

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО БИОТЕСТА ДЛЯ АНАЛИЗА СЛЮНЫ РАБОТНИКОВ ЖЕЛЕЗНОДОРОЖНОГО ТРАНСПОРТА С ЦЕЛЬЮ МОНИТОРИНГА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ ТРУДОВОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

© 2024 г. Л.В. Степанова*.,#, О.А. Коленчукова*, **, ***, Г.В. Жукова*, О.С. Сутормин*, ****, В.А. Кратасюк*, *****

*Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

**Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», ул. Партизана Железняка, 3г, Красноярск, 660022, Россия

***Красноярский государственный аграрный университет, просп. Мира, 90, Красноярск, 660049, Россия

****Сургутский государственный университет, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, просп. Ленина, 1, Сургут, 628412, Россия

*****Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

#E-mail: slyudmila@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 09.05.2024 г.

Принята к публикации 22.05.2024 г.

В качестве неинвазивного метода для мониторинга функционального состояния организма предложен биоломинесцентный ферментативный анализ слюны. Уровень интенсивности свечения би-ферментной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой, при воздействии слюны, служил показателем состояния организма работников при трудовой нагрузке. От-сутствие достоверного различия между биоломинесцентным показателем до и после рабочей смены при неизменных биохимических и физико-химических параметрах слюны указывало на адаптацию организма к трудовой нагрузке. Повышенный биоломинесцентный показатель характерен для работников в состоянии хронического утомления, пониженный показатель – при наличии хронических заболеваний и вредных привычек. Выявлена зависимость биоломинесцентного показателя от концентрации лактата, продуктов перекисного окисления липидов, ионного и минерального состава, показателей свободнорадикального окисления и антирадикальной защиты. Таким образом, зависимость компонентного состава слюны от условий жизни и состояния здоровья работников определяет биоломинесцентный ферментативный биотест, пригодный для экспрессного мониторинга организма во время трудовой нагрузки.

Ключевые слова: биоломинесцентный ферментативный биотест, спектрофотометрический анализ, биохимический анализ, хемилюминесценция, слюна, работники железнодорожного транспорта, трудовая нагрузка, утомление, персонифицированная медицина.

DOI: 10.31857/S0006302924030224, EDN: ODFAQD

В современном мире, где технологический прогресс развивается стремительными темпами, трудовая деятельность человека все чаще связана с работой на транспорте. В частности, железнодорожный транспорт занимает особое место в обеспечении мобильности населения и грузоперевозок. Однако работа на железнодорожном транспорте сопряжена с высокими физическими и психологическими нагрузками, что может нега-

тивно сказаться на состоянии здоровья работников. В связи с этим актуальным является поиск эффективных методов мониторинга состояния здоровья работников железнодорожного транспорта [1].

Одним из перспективных направлений является анализ слюны человека, который обладает рядом преимуществ перед другими методами диагностики. Во-первых, слюна является доступ-

ным и неинвазивным биоматериалом, который можно получить в любое время без особых усилий [2–4]. Во-вторых, состав слюны изменяется в ответ на изменение состояния организма в большей степени, чем состав других биологических жидкостей [5–7]. Так, при стрессе содержание кортизола в слюне резко повышается [8], а содержание лактата – основного биомаркера функционального утомления организма – в слюне зависит от профессионального уровня работника [9].

В качестве перспективных решений для проведения долговременного мониторинга предлагаются портативные сенсоры, такие как капны [10, 11], оптические и электрохимические биосенсоры [12], микрофлюидные чипы [9]. Несмотря на очевидные преимущества этих устройств, такие как простота использования, гибкость и возможность одноразового применения, существуют и ограничения, связанные с их недостаточной точностью и чувствительностью, сложностью дизайна и высокой стоимостью. Кроме того, для широкого применения таких устройств необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на подтверждение безопасности их использования в полости рта, не учитываются также индивидуальные различия слюны разных людей [13]. В связи с этим необходимо проведение исследований для определения исходного «контрольного уровня» и «уровня стресса» для каждого испытуемого, что позволит выявить контрольные и стрессовые точки для биомаркеров слюны.

Биолюминесцентная тест-система, состоящая из двух последовательных реакций, катализируемых НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой, была предложена для проведения экспрессного и точного анализа изменения состава биологических жидкостей, таких как слюна и кровь, под влиянием разного типа перегрузок, включая стрессовые. Этот биолюминесцентный анализ имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, такими как иммуноферментный анализ (ELISA) и другие. В первых, биолюминесцентный метод позволяет отслеживать изменения состава анализируемых жидкостей в режиме реального времени. Во-вторых, высокая чувствительность и специфичность такого анализа позволяет не только обнаруживать низкие концентрации анализируемых молекул, но и снизить затраты на оборудование и реагенты [14].

Ранее нами было показано, что биолюминесцентный анализ слюны позволяет установить стрессовое состояние организма при разном уровне психоэмоционального напряжения [15]. В настоящей работе предложено использовать биолюминесцентный ферментативный биотест для

оценки состояния утомления организма и адаптации его во время посменной обычной для организма трудовой нагрузки.

