

Читать
онлайн
Read
online

Хрипач Л.В., Бударина О.В., Князева Т.Д., Маковецкая А.К., Коганова З.И.,
Андрюшин И.Б.

Биохимические и иммунологические показатели адаптивного ответа организма в ольфакто-одориметрических исследованиях

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства России, 119121, Москва, Россия

Введение. Цель исследования — методом количественной ольфакто-одориметрии определить, может ли воздействие запахов модельных пищевых одорантов приводить к изменению биохимических и иммунологических показателей, ранее использовавшихся при обследовании населения в районе расположения предприятий пищевой промышленности.

Материалы и методы. В каждом эксперименте две серии увеличивающихся концентраций аэрозоля пищевого ароматизатора (апельсинового, кофейного или кофейного) подавались участникам исследований с помощью ольфактометра ECOMA T08. Состав аэрозолей контролировали методом хромато-масс-спектрометрии. В пробах слюны участников, отбиравшихся до начала, в процессе и по окончании каждого опыта определяли интенсивность люминолзависимой хемилуминесценции, содержание секреторного IgA, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-8, активность α-амилазы и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Для анализа данных использовали парные тесты Фридмана и Уилкоксона с поправкой Бонферрони на проблему множественных сравнений.

Результаты. Найдено достоверное влияние запаха пищевых одорантов только на один показатель — активность α-амилазы слюны — при объединении данных 5 отдельных экспериментов (n = 45): 93,3 [24,3; 160] Е/мл в конце опытов против фоновых значений 109,9 [42,5; 216,7] Е/мл; p = 0,0096 при уровне значимости p = 0,05/3 = 0,017. Показано, что под снижением средневзвешенных значений активности α-амилазы слюны скрываются разнонаправленные изменения индивидуальных значений: увеличение активности у людей с более низкими фоновыми значениями (ниже медианы исходного распределения) и доминирующее по амплитуде снижение у людей с более высокими фоновыми значениями (выше медианы). Выявленный фенотипический полиморфизм регуляции α-амилазы вносит вклад в одно из актуальных направлений постковидного периода — изучение способности людей воспринимать запахи и реагировать на них.

Ограничения исследования. Использование ольфакто-одориметрии для изучения влияния запахов на показатели состояния организма перспективно, но требует разработки протоколов с увеличенным временем экспозиции.

Заключение. Снижение активности α-амилазы слюны с характерным опережающим сдвигом верхнего квартиля может быть признаком рефлекторной реакции населения на выброс компонентов, обладающих запахом, в районах расположения предприятий пищевой промышленности.

Ключевые слова: пищевые ароматизаторы; ольфакто-одориметрия; смешанная слюна; α-амилаза; люминолзависимая хемилуминесценция; ИЛ-1β; ИЛ-6; ИЛ-8; секреторный IgA; N-ацетил-глюкозаминидаза

Соблюдение этических стандартов. На проведение исследований получено согласие локального этического комитета ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (протокол № 3 от 17.08.2020 г.).

Для цитирования: Хрипач Л.В., Бударина О.В., Князева Т.Д., Маковецкая А.К., Коганова З.И., Андрюшин И.Б. Биохимические и иммунологические показатели адаптивного ответа организма в ольфакто-одориметрических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(7): 741-748. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-7-741-748> <https://www.elibrary.ru/diuxzm>

Для корреспонденции: Хрипач Людмила Васильевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. отд. профилактической токсикологии и медико-биологических исследований ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: LKhrpach@cspmz.ru

Участие авторов: Хрипач Л.В. — концепция и дизайн исследования, математическая обработка и интерпретация результатов, написание текста статьи; Бударина О.В. — концепция и дизайн исследования; Князева Т.Д. — оценка биохимических и иммунологических показателей в пробах слюны; Маковецкая А.К. — оценка иммунологических показателей в пробах слюны; Коганова З.И. — оценка биохимических показателей в пробах слюны; Андрюшин И.Б. — проведение ольфактометрии. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения Госзадания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Поступила: 16.05.2022 / Принята к печати: 08.06.2022 / Опубликована: 31.07.2022

Ludmila V. Khrpach, Olga V. Budarina, Tatiyana D. Knyazeva, Anna K. Makovetskaya,
Zoya I. Koganova, Ilya B. Andryushin

Biochemical and immunological markers of the adaptive response in olfacto-odorimetric studies

Centre for Strategic Planning, FMBA of Russia, Moscow, 119992, Russian Federation

The purpose of the study is to determine whether exposure to odours of model food odourants can lead to a change in biochemical and immunological parameters that we previously used when examining the population in the area of food industry enterprises location using the method of quantitative olfacto-odorimetry.

