мин, для анализа используется надосадочная жидкость.

Были изучены условия сохранения проб слюнной жидкости, как важная часть разрабатываемой технологии, так как сбор биологического материала проходит за пределами лаборатории, проведение анализа не всегда возможно в месте сбора. Было показано, что влияние образцов слюны уменьшается на 50% после 4 часов хранения при температуре 24-26°C и после 24 часов при 6-8°C. При замораживании и хранении в течение 1 года при (-18) -(-20)°C состояние проб не изменяется.

Транспортировку проб слюны необходимо осуществлять в специальном контейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре 2-8°C. Рекомендуется сохранение образцов слюны после сбора при температуре 6-8°C не более 24 часов, при замораживании и хранении при -20°C – до 1 года. Допускается только однократное замораживание-размораживание материала.

Регламент проведения технологии мониторинга физиологического состояния организма человека

На основе проведенных экспериментов, с помощью биолюминесцентного ферментного биотеста, была разработана сигнальная система мониторинга организма человека, включающая:

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 P + L 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.

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

Определение контрольного диапазона для билюминесцентного 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). Неинвазивный интегральный билюминесцентный анализ слюны может быть использован для выявления группы риска работников, у которых обнаружено изменение билюминесцентного показателя во время трудовой смены. Это является сигналом неблагоприятного состояния организма (воспалительные заболевания, нарушение режима дня и питания, стрессовые эмоциональные или физические перегрузки во вне рабочее время и т. п.). Применение билюминесцентного 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.

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.

На основе проведенного исследования были сделаны следующие **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 билюминесцентной 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 конъюгаты, основание Шиффа), органического состава (лактат, глюкоза, каталаза, мочевины, общий белок) и рН. На результаты анализа влияют заболевания, режим дня, курение, пол.

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

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

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. **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. Shuvaev, N.A. Rozanova, D.V. Sergeev, V.A. Kratasyuk // Health Risk Analysis. – 2025. – Vol. 2. – P. 166–174. (**Жукова Г.В.** Метод Random Forest в задачах интерпретации результатов

билюминесцентного анализа слюны при персонализированной диагностике/ **Г.В. Жукова**, П.А. Мартышук, Е.Р. Афер, А.Н. Шуваев, Н. А. Розанова, Д.В. Сергеев, В.А. Кратасюк // Анализ риска здоровью. – 2025. – № 2. – С.166–174) (**УБС1, Q3**)

2. **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. – Vol. 50. – P.515–520 (**Жукова Г.В.** Прогнозирование профессиональной успешности работника в условиях воздействия трудовых нагрузок: новый подход/ **Г.В. Жукова**, О.С. Сутормин, Л.В. Степанова и В.А. Кратасюк // Физиология человека. – 2024. – Т.50, №5 – С.87-94) (**УБС3, Q4**)

3. 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. – Vol. 69 – P.575–583. (Степанова Л. В. Применение билюминесцентного ферментативного биотеста для анализа слюны работников железнодорожного транспорта с целью мониторинга функционального состояния организма в условиях трудовой деятельности/ Л.В. Степанова, О. А. Коленчукова, **Г.В. Жукова**, О.С. Сутормин, В.А. Кратасюк //Биофизика. – 2024. – Т.69, № 3. – С.1–10) (**УБС 3, Q4**)

4. **Zhukova G.V.** Bioluminescent-Triple-Enzyme-Based Biosensor with Lactate Dehydrogenase for Non-Invasive Training Load Monitoring / **G.V. Zhukova**, O.S. Sutormin, I.E. Sukovataya, N.V. Maznyak, V.A. Kratasyuk // Sensors. – 2023. – Vol. 23(5) – P.2865 (**УБС1, Q1**)

5. **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. – Vol.14, №5. – P.226-245 (**Жукова Г.В.** Комплексная оценка здоровья лиц юношеского возраста, проживающих на территории Крайнего Севера/ **Г.В. Жукова**, О.А. Коленчукова, Л.В. Степанова, Е.М. Рыжикова, В.А. Кратасюк// Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. – 2022. – Т.14, №5. – С.226-245) (**УБС2, Q3**)