Таким образом, целью работы было выявление связи между показателями биолюминесцентного биотеста слюны, образа жизни испытуемых и факторами, влияющими на их организм при трудовой нагрузке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы специалисты оперативно-диспетчерского состава Красноярской железной дороги (филиала ОАО «РЖД») ($n = 19$) обоих полов в течение 5 недель (август–сентябрь 2022 г.) до и после дневной рабочей смены. Одна дневная рабочая смена состояла из 2 суток. Один рабочий день имел продолжительность 12 ч.

Было проведено анкетирование испытуемых о состоянии здоровья. Субъективная оценка здоровья содержала социально-демографические (возраст и пол) и профессиональные сведения, информацию об образе жизни и здоровье. Показатели здоровья и образа жизни включали вопросы о курении, употреблении кофейных напитков, оценку физической активности, принятия лекарственных средств, продолжительности сна, наличия и состава завтрака. Профессиональные вопросы включали данные о трудовом стаже, работе в должности, волнении на рабочем месте, субъективной оценке степени утомления организма после рабочей смены.

Заключения медицинских осмотров сотрудников были предоставлены ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» (Красноярск, Россия).

Материалом исследования служила биологическая жидкость – слюна. Нестимулированную слюну испытуемые отбирали самостоятельно путем сплевывания в стерильную пробирку объемом 2 мл до и после дневной рабочей смены.

Перед тестированием слюну центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Для тестирования использовали супернатант.

Нативную свежую слюну хранили в холодильнике при температуре 4°C в течение 4 ч и использовали для биолюминесцентного и хемилюминесцентного анализа. Замороженную слюну хранили в морозильной камере при температуре –18°C и использовали для спектрофотометрического и биохимического анализа.

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием многокомпонентного иммобилизованного реагента «Энзимолум» (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск, Россия). Каждый диск реагента содержал

ферменты: люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу из бактериальной культуры *Vibrio fischeri*, а также субстраты (тетрадеканаль (C_{14}) и никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), оба – Sigma, США), совместно иммобилизованные в высушенный крахмальный гель в виде дисков, содержащих реагенты для одного измерения [14]. Для инициирования реакции биолюминесценции вносили 0.5 мМ водный раствор флавиномононуклеотида (Serva, Германия).

Для хемилюминесцентного тестирования использовали люминол (AppliChem, Германия) и перекись водорода («Химпром», Россия).

Для спектрофотометрического тестирования использовали хлорид железа III (Solins, Россия)

Центрифугирование проводили на центрифуге Centrifuge 5810r (Eppendorf, Германия).

Спектрофотометрический анализ проводили на спектрофотометре UV–1800 (Shimadzu, Япония)

Биолюминесцентное тестирование проводили на кюветном люминометре Glomax 20/20 (Promega, США), хемилюминесцентное тестирование – на планшетном люминометре TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия).

Методика биолюминесцентного тестирования слюны включала в себя проведение контрольного и экспериментального измерения.

Реакционная смесь для измерения биолюминесценции содержала один диск реагента «Энзимолум», 300 мкл буфера, 10 мкл водного раствора флавиномононуклеотида.

Для проведения контрольного измерения в кювету последовательно вносили компоненты реакционной смеси и регистрировали максимальную интенсивность свечения. При экспериментальном тестировании 40 мкл буфера заменяли на 40 мкл слюны.

Измерения каждого образца слюны выполняли в трех повторностях. Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения (интегральный биолюминесцентный показатель для слюны) как отношение средних максимальных интенсивностей свечения экспериментального измерения (I) к контролю (I_0), умноженное на 100%:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100\%.$$

Концентрацию лактата в образцах слюны определяли спектрофотометрическим методом с использованием хлорида железа III. Регистрировали оптическую плотность на длине волны 400 нм [16].

Биохимический, ионный и минеральный анализ слюны был выполнен сотрудниками Омского государственного педагогического университета под руководством Л.В. Бельской по стандартным методикам, адаптированным для слюны [17]. Определяли концентрацию общего белка, мочевины, глюкозы, содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, основание Шиффа), концентрацию ионов аммония, калия, магния, натрия, кальция, хлоридов, фосфатов, фторидов, нитратов, нитритов.

Антиоксидантный статус организма определяли H_2O_2 -люминол-зависимым хемилюминесцентным тестированием слюны по величине максимальной интенсивности свечения и площади под кривой хемилюминесценции [18].

Статистический анализ данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с использованием непараметрического критерия с подсчетом медианы (Me) и интерквартильных интервалов (C_{25} и C_{75}). 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. Уровень значимости $p < 0.05$. На графиках указана высота столба – медиана (Me) (серединное значение выборки), края усов – межквартильный диапазон между 25-м процентилем (C_{25}) и 75-м процентилем (C_{75}), т.е. усы, отходящие вниз и вверх, обозначают минимальное и максимальное значения выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ персонифицированных анкет показал, что средний возраст мужчин и женщин составил 37 ± 13 лет (табл. 1). Состояние своего здоровья исследуемые работники оценивали на «хорошо». Большая часть работников не имела проблем со сном. Инсомнию имели молодые люди независимо от пола с трудовым стажем до 10 лет. Здоровый образ жизни без вредных привычек вели более 30% работников женского пола и 25% работников мужского пола. Большинство работников постоянно пили кофе или курили в течение рабочей смены. Большинство женщин, в отличие от мужчин, оценивали свое состояние на рабочем месте как «спокойное».