Methods. The specified concentrations of aerosols of three food flavours (orange, cognac and coffee) were supplied to the participants of the studies with a help of ECOMA T08 olfactometer. Quantitative composition of the aerosols was controlled by GC/MS. In participants saliva samples taken before, during and at the end of each experiment, the intensity of luminol-dependent chemiluminescence, the content of secretory IgA, IL-1β, IL-6 and IL-8, the activity of α-amylase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase were determined. For data analysis, paired Friedman and Wilcoxon tests were used with Bonferroni correction for the problem of multiple comparisons.

Results. A reliable effect of the smell of food odourants was found on one indicator only — the activity of salivary α-amylase — when combining data from 5 separate experiments (n=45): 93.3[24.3;160.0] U/ml at the end of the experiments against background values of 109.9 [42.5; 216.7] U/ml; p=0.0096 with a significance level of p=0.05/3=0.017. A decrease in the average values of salivary α-amylase activity was shown to hide opposite changes in individual values: an increase in

activity in people with low background values (below the median of the initial distribution) and an amplitude-dominant decrease – in people with high background values (above median). The revealed phenotypic polymorphism of α -amylase regulation contributes to one of relevant Post-COVID areas – the study of the ability of people to perceive odours and react to them.

Limitations. The use of olfacto-odorimetry to study effect of odours on human health indicators is promising, but requires design of protocols with extended exposure time.

Conclusion. A decrease in average values of salivary α -amylase activity with distinctive forestall of the upper quartile may be a sign of human reflex response to the emission of odorous substances in the areas of food industry.

Keywords: food odorants; olfacto-odorimetry; mixed saliva; α -amylase; luminol-dependent chemiluminescence; IL-1 β ; IL-6; IL-8; secretory IgA; N-acetyl-glucosaminidase

Compliance with ethical standards: The consent of the local ethics committee of the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia was obtained for conducting research (Protocol No. 3 of 17.08.2020).

For citation: Khripach L.V., Budarina O.V., Knyazeva T.D., Makovetskaya A.K., Koganova Z.I., Andryushin I.B. Biochemical and immunological markers of the adaptive response in olfacto-odorimetric studies. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2022; 101(7): 741-748. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-7-741-748> <https://elibrary.ru/diuxzm> (in Russian)

For correspondence: Ludmila V. Khripach, MD, PhD, DSci, leading researcher of the Department of Preventive Toxicology and Biomedical Research, Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119992, Russian Federation. E-mail: LKhripach@cspmrz.ru

Information about the authors:

Khripach L.V., <https://orcid.org/0000-0003-0170-3085>

Budarina O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4319-7192>

Knyazeva T.D., <https://orcid.org/0000-0001-5279-5018>

Makovetskaya A.K., <https://orcid.org/0000-0002-4652-1755>

Koganova Z.I., <https://orcid.org/0000-0002-4622-8110>

Andryushin I.B., <https://orcid.org/0000-0002-5834-678X>

Contributions: Khripach L.V. – research concept and design, determination of biochemical and immunological markers in saliva samples; Budarina O.V. – research concept and design; Knyazeva T.D. – determination of biochemical and immunological markers in saliva samples; Makovetskaya A.K. – determination of biochemical and immunological markers in saliva samples; Koganova Z.I. – determination of biochemical and immunological markers in saliva samples; Andryushin I.B. – olfactometry. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. Moscow, 119992, Russian Federation

Acknowledgement. The study was carried out as part of the State Assignment of the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia.

Received: May 16, 2022 / Accepted: June 08, 2022 / Published: July 31, 2022

Введение

В настоящее время до 70–80% жалоб жителей промышленных городов на качество атмосферного воздуха составляют жалобы на ощущаемые неприятные запахи, особенно при направлениях ветра, способствующих переносу выбросов от предприятий-источников к жилым районам [1–3]. Таким образом, присутствие в выбросах промышленных предприятий веществ, обладающих запахом, даёт возможность субъективной оценки населением состояния воздушной среды. В одном из своих предыдущих исследований авторы изучали влияние загрязнения атмосферного воздуха выбросами комплекса предприятий пищевой промышленности на биохимические и иммунологические показатели в пробах слюны детей 5–6 лет [4]. Обследование проводили в связи с многочисленными жалобами жителей города на ощущаемые навязчивые запахи со стороны промышленной зоны. По результатам проведённого обследования 112 детей из 6 детских садов найдено 4 показателя (интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции слюны, содержание в ней интерлейкинов ИЛ-1 β и ИЛ-8 и активность лизосомального фермента N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы), связанных достоверными корреляционными связями с расстояниями до источника выбросов. С учётом спектра изменявшихся маркеров, являющихся косвенными признаками активации фагоцитов, сделан вывод о наличии в выбросах предприятий взвешенных частиц, концентрация которых в городском атмосферном воздухе увеличивалась по мере приближения к источнику.