6. 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. – Vol. 36. No 2. – P.384–390 (**УБС2, Q2**)

7. Stepanova L.V. Of bioluminescent saliva testing in evaluating of physical preparedness of athletes with different qualifications (Использование билюминесцентного тестирования слюны в оценке физической подготовленности спортсменов различной квалификации)/ L.V. Stepanova, A.M. Vyshedko, O.A. Kolenchukova, **G.V. Zhukova**, V.A. Kratasyuk // Siberian medical review. – 2017. – Vol. 6 – P.63-69 (**УБС 2, Q2**)

8. Римацкая Н.В. Билюминесцентный практикум для формирования исследовательской компетенции школьников/ Н.В. Римацкая, О.С. Сутормин, Т. С. Денисова, **Г. В. Иванова (Жукова)**, В.А. Кратасюк // Вестник СибГАУ. – 2012. – № (46) – С.167-170 (**ВАК**)

Патенты и базы данных РФ

1. Патент №2665144 Российская Федерация. Способ определения уровня стрессоустойчивости человека: заявл. №2017106705 от 28.08.17: опубл. 28.08.18 / В.А. Кратасюк, **Г.В. Жукова**, О.А. Коленчукова, Л.В. Степанова, О.С. Сутормин, Е.Н. Есимбекова, Д.В. Гульнов; заявитель СФУ. – 7 с.

2. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025621315 Российская Федерация. Система сбора данных для мониторинга состояния организма работников предприятий РЖД: заявл. № 2025620847 от 14.03.2025: опубл. 24.03.2025/ **Г.В. Жукова**, А.В. Коробко, В.А. Кратасюк; заявитель СФУ. – 3 с.

Тезисы в сборниках материалов конференций

1. Вышедко А.М. Биолюминесцентное тестирование слюны как неинвазивная оценка физических нагрузок спортсмена /А.М. Вышедко, Л. В. Степанова, В.А. Кратасюк, О.С. Сутормин, О.А. Коленчукова, Г.В. Жукова. // Спорт–дорога к миру между народами: Материалы V Международной научно-практической конференции 15–18 октября 2019 г.–М.: РГУФКСМиТ. - 2019. – С.46-52 (РИНЦ)
2. Малышева В.В. Интегральный биолюминесцентный показатель – индикатор физической нагрузки организма спортсмена /В.В. Малышева, Л.В. Степанова, А.М. Вышедко, В.А. Кратасюк, О.А. Коленчукова, Г.В. Жукова. // Всемирные студенческие игры: история, современность и тенденции развития: Материалы I Междунар. науч.-практ. конф. по физической культуре, спорту и туризму. Красноярск, 16–17 сентября 2022 г.: в 2 ч. Ч. 1 / отв. ред. М. А. Ермакова. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2022. – С. 88 (РИНЦ)
3. Stepanova L.V. Saliva as an indicator of mental and physical stress /L.V. Stepanova, V.A. Kratasyuk, O.A. Kolenchukova, G.V. Zhukova, E.M. Ryzhikova. // Материалы международной конференции «Социальный мозг – фокус на эмоции», ФГБОУ ВО КрасГМУ им.проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, 8–9 февраля - 2022. –Vol.2 – P.99 (*Scopus Q3*)
4. Жукова Г.В. Биолюминесцентный метод оценки умственных нагрузок студентов /Г.В. Жукова, В.А.Кратасюк. // Проспект Свободный – 2022: Материалы XVIII Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Красноярск, 25–30 апреля 2022 г. [Электронный ресурс] / отв. за вып. Т.А. Лесняк. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2022. – С.821-824 (РИНЦ)
5. Жукова Г.В. Создание комплексной системы оценки здоровья лиц юношеского возраста, проживающих на территории крайнего севера/ Г.В. Жукова, О. А. Коленчукова, Л.В. Степанова, Е.М. Рыжикова и В.А. Кратасюк. // Материалы III отчетной конференции магистрантов, аспирантов и молодых ученых-грантодержателей Красноярского краевого фонда науки, в рамках съезда советов Молодых ученых и специалистов Енисейской Сибири. 28 октября 2022. – С.61-64 (РИНЦ)
6. Гук П.В. Лактат в слюне - индикатор физической работоспособности спортсмена /Гук П.В., Степанова Л.В., Вышедко А.М., Сутормин О.С., Коленчукова О.А., Жукова Г.В., Кратасюк В.А. // Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России: в 2 томах, том 2 – Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023. – С.211-212 (РИНЦ)
7. Степанова Л.В. Биолюминесцентный анализ слюны для мониторинга утомления организма /Степанова Л.В., Коленчукова О.А., Жукова Г.В. // Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России: в 2 томах, том 1 – Краснодар: Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ», 2023. – С.366–367 (РИНЦ)
8. Зеньков А.В. Применение статистических методов для поиска биологических маркеров профессионального долголетия на основе биолюминесцентного тестирования /А. В. Зеньков, Г.В. Жукова, Е.В. Смирнова, В.А. Кратасюк. // Проспект Свободный – 2023: Материалы XIX Междунар. научной конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Красноярск, 24–29 апреля 2023 г. [Электронный ресурс] / отв. за вып. К.В. Камалова. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2023. – С.1099–1101 (РИНЦ)
9. Степанова Л.В. Биолюминесцентный анализ слюны для оценки функционального состояния организма /Л.В. Степанова, В.А. Кратасюк, О. А. Коленчукова, Г.В. Жукова, // X Съезд Российского фотобиологического общества. Материалы конференции «Современные проблемы фотобиологии». Пушкино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023 – С. 238–239 (РИНЦ)