Трудовая нагрузка вызывала незначительную усталость для 26% работников (низкая степень), 30% указывали на утомление к концу дня (средняя степень) (работники 40–50 лет), 44% – силь-

Таблица 1. Социально-демографические характеристики и образ жизни исследуемых работников

№	Социально-демографический статус и образ жизни исследуемых работников		Показатели, %		
			общие (n = 19)	женщины (n = 11)	мужчины (n = 8)
1	Возраст	до 30 лет	21	36	12
		до 40 лет	42	27	63
		до 50 лет	32	27	25
		старше 50 лет	5	9	0
2	Трудовой стаж	до 10 лет	50	38	55
		от 10 лет	50	62	45
3	Работа в должности	1 год	5	9	0
		2 года	37	27	36
		4 года	58	64	64
4	Продолжительность сна и его состояние	6–8 часов спокойного сна	68	64	75
		3–4 часа беспокойного сна	32	36	25
5	Завтрак и его состав	отсутствует	42	27	63
		глутеновый	46	54	12
		белковый	12	19	25
6	Употребление кофе и курение	да	74	64	75
		нет	26	36	25
7	Физическая активность	отсутствует	100	100	100
8	Употребление лекарственных средств	присутствует	5	9	0
9	Волнение на рабочем месте	очень волнуются	5	9	0
		иногда волнуются	58	45	63
		спокойны	37	46	37
10	Степень утомления на рабочей смене	низкое	26	27	13
		среднее	30	22	37
		выше среднего	44	51	50

ное утомление в течение всего дня (высокая степень) (работники 30–40 лет).

Таким образом, исследуемые работники различались образом жизни и личностными характеристиками.

По результатам медицинских заключений исследуемые работники были распределены на группы по состоянию здоровья.

К первой группе были отнесены 32% исследуемых работников (n = 6), у которых отсутствовали хронические неинфекционные заболевания и факторы риска развития заболеваний. В первую группу вошли мужчины и женщины в возрасте более 45 лет, не имеющие вредных привычек и сопутствующих заболеваний. Степень утомления организма оценивали как «низкую».

Во вторую группу входили 21% исследуемых работников (n = 4), у которых не выявлены хронические неинфекционные заболевания, но имелись факторы риска развития заболеваний. Во вторую группу вошли женщины и мужчины в возрасте от 40 до 43 лет. Работники имели проблемы со зрением. Количество моноцитов и концентра-

ция холестерина в крови было выше нормы, что могло свидетельствовать о наличии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний [19]. Степень утомления организма оценивали как «среднюю».

В третьей группе было 47% исследуемых работников (n = 9), которые имели хронические неинфекционные заболевания, им требовалось диспансерное наблюдение и высококвалифицированная медицинская помощь. В третью группу вошли женщины и мужчины в возрасте от 40 до 45 лет, имеющие вредные привычки, проблемы со зрением и сердечно-сосудистые заболевания. Содержание гемоглобина в крови было понижено. Биохимические показатели крови отличались от нормы по содержанию холестерина. Повышено количество лейкоцитов, лимфоцитов, эозинофилов в крови. Повышен показатель гематокрита. Представленный анализ крови свидетельствовал о наличии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний и инфекционных патологий в хронической форме [19, 20]. Степень

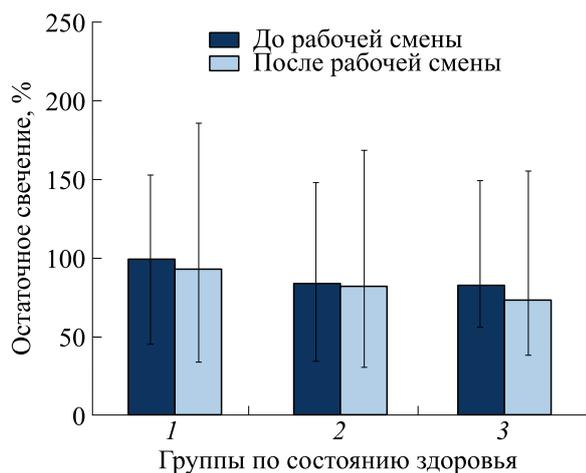


Рис. 1. Влияние слюны работников разных групп, отличающихся состоянием здоровья, на биолюминесцентный ферментативный биотест (первая группа – работники без хронических неинфекционных заболеваний и факторов риска развития заболеваний; вторая группа – работники без хронических неинфекционных заболеваний, но с факторами риска развития заболеваний; третья группа – работники, страдающие хроническими неинфекционными заболеваниями и требующие диспансерного наблюдения и высококвалифицированной медицинской помощи).