Тем не менее нельзя было полностью исключить вероятность, что какие-то из этих показателей изменялись не под влиянием взвешенных частиц, а в результате воздействия компонентов выбросов, обладающих запахом, на обонятельные рецепторы детей, что приводило к последующей реакции нейроэндокринной и вегетососудистой систем организма. Слюна часто исследуется специалистами в области ароматерапии, и в ряде случаев было обнаружено достоверное влияние запахов ароматических масел на лабораторные показатели проб слюны человека. В частности, воздействие запаха лаванды, померанца и других эфирномасличных растений вызывало достоверное увеличение антирадикальной

активности слюны волонтеров [5], снижение содержания в ней кортизола [5–7] и хромогранина А [8], увеличение содержания sIgA [9], увеличение [10] или снижение [11] активности α -амилазы. Механизмы этих эффектов связывают с передачей нервных импульсов от обонятельных рецепторов в лимбическую систему головного мозга – гиппокамп, гипоталамус, миндалевидное тело и другие образования, принимающие участие в нейрорегуляции вегетативных функций организма [12–14].

С учётом изложенного было решено провести серию ольфакто-одориметрических исследований, измеряя в пробах слюны волонтеров тот же комплекс биохимических и иммунологических показателей, который использовали при обследовании детей в натуральных условиях.

Основная цель ольфакто-одориметрии – установление количественной связи между концентрацией одоранта в воздухе и его способностью вызывать у людей ощущение запаха, что достигается серией краткосрочных (в течение 2–3 с) «предъявлений» волонтерам воздушных смесей с постепенно увеличивающейся концентрацией изучаемого одоранта. Иными словами, это метод оценки «удельной пахучести» одорантов, в котором люди участвуют в качестве живых датчиков по причине отсутствия приборов, способных регистрировать запахи. С помощью ольфактометра можно также оценить остроту обоняния данного человека, зарегистрировать гипо- или аносию и следить за восстановлением этой функции у пациентов, хотя в практической медицине обычно используются не ольфактометры, а сходные по принципу бюджетные варианты – наборы пахучих растворов Воячека, Бернштейна и широко известный Sniffin' Sticks test – коммерческий комплект палочек-фломастеров с раститрованными пропитками [15–18].

Априори трудно сказать, насколько стандартный ольфакто-одориметрический протокол совместим с задачей изучения влияния запахов на состояние организма человека. С одной стороны, использование ольфактометра, особенно в сочетании с химико-аналитическим определением летучих компонентов одоранта в тестируемых пробах воздуха, даёт точные количественные оценки экспозиции участников и тем самым позволяет воспроизводить отдельные эксперименты и сравнивать их между собой. С другой