10. Степанова Л.В. Билюминесцентный анализ слюны работников железнодорожного транспорта для мониторинга состояния организма при трудовой нагрузке /Л.В. Степанова, В.А. Кратасюк, О.А. Коленчукова, **Г.В. Жукова** // X Съезд Российского фотобиологического общества. Материалы конференции «Современные проблемы фотобиологии». Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. — С.240–241 (РИНЦ)
11. Малышева В.В. Интегральный билюминесцентный показатель – индикатор физической нагрузки организма спортсмена /В.В. Малышева, Л.В. Степанова, А.М. Вышедко, В.А. Кратасюк, О.А. Коленчукова, **Г.В. Жукова** // X Съезд Российского фотобиологического общества. Материалы конференции «Современные проблемы фотобиологии». Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. — С.222–223 (РИНЦ)
12. **Жукова Г.В.** Способ неинвазивной диагностики и контроля физической нагрузки спортсменов / **Г.В. Жукова**, В.А. Кратасюк, Н.В. Мазняк // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2024: Материалы XIX международной научной конференции, г. Севастополь, 16–20 сентября 2024 г. – Севастополь, 2024. – С.54-55 (РИНЦ)
13. **Жукова Г.В.** Новый подход в прогнозировании профессиональной пригодности работника железнодорожного транспорта// Материалы междисциплинарной конференции молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXVII) тезисы докладов (Красноярск, 18 апреля 2024 г.) – Красноярск: ИФ СО РАН, 2024. – С.56(РИНЦ)
14. Мартыщук П.А. Использование алгоритмов машинного обучения для определения факторов, влияющих на результаты билюминесцентного тестирования / П.А. Мартыщук, **Г.В. Жукова**, А.Н. Шуваев // Проспект Свободный – 2024: Материалы юбилейной XX Междунар. научной конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Красноярск, 15–20 апреля 2024 г. [Электронный ресурс] / отв. за вып. М. Шухратзода, А.В. Шнайдер, Е. П. Уколова, А. А. Бусыгина, П. А. Ромашов, Д. Г. Щербаков – Красноярск: Сиб. федер. ун-т 2024. – С.135-137 (РИНЦ)
15. Афер Е.Р. Подбор метода обработки данных билюминесцентного анализа / Е.Р. Афер, **Г.В. Жукова** // Проспект Свободный – 2024: Материалы юбилейной XX Междунар. научной конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Красноярск, 15–20 апреля 2024 г. [Электронный ресурс] / отв. за вып. М. Шухратзода, А.В. Шнайдер, Е. П. Уколова, А. А. Бусыгина, П. А. Ромашов, Д. Г. Щербаков – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2024. – С.118-120(РИНЦ)