утомления организма оценивали как «выше среднего».

Биолюминесцентный анализ при воздействии слюны работников разных групп по состоянию здоровья показал, что уровень свечения для работников разных групп по состоянию здоровья достоверно не различался (рис. 1). Следовательно, биолюминесцентный биотест не позволил выявить различия между группами по состоянию здоровья.

Использование метода кластеризации по результатам биолюминесцентного тестирования слюны совместно с данными хемилюминесцентного и биохимического анализа слюны позволил выявить три кластера (рис. 2).

1-й кластер – самые высокие значения биолюминесцентного показателя при воздействии слюны работников, которые относились к первой и второй группе по состоянию здоровья (преимущественно первая группа) ($n = 5$). Усредненный показатель до и после рабочей смены был достоверно выше результатов других кластеров ($p < 0.001$). Показатели до и после рабочей смены не различались.

2-й кластер – средние значения биолюминесцентного показателя при воздействии слюны работников, которые относились к первой и второй группе по состоянию здоровья (преимущественно вторая группа) ($n = 5$). Усредненный показатель до и после рабочей смены был достоверно

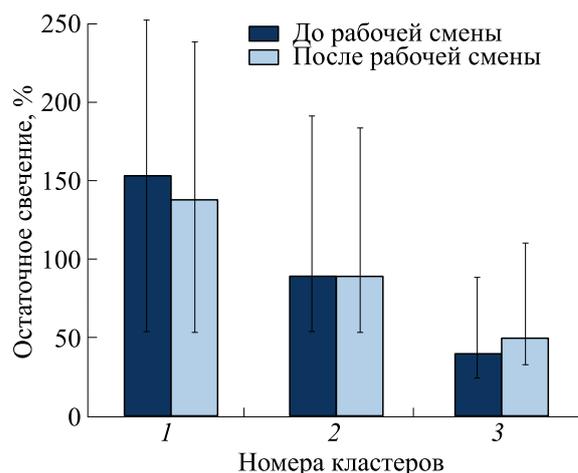


Рис. 2. Результаты кластеризации усредненных данных биолюминесцентного анализа слюны исследуемых работников (кластер 1 – работники первой и второй группы по состоянию здоровья (преимущественно первая группа), кластер 2 – работники первой и второй группы по состоянию здоровья (преимущественно вторая группа), кластер 3 – работники третьей группы по состоянию здоровья).

ниже результата 1-ого кластера ($p < 0.001$). До и после рабочей смены показатели не различались.

3-й кластер – самые низкие значения биолюминесцентного показателя при воздействии слюны работников, которые относились к третьей группе по состоянию здоровья ($n = 9$). Усредненный показатель до и после рабочей смены был достоверно понижен по сравнению с результатами 1 и 2 кластеров ($p < 0.001$). До и после рабочей смены показатели не различались.

Полагаем, что наблюдаемая тенденция к понижению биолюминесцентного показателя от 1-го к 3-му кластеру связана с состоянием здоровья исследуемых работников. На степень тушения биолюминесцентного свечения могло влиять изменение биохимического состава слюны работников, вызванное заболеванием и наличием вредных привычек.

Отсутствие каких-либо видимых различий связано с тем, что усреднение показателей проводили в группах с большим разбросом индивидуальных характеристик.

Для выявления факторов, значимых для биолюминесцентного биотеста, был проведен анализ компонентного состава слюны до и после рабочей смены.

Выявлено, что компонентный состав слюны работников 2-ого кластера до рабочей смены был в пределах нормы по антиоксидантной активности, биохимическому, минеральному и ионному составу (табл. 2, кластер 2).

Таблица 2. Компонентный состав слюны работников, распределенных по разным кластерам до и после рабочей смены