Original article

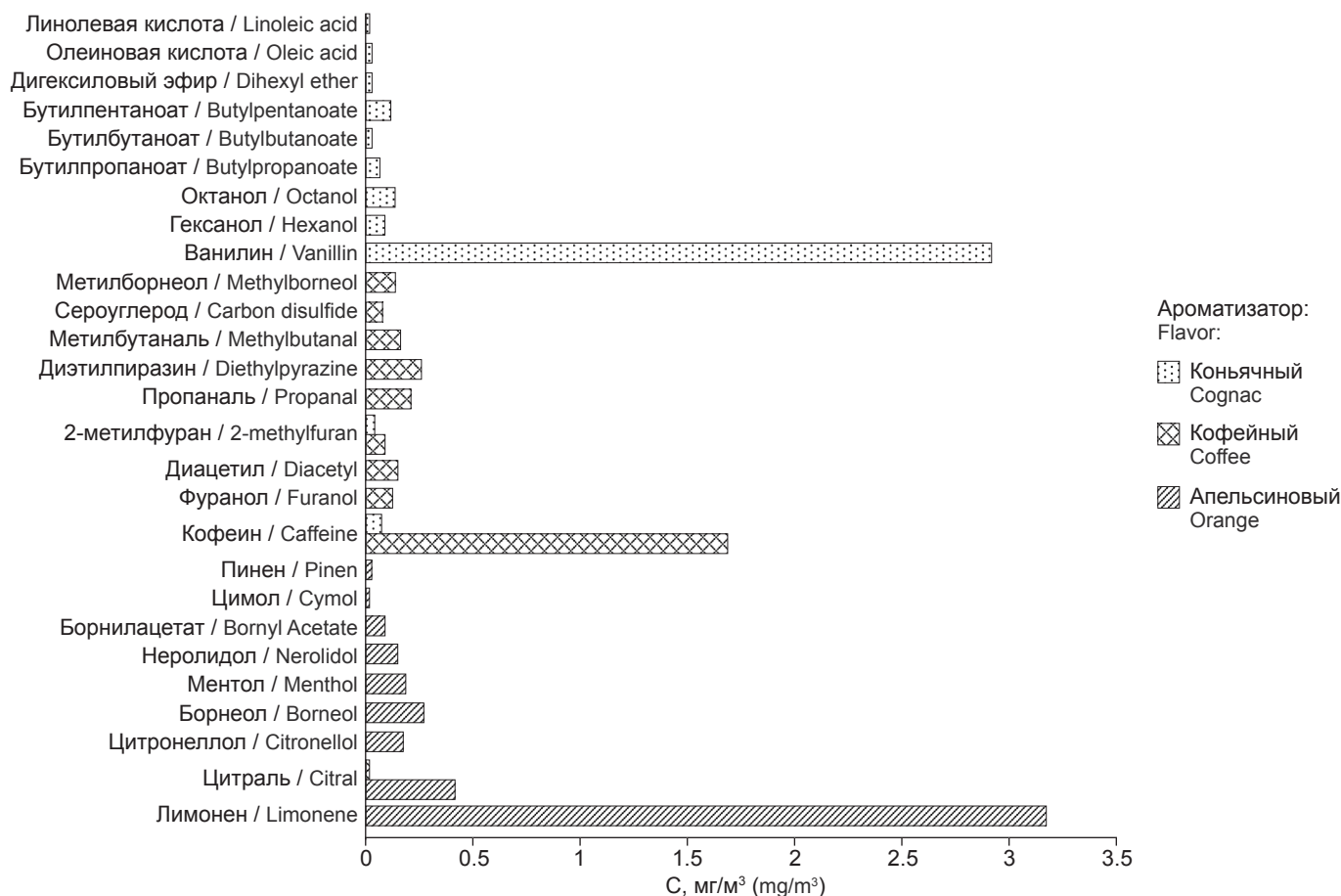


Рис. 1. Основные компоненты воздушной среды мешков с ароматизаторами по результатам хромато-масс-спектрометрического анализа (мг/м³ воздуха).

Fig. 1. Main components of the air inside bags with flavour aerosols according to the results of GC-MS analysis (mg/m³ of air).

стороны, при ольфактометрии время контакта человека с изучаемым одорантом намного ниже продолжительности сеансов ароматерапии (от 5 мин до нескольких часов, обычно 10–30 мин), после которых авторы обнаруживали достоверные изменения клинико-лабораторных показателей в пробах слюны участников экспериментов. Поскольку это исследование позиционировано как одна из возможных моделей влияния запахов на организм человека в городе с развитой пищевой промышленностью, в качестве одорантов выбраны три пищевых ароматизатора.

Таким образом, *цель данного исследования* – определить, может ли воздействие запахов в условиях стандартного ольфакто-одориметрического протокола приводить к изменению биохимических и иммунологических показателей в пробах слюны участников экспериментов. Поскольку это исследование позиционировано как одна из возможных моделей влияния запахов на организм человека в городе с развитой пищевой промышленностью, в качестве одорантов выбраны три пищевых ароматизатора.

Материалы и методы

В проведённых экспериментах использовали апельсиновый и коньячный пищевые промышленные ароматизаторы и кофейный ароматизатор, приготовленный в лабораторных условиях из натурального растворимого кофе. Жидкий ароматизатор в количестве 1 мкл вводили микрошприцем в мешок из налофана объемом 10 л, наполненный чистым воздухом. Содержание летучих компонентов ароматизатора в воздушной среде мешка определяли методом хромато-масс-спектрометрии на газовом хроматографе Agilent 7890A.