Показатели слюны исследуемых работников		Кластер 1		Кластер 2		Кластер 3	
		до рабочей смены	после рабочей смены	до рабочей смены	после рабочей смены	до рабочей смены	после рабочей смены
Антиоксидантная активность слюны	Максимальная интенсивность хемилюминесценции, усл. ед.	3400.0 [1964.0–13010.0]	13645.0 [2035.8–18366.5] ($p_{12} = 0.003$)	5364.0 [1373.0–7899.0]	10296.0 [1193.0–14366.8]	887.1 [422.0–2130.5]	1179.3 [174.0–34235.5]
	Площадь под кривой хемилюминесценции, усл. ед.	390367.5 [283150.9–2051422.4]	731928.9 [229326.1–2582928.6] ($p_{12} = 0.003$)	839103.7 [175125.5–1207156.2]	736441.2 [206749.5–1813420.4]	83064.2 [79406.17–290028.7]	189755.6 [10949.5–2818288.4]
Органический состав слюны	Концентрация общего белка, г/л	0.6 [0.6–0.8]	0.6 [0.5–0.8]	0.6 [0.6–0.7]	0.7 [0.5–0.8]	0.7 [0.6–0.9]	0.9 [0.7–1.1] ($p_{56} = 0.03$)
	Концентрация мочевины, ммоль/л	0.3 [0.2–0.5]	0.3 [0.3–0.4]	0.4 [0.2–0.7]	0.4 [0.4–0.5]	0.3 [0.2–0.4]	0.5 [0.4–0.6] ($p_{56} = 0.007$)
	Активность каталазы, нкат/л	0.3 [0.2–0.3]	0.3 [0.3–0.4]	0.2 [0.2–0.3]	0.3 [0.2–0.3]	0.2 [0.2–0.3]	0.3 [0.2–0.3]
	Концентрация глюкозы, мкмоль/л	291.08 [82.0–291.1]	159.7 [159.7–161.0] ($p_{12} = 0.03$)	199.11 [189.2–203.4]	154.39 [102.5–294.5]	353.8 [82.3–416.5]	159.7 [159.7–240.7] ($p_{56} = 0.02$)
	Концентрация лактата, ммоль/л	3.9 [1.4–4.6]	1.9 [1.2–3.7]	3.1 [1.5–4.5]	2.5 [1.8–3.7]	2.9 [2.3–4.3]	3.2 [1.8–4.4] ($p_{46} = 0.01$) ($p_{26} = 0.005$)
Продукты перекисного окисления липидов	Концентрация диеновых конъюгатов, нмоль/мл	0.2 [0.1–0.3]	0.6 [0.4–0.7] ($p_{12} < 0.001$)	0.1 [0.09–0.10]	0.3 [0.2–0.3]	0.1 [0.1–0.4]	0.3 [0.2–0.5]
	Концентрация триеновых конъюгатов, нмоль/мл	0.2 [0.2–0.3]	0.6 [0.4–0.7] ($p_{12} < 0.001$)	0.2 [0.1–0.2]	0.3 [0.2–0.3]	0.2 [0.1–0.4]	0.3 [0.2–0.5]
	Концентрация оснований Шиффа, нмоль/мл	0.2 [0.1–0.5]	0.6 [0.5–0.7] ($p_{12} < 0.001$)	0.1 [0.09–0.10]	0.3 [0.3–0.4]	0.3 [0.2–0.4]	0.4 [0.3–0.5] ($p_{56} = 0.003$)
Ионный состав слюны	Концентрация ионов аммония, ммоль/л	112.1 [112.1–144.0]	99.3 [84.4–124.2] ($p_{12} = 0.03$)	105.1 [99.8–107.2]	162.4 [155.7–174.1]	113.20 [109.9–139.0]	143.5 [126.3–181.7]
	Концентрация ионов калия, ммоль/л	555.7 [509.2–590.1]	371.2 [366.8–411.4] ($p_{12} = 0.03$)	490.8 [485.7–501.2]	549.5 [551.6–632.7]	609.9 [414.9–633.9]	719.6 [450.0–735.9]
	Концентрация ионов натрия, ммоль/л	83.6 [80.3–93.9]	112.08 [83.5–132.2]	80.8 [75.7–89.3]	114.97 [104.4–124.4]	92.47 [73.2–135.6]	91.77 [80.8–112.2]
	Концентрация ионов магния, ммоль/л	1.8 [1.6–2.4]	2.8 [2.6–2.9]	2.6 [1.9–3.2]	2.3 [1.1–2.5]	2.5 [1.6–3.5]	3.2 [2.6–3.5]
	Концентрация ионов кальция, ммоль/л	22.2 [19.4–22.2]	64.9 [48.9–71.7]	37.8 [31.8–42.4]	31.3 [20.5–41.2]	22.2 [19.1–39.8]	30.5 [27.1–34.8]
Минеральный состав слюны	Концентрация хлоридов, ммоль/л	448.8 [448.8–494.1]	466.5 [463.2–501.0]	397.4 [387.1–414.2]	456.1 [441.8–508.4]	516.5 [417.0–547.8]	518.5 [469.8–530.4]
	Концентрация нитритов, ммоль/л	3.2 [2.2–4.7]	5.0 [5.0–5.6]	2.4 [2.1–3.4]	4.7 [4.4–5.8]	3.2 [1.2–3.5]	5.0 [4.9–5.0]
	Концентрация сульфатов, ммоль/л	13.7 [10.3–43.2]	59.8 [59.8–85.7] ($p_{12} = 0.03$)	16.9 [14.9–17.5]	41.1 [35.7–42.1]	22.6 [21.5–34.8]	22.1 [18.6–58.4]
	Концентрация нитратов, ммоль/л	6.2 [5.1–7.8]	5.8 [4.0–6.8]	5.4 [4.8–6.1]	4.1 [3.5–4.2]	5.5 [5.0–5.8]	3.5 [2.3–4.8]
	Концентрация фторидов, ммоль/л	2.81 [2.6–4.7]	9.5 [9.5–15.4]	90.2 [89.4–101.0]	8.9 [8.3–9.8]	4.76 [4.1–6.5]	6.8 [5.0–9.5]
	Концентрация фосфатов, ммоль/л	256.3 [256.3–282.3]	335.6 [327.3–360.0]	273.4 [271.2–284.7]	291.5 [285.7–301.4]	339.7 [285.8–387.4]	408.4 [374.6–565.8] ($p_{56} = 0.02$)

Примечание. Данные представлены в виде $Me [C25–C75]$.

Выявлена корреляционная связь биолуминесцентного показателя до рабочей смены с возрастом исследуемых работников ($r = 0.2$, $p = 0.04$) и концентрацией глюкозы в слюне ($r = -0.4$, $p = 0.03$), что может быть связано с влиянием углеводсодержащих продуктов «легкого питания» [20].

После рабочей смены показатели слюны существенно не изменялись. Определена корреляционная взаимосвязь биолуминесцентного показателя с уровнем утомления ($r = -0.2$, $p = 0.03$) и с концентрацией ионов кальция ($r = 0.4$, $p = 0.04$) для работников с сердечно-сосудистым заболеванием [19, 21] и с минеральным составом слюны (концентрацией фторидов и фосфатов) ($r = 0.5$, $p = 0.04$) для работников с заболеванием почек [22, 23].

Полагаем, что работники 2-го кластера испытывали адаптационный стресс, связанный с усталостью после трудовой нагрузки.

Слюна работников 1-го кластера усиливала биолуминесцентное свечение, при этом выявлены существенные отличия компонентного состава слюны до и после рабочей смены. Достоверно повышена антиоксидантная активность ферментов ($p = 0.003$), накапливались продукты перекисного окисления липидов – маркеры окислительного стресса (диеновые и триеновые конъюгаты, основания Шиффа) ($p < 0.001$), повышена концентрация глюкозы в слюне ($p = 0.03$), концентрации ионов аммония, калия ($p = 0.03$) и сульфатов ($p = 0.03$) (табл. 2, кластер 2). Полученные данные указывают на присутствие окислительного стресса, а также ожирения [24].

Выявлена корреляционная взаимосвязь биолуминесцентного показателя до рабочей смены с уровнем утомления ($r = -0.3$, $p = 0.04$) и концентрацией лактата в слюне ($r = -0.2$, $p = 0.04$), что может быть связано с наличием хронического утомления в организме [25, 26]. Корреляционная взаимосвязь биолуминесцентного показателя с показателями компонентного состава слюны после рабочей смены отсутствовала.

Основная часть исследуемых работников 3-го кластера имели вредные привычки и хронические заболевания. Слюна исследуемых работников, взятая до рабочей смены, сильнее ингибировала биолуминесцентное свечение по сравнению с результатами, полученными после рабочей смены, вследствие различия компонентного состава слюны.

Трудовая нагрузка достоверно повышала концентрацию общего белка ($p = 0.03$), мочевины ($p = 0.007$) и глюкозы ($p = 0.02$), продуктов пере-

кисного окисления липидов (основания Шиффа) ($p = 0.003$), а также концентрацию фосфатов ($p = 0.02$) (табл. 2, кластер 3), что подтверждало наличие хронических заболеваний и воспалительных процессов, сопровождающихся активацией иммунной системы [27]. Концентрация лактата в слюне после рабочей смены достоверно повышена по сравнению с показателями работников 1-го и 2-го кластера, что указывало на хроническое утомление [25, 26].

Выявлена корреляционная взаимосвязь биолуминесцентного показателя до рабочей смены с концентрацией общего белка ($r = 0.5$, $p = 0.03$), продуктами перекисного окисления липидов (триеновые конъюгаты, основания Шиффа) ($r = 0.5$, $p = 0.05$), концентрацией ионов калия, натрия, кальция ($r = 0.5$, $p = 0.04$) и содержанием хлоридов ($r = 0.6$, $p = 0.04$), что свидетельствовало о стрессовом состоянии организма, вызванного хроническими заболеваниями и наличием вредных привычек [24, 27]. Корреляционная взаимосвязь биолуминесцентного показателя с показателями компонентного состава слюны после рабочей смены отсутствовала.

Следовательно, низкий показатель биолуминесценции работников 3-го кластера во взаимосвязи с биомаркерами хронических заболеваний и воспалительных процессов указывал на состояние хронического утомления до рабочей смены и перегрузки организма после трудового дня, поэтому работников 3-го кластера можно отнести к группе риска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исходя из полученных результатов следует, что неинвазивный интегральный биолуминесцентный анализ слюны на основе иммобилизованной биферментной системы «НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцефераза» может быть использован для выявления утомления работников во время трудовой нагрузки в посменной работе для контроля перегрузок, которые впоследствии могут существенно ухудшить трудоспособность работника.

Отсутствие изменений биолуминесцентного показателя при воздействии слюны, отобранной до и после рабочей смены, может указывать на адаптационное состояние организма работника при трудовой нагрузке в посменной работе. При этом компонентный состав слюны исследуемых работников может изменяться в пределах индивидуальной нормы.