С помощью программируемого динамического ольфактометра ЕСОМА Т08 (Германия) участникам подавали

2 серии концентраций летучих компонентов одоранта, запах которого они должны были уловить и оценить в баллах. Первая серия начиналась с неощутимых и заканчивалась пороговыми концентрациями, вторая серия – с неощутимых до максимально достижимых концентраций. Время контакта участника с воздушной смесью на каждом шаге эксперимента составляло 3 с.

На проведение ольфакто-одориметрического исследования получено согласие локального этического комитета ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (протокол № 3 от 17.08.2020 г.). В состав участников включали некурящих лиц обоего пола, прошедших процедуру тестирования остроты обоняния по *n*-бутанолу, согласно Европейскому стандарту EN 13725 [19], для удаления из команды лиц с аномально низкой или аномально высокой остротой обоняния. Число участников в каждом эксперименте ограничивалось объемом налофанового мешка, в котором создавалась исходная концентрация одорантов, и в плановых экспериментах составляло 10 человек.

Пробы свободновытекающей смешанной слюны отбирались у волонтеров трижды: до начала эксперимента, между сериями и по окончании. В таблицах и на графиках они отмечены номерами 1, 2 и 3. Промежуток времени между окончанием каждой серии ольфакто-одориметрического эксперимента и отбором проб слюны составлял около 10 мин, в течение которых участники проходили психологическое анкетирование, измерение пульса и давления. Для измерения биохимических и иммунологических показателей использовали бесклеточную слюнную жидкость после удаления клеток центрифугированием.

Достоверные изменения изученных показателей в пробах слюны участников ольфакто-одориметрических экспериментов
Significant changes of the studied indicators in saliva samples of participants during olfacto-odometric experiments

| Эксперимент Experiment | Достоверно изменявшиеся по- казатели Significantly changed indicators | Среднегрупповые значения показателей Average-group values of indicators <i>Me [Q₁; Q₃]</i> | | | Достоверность межгрупповых различий Significance of intergroup differences <i>p</i> | | |
|---|---|--|---|------------------------------------|---|----------------------|-------------------|
| | | до начала опыта (1) before the start (1) | между сериями (2) between series (2) | по окончании опыта (3) (3 vs 1) | Wilcoxon (2 vs 1) | Wilcoxon (3 vs 1) | Friedman ANOVA |
| | | | | | | | |
| Данные по отдельным ароматизаторам / Data on individual flavours | | | | | | | |
| <i>Апельсиновый ароматизатор / Orange flavour</i> | | | | | | | |
| Эксперимент 1 (осень) Experiment 1 (autumn) <i>n</i> = 10 | α-амилаза, Е/мл α-amylase, U/ml | 97.9 [31.2; 255.3] | 114.3 [15.1; 196.3] | 64.3 [18.5; 110.7] | 0.139 | 0.059 | 0.045* |
| Эксперимент 2 (зима) Experiment 2 (winter) <i>n</i> = 7 | <i>p</i> | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 |
| Оба эксперимента Both experiments <i>n</i> = 17 | <i>p</i> | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 |
| <i>Коньячный ароматизатор / Cognac flavour</i> | | | | | | | |
| Эксперимент 1 (осень) Experiment 1 (autumn) <i>n</i> = 10 | <i>p</i> | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 |
| <i>Кофейный ароматизатор / Coffee flavour</i> | | | | | | | |
| Эксперимент 1 (осень) Experiment 1 (autumn) <i>n</i> = 10 | ИЛ-6, пг/мл IL6, pg/ml | 0.0 [0.0; 6.1] | 0.0 [0.0; 7.1] | 1.1 [0.0; 20.9] | 0.144 | 0.028* | 0.021* |
| Эксперимент 2 (зима) Experiment 2 (winter) <i>n</i> = 8 | <i>p</i> | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 |
| Оба эксперимента Both experiments <i>n</i> = 18 | α-амилаза, Е/мл α-amylase, U/ml | 136.8 [58.2; 227.8] | 111.6 [79.5; 156.0] | 94.4 [51.6; 175.5] | 0.616 | 0.048* | 0.348 |
| Объединение данных по отдельным ароматизаторам / Combining data on individual flavours | | | | | | | |
| Осень / Autumn <i>n</i> = 30 | α-амилаза, Е/мл α-amylase, U/ml | 107.8 [42.5; 206.2] | 103.5 [58.9; 156.0] | 76.0 [18.5; 140.0] | 0.256 | 0.0093* | 0.041* |
| Зима / Winter <i>n</i> = 15 | <i>p</i> | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 |
| Оба сезона / Both seasons <i>n</i> = 45 | α-амилаза, Е/мл α-amylase, U/ml | 109.9 [42.5; 216.7] | 107.0 [70.0; 196.3] | 93.3 [24.3; 160.0] | 0.375 | 0.0096* | 0.024* |

Примечание. * – достоверные значения *p* при уровне значимости 0,05.