Изменение активности биферментной системы под воздействием слюны может указывать на

степень утомления организма во время трудовой нагрузки. 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 понижение 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 внерабочее 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Красноярской железной дороги (филиала ОАО «РЖД»), за оказанную помощь в проведении исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-10039, <https://rscf.ru/project/23-25-10039>) совместно с Красноярским краевым фондом науки (Красноярский край) (проект «Биологические маркеры профессионального здоровья и долголетия работников в сфере железнодорожного транспорта»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья испытуемых в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, и одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (протокол № 11 от 10.10.2023 года). Испытуемые подписывали информированное добровольное согласие на участие в эксперименте и обработку данных после получения разъяснений о характере предстоящего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klaassens E. R., Giltay E. J., van Veen T., Veen G., and Zitman F. G. Trauma exposure in relation to basal salivary cortisol and the hormone response to the dexamethasone/CRH test in male railway employees without lifetime psychopathology. *Psychoneuroendocrinology*, **35** (6), 878–886 (2010). DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.11.012
2. Бельская Л. В. и Сарф Е. А. *Биохимические методы исследования слюны в лабораторной диагностике* (ИНТЕХ, Омск, 2013).
3. Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S., and Feron G. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Arch. Oral Biol.*, **57** (5), 556–566 (2012). DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.016
4. Бельская Л. В. и Сарф Е. А. Околосуточная динамика состава слюны человека по данным ИК-Фурье-спектроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*, **63** (5), 277–281 (2018). DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-5-277-281
5. Bel'skaya L. V. Application of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Bull. Sci. & Practice*, **2** (15), 132–140 (2017). DOI: 10.5281/zenodo.291849
6. Бельская Л. В., Голованова О. А., Шукайло Е. С. и Турманидзе В. Г. Экспериментальное исследование кристаллизации биологических жидкостей. *Вестн. Отделения наук о Земле РАН*, **3**, NZ6012 (2011). DOI: 10.2205/2011NZ000142
7. Турлак И. В. Слюна – основные направления исследования ее свойств. *Современные проблемы науки и образования*, **4**, (2020). <https://s.science-education.ru/pdf/2020/4/29934.pdf> (ссылка активна на 02.05.2024).
8. de Kloet C. S., Vermetten E., Heijnen C. J., Geuze E., Lentjes E. G., and Westenberg H. G. Enhanced cortisol suppression in response to dexamethasone administra-

- tion in traumatized veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, **32** (3), 215–226 (2007). DOI: 10.1016/j.psyneuen.2006.12.009
9. Yao Y., Li H., Wang D., Liu C., and Zhang C. An electrochemiluminescence cloth-based biosensor with smartphone-based imaging for detection of lactate in saliva. *Analyst*, **142** (19), 3715–3724 (2017). DOI: 10.1039/C7AN01008G
 10. Bellagambi F. G., Baraket A., Longo A., Vatteroni M., Zine N., Bausells J., Fuoco R., Francesco F. D., Salvo P., Karanasiou G. S., Fotiadis D. I., Mencias A., and Errachid A. Electrochemical biosensor platform for TNF- α cytokines detection in both artificial and human saliva: Heart failure. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **251**, 1026–1033 (2017). DOI: 10.1016/j.snb.2017.05.169
 11. Soni A., Surana R. K., and Jha S. K. Smartphone based optical biosensor for the detection of urea in saliva. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **269**, 346–353 (2018). DOI: 10.1016/j.snb.2018.04.108 0925-4005
 12. Shi W., Li J., Wu J., Wei Q., Chen C. Bao N., Yu C., and Gu H. An electrochemical biosensor based on multi-wall carbon nanotube–modified screen-printed electrode immobilized by uricase for the detection of salivary uric acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **412** (26), 7275–7283 (2020). DOI: 10.1007/s00216-020-02860-w
 13. Pea A., Andrei V., Feurdean C. N., Băbșan A. M., Petrescu N. B., Câmpian R. S., Boșca A. B., Ciui B., Terțiș M., Săndulescu R., and Cristea C. Saliva, a magic biofluid available for multilevel assessment and a mirror of general health – A systematic review. *Biosensors (Basel)*, **9** (1) 27 (2019). DOI: 10.3390/bios9010027
 14. Esimbekova E., Kratasyuk V., and Shimomura O. Application of Enzyme Bioluminescence in Ecology. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Ed. by G. Thouand and R. Marks (Springer, Berlin, 2014), pp. 67–109. DOI: 10.1007/978-3-662-43385-0_3
 15. Zhukova G. V., Kolenchukova O. A., Ryzhikova E. M., Stepanova L. V., and Kratasyuk V. A. Comprehensive assessment of the health of young people living in the Far North. *Sib. J. Life Sci. & Agriculture*, **14** (5), 226–245 (2022). DOI: 10.12731/2658-6649-2022-14-5-226-245
 16. Borshchevskaya L. N., Gordeeva T. L., Kalinina A. N., and Sineokii S. P. Spectrophotometric determination of lactic acid. *J. Anal. Chem.*, **71** (8), 755–758 (2016). DOI: 10.1134/S1061934816080037
 17. Bel'skaya L. V., Kosenok V. K., and Massard G. Endogenous intoxication and saliva lipid peroxidation in patients with lung cancer. *Diagnostics*, **6** (4), 39 (2016). DOI: 10.3390/diagnostics6040039
 18. Винник Ю. С., Савченко А. А., Перьянова О. В., Теплякова О. В., Якимов С. В., Тепляков Е. Ю. и Мешкова О. С. Клинические аспекты применения хемилюминесцентного анализа. *Сиб. мед. обозрение*, **40** (3), 3–6 (2006).
 19. Chen J., Wu K., Cao W., Shao J., and Huang M. Association between monocyte to high-density lipoprotein cholesterol ratio and multi-vessel coronary artery disease: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.*, **22**, 121 (2023). DOI: 10.1186/s12944-023-01897-x
 20. Мандра Ю. В., Каминская Л. А., Светлакова Е. Н., Гаврилов И. В., Жолондзиовский П. А. и Тимербулатов А. Д. Динамика изменения биохимического состава слюны под влиянием углеводсодержащих продуктов «Легкого питания». *Проблемы стоматологии*, **4**, 10–16 (2016).
 21. Доценко М., Алексейчик Д., Панкратова Ю., Алексейчик С., Доценко К. и Санкович Е. Холестерин и иммунитет: клиничко-иммунологические параллели. *Наука и инновации*, **4** (146), 58–64 (2015).
 22. Чемикосова Т. С. и Гуляева О. А. Отклонения в минеральном составе ротовой жидкости у рабочих производства хлорфеноксигербицидов. *Проблемы стоматологии*, **2**, 3–7 (2005).
 23. Мартынов С. А. и Шамхалова М. Ш. Гиперфосфатемия при хронической болезни почек. *Медицинский совет*, **16**, 72–78 (2019). DOI: 10.21518/2079-701X-2019-16-78-85
 24. Cichońska D., Kusiak A., Kochańska B., Ochocińska J., and Świetlik D. Influence of electronic cigarettes on selected physicochemical properties of saliva. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **19** (6), 3314 (2022). DOI: 10.3390/ijerph19063314
 25. Franco-Martínez L., Tvarijonavičiute A., Martínez-Subiela S., Márquez G., Martínez Díaz N., Cugat R., Cerón J. J., and Jiménez-Reyes P. Changes in lactate, ferritin, and uric acid in saliva after repeated explosive effort sequences. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, **59** (6), 902–909 (2019). DOI: 10.23736/S0022-4707.18.08792-3
 26. Shungu D. C., Weiduschat N., Murrough J. W., Mao X., Pillemer S., Dyke J. P., Medow M. S., Natelson B. H., Stewart J. M., and Mathew S. J. Increased ventricular lactate in chronic fatigue syndrome. III. Relationships to cortical glutathione and clinical symptoms implicate oxidative stress in disorder pathophysiology. *NMR Biomed.*, **25** (9), 1073–1087 (2012). DOI: 10.1002/nbm.2772
 27. Голубева В. Л., Белова В. В., Адеишвили Т. Ш., Белачеу И. А., Юрина Т. М. и Епифанова Н. Ю. Изменения белков крови в диагностике заболеваний пациентов разных возрастных групп. *Актуальные проблемы медицины*, **22** (117), 5–9 (2011).

The Use of the Bioluminescent Enzyme Bioassay for the Analysis of Saliva of Railway Transport Workers to Monitor the Functional State of the Body in the Conditions of Labor Activity

L.V. Stepanova*, O.A. Kolenchukova*, **, ***, G.V. Zhukova*,
O.S. Sutormin*, ****, and V.A. Kratasyuk*, *****

*Siberian Federal University, Svobodnyi prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

**Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Partizana Zheleznyaka 3g, Krasnoyarsk, 660022 Russia

***Krasnoyarsk State Agrarian University, prosp. Mira 90, Krasnoyarsk, 660049 Russia

****Surgut State University, Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra, prosp. Lenina 1, Surgut, 628412 Russia

*****Institute of Biophysics, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

This paper proposes bioluminescent enzymatic assay of saliva as a non-invasive method for monitoring the functional state of the body. The value of luminescence intensity from coupled enzyme-based reaction catalyzed by NADH:FMN oxidoreductase and luciferase, when exposed to saliva, served as an indicator of the state of the body of workers at work. The absence of a significant difference between profiles of bioluminescence before and after the shift and no changes in biochemical, physical and chemical parameters of saliva indicated that the bodies had adapted to a workload. An increased bioluminescent intensity value is typical for workers in a state of chronic fatigue, a decreased one points to the presence of chronic diseases and bad habits. The dependence of the bioluminescent intensity value on the concentration of lactate, lipid peroxidation products, ionic and mineral composition, the values of free radical oxidation and antiradical protection was identified. Thus, the dependence of the saliva constituents on conditions of life and health status of workers can be identified using bioluminescent enzyme bioassay that is suitable for rapid monitoring of the body at work.

Keywords: bioluminescent enzyme bioassay, spectrophotometric analysis, biochemical analysis, chemiluminescence, saliva, railway transport workers, workload, fatigue, personalized medicine