Note: * – reliable *p* values at a significance level of 0.05.

Интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) слюны определяли в среде инкубации, содержащей 50 мкМ натриевой соли люминола, 50 мкл/мл слюны и 59 мМ перекиси водорода [20]. Активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (NAG) оценивали по скорости отщепления п-нитрофенола от модельного субстрата 4-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида [21], активность α-амилазы – с помощью клинических тест-наборов «Амилаза-Ново» (ЗАО «Вектор-Бест»). Содержание в слюне секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и интерлейкинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием соответствующих тест-наборов ЗАО «Вектор-Бест».

Математический анализ данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica for Windows v. 7.0. Для оценки достоверности различий использовали два статистических метода, предназначенных для повторных измерений: тест Фридмана (ранговый дисперсионный анализ трёх или более зависимых выборок) и тест Уилкоксона (ранговый попарный анализ зависимых выборок). Особенностью статистических тестов для анализа зависимых выборок является их более высокая чувствительность, что позволяет использовать для повторных измерений относительно небольшие группы людей или животных. С другой

стороны, эти тесты уязвимы с точки зрения проблемы множественных сравнений, в связи с чем при их использовании рекомендуется вводить поправку Бонферрони, заменяя общепринятый уровень значимости $p = 0,05$ на $p = 1 - 0,95^{1/n}$ (в упрощённом варианте – на $0,05/n$), где *n* – количество сравниваемых временных рядов [22].

Результаты

На рис. 1 показаны результаты хромато-масс-спектрометрического анализа проб воздуха из налофановых мешков после введения в них ароматизаторов. Как видно из рисунка, изучаемые ароматизаторы практически не пересекались по составу образующихся аэрозолей. Почти все компоненты аэрозолей, за исключением кофеина и жирных кислот (олеиновой и линолевой), описываются в научной литературе и базах физико-химических данных как вещества с характерными запахами [23–27], при наложении которых возникает специфический многоотный аромат одоранта.

В частности, запах апельсинового ароматизатора определялся в основном цитрусовым запахом лимонена (около 70% общей массы компонентов), на который накладывались запахи лимона (цитраль и цимол), цветочный запах апельсина (неролидол), розы (цитронеллол), хвои (борнеол,

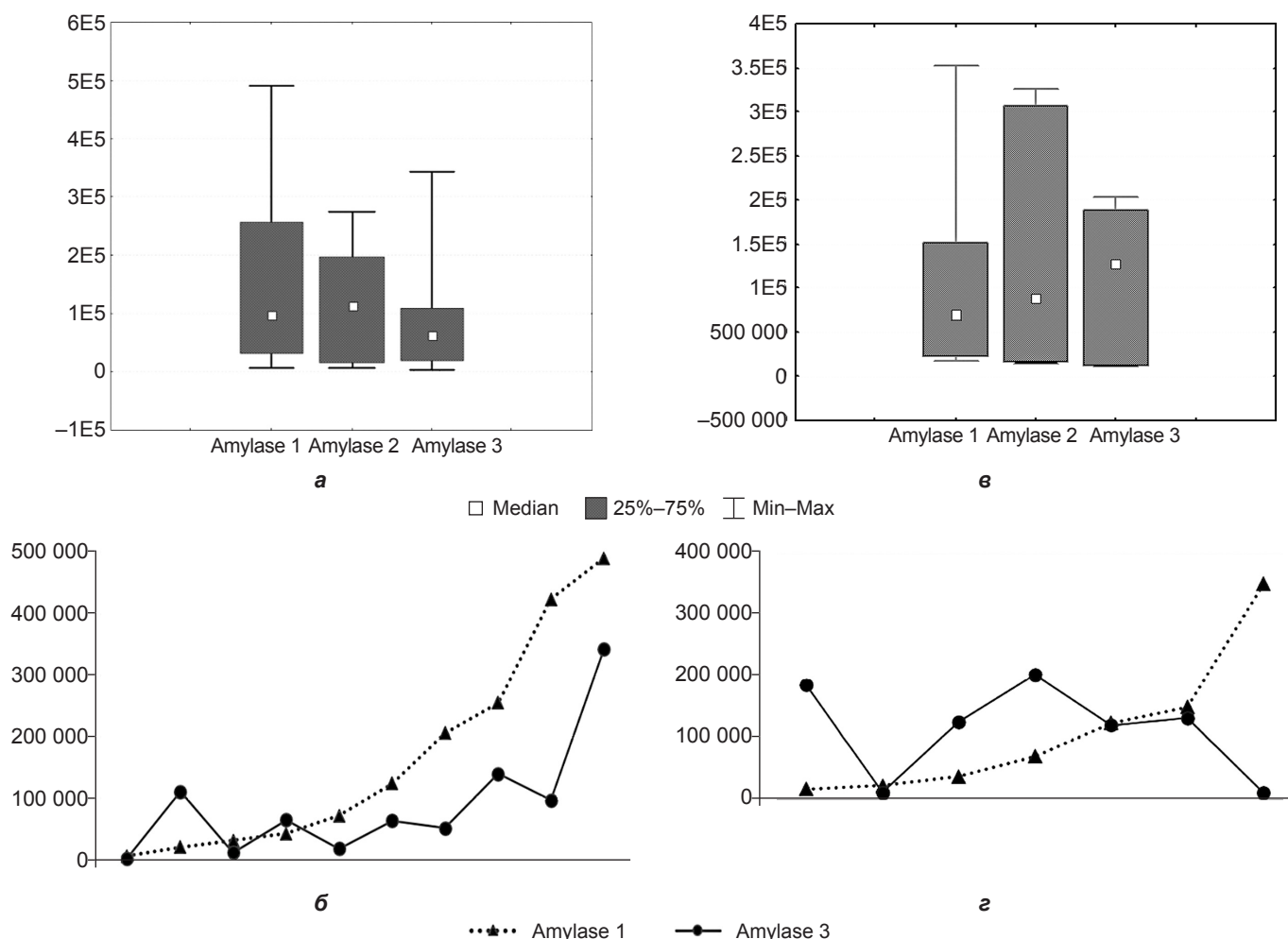


Рис. 2. Изменения активности α -амилазы (Ед/л) в пробах слюны участников планового (а, б) и повторного (в, г) экспериментов с апельсиновым ароматизатором; а, в – среднegrupповые значения (медианы и квартили) до начала опыта (1), между сериями (2) и по окончании опыта (3); б, г – индивидуальные значения с сортировкой участников в порядке возрастания стартовых значений, наблюдавшихся перед опытом.

Fig. 2. Changes in α -amylase activity (U/L) in saliva samples of participants in planned (a, б) and repeat (в, г) experiments with orange flavour; а, в – average values (medians and quartiles) in saliva samples of participants before the start (1), between series (2) and at the end of experiment (3); б, г – individual values; participants were sorted in ascending order of starting values observed before the experiment.

борнилацетат и пинен) и мяты (ментол). Аналогичным образом запах коньячного ароматизатора определялся запахом ванилина (81,5% общей массы) с наложением запахов различных фруктов: цитрусов (октанол), яблок (бутилпропаноат), ананаса (бутилбутаноат), абрикосов (бутилпентаноат) и сладковатого эфирного запаха дигексилового эфира. При введении в налофановый мешок раствора сублимированного кофе основным компонентом аэрозоля оказался не имеющий запаха кофеин (56,5% общей массы), а минорными – органические вещества с запахами клубники (фуранол), сливочного масла (диацетил), шоколада (2-метилфуран), обжаренных продуктов (диэтилпиразин и метилбутаналь) и древесины (метилборнеол). Общее содержание определявшихся органических веществ в воздушной среде налофановых мешков составляло 4,53; 3,57 и 2,94 мг/м³ для апельсинового, коньячного и кофейного ароматизаторов соответственно.

Всего проведено 5 ольфакто-одориметрических экспериментов: три плановых с привлечением одной и той же группы из 10 волонтеров и два повторных для изучения воспроизводимости эффектов, полученных в плановых опытах. Повторные эксперименты отличались от плановых временем года (осень/зима) и уменьшенным количеством участников (7 и 8 человек в опытах с запахами апельсина и кофе соответственно). В таблице приведены данные только для

тех показателей, которые в процессе эксперимента изменялись с достоверностями, близкими к общепринятой границе $p = 0,05$; соответствие результатов введению поправки Бонферрони будет обсуждаться далее в тексте.

Как показано в таблице, в плановом опыте с использованием апельсинового ароматизатора найдено снижение активности α -амилазы в тесте Фридмана ($p = 0,045$), которое адресовано тестом Уилкоксона паре рядов «3 vs 1» (близкие к достоверным различия с $p = 0,059$ между стартовыми значениями активности фермента и значениями через 10 мин после окончания тестирования одоранта). В плановом опыте с использованием кофейного ароматизатора найдено увеличение содержания в слюне волонтеров ИЛ-6 ($p = 0,021$ в тесте Фридмана и $p = 0,028$ для пары «3 vs 1» в тесте Уилкоксона). В обоих случаях эффекты не выдерживали введения поправки Бонферрони (скорректированный уровень значимости $p = 0,05/3 = 0,017$).

В повторных экспериментах с запахами апельсина и кофе ни один из вышеописанных эффектов не воспроизвелся – ни с точки зрения достоверностей различий между активностью α -амилазы и содержанием ИЛ-6 до начала и в конце соответствующих экспериментов (см. таблицу), ни с точки зрения возможного качественного сходства графиков на рис. 2 (а, б) и рис. 2 (в, г).

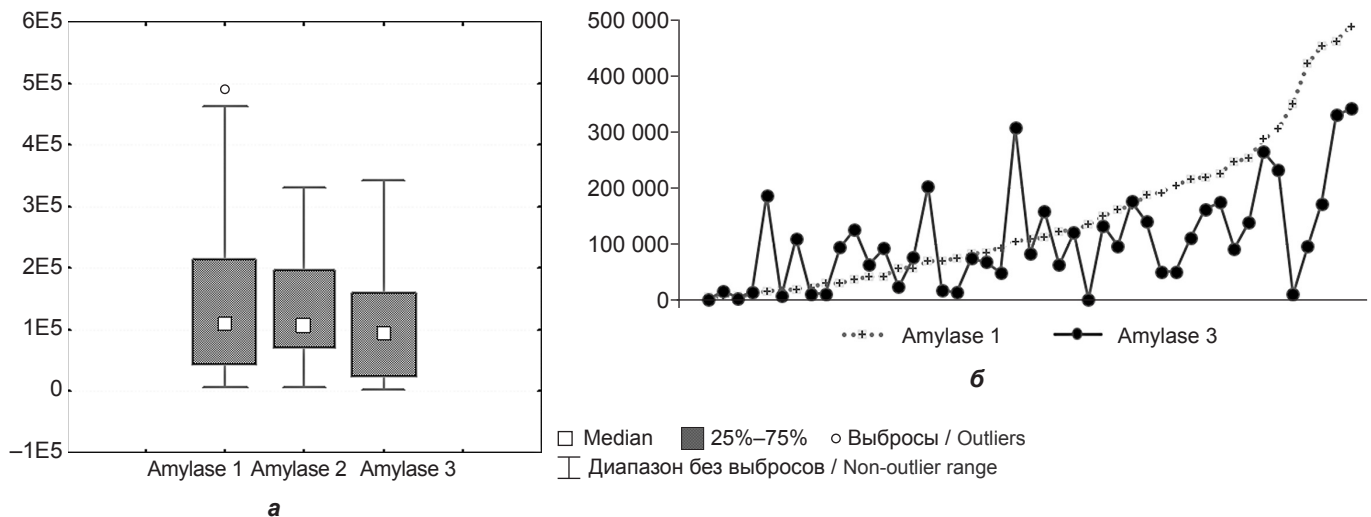


Рис. 3. Активность α -амилазы (Ед/л) в слюне волонтеров после объединения результатов всех 5 экспериментов с тремя использованными пищевыми ароматизаторами; а – среднегрупповые значения (медианы и квартили) до начала опыта (1), между сериями (2) и по окончании опыта (3); б – индивидуальные значения с сортировкой участников в порядке возрастания стартовых значений, наблюдавшихся перед опытом.

Fig. 3. α -Amylase activity (U/L) in saliva samples of participants after combining the results of all 5 experiments with three used food flavours; а – average values (medians and quartiles) before the start (1), between series (2) and at the end of experiment (3); б – individual values; participants were sorted in ascending order of starting values observed before the experiment.

Не найдено достоверного снижения активности α -амилазы в слюне волонтеров и при объединении данных двух опытов с запахом апельсина ($n = 17$; $p = 0,246$), а при объединении данных двух опытов с запахом кофе ($n = 18$) вместо ожидавшегося увеличения содержания ИЛ-6 найдено снижение активности α -амилазы с тем же пограничным значением $p = 0,048$, которое наблюдалось в плановом опыте с апельсиновым ароматизатором. Такие «мигрирующие» по матрице достоверности различий с пограничными значениями p чуть ниже $0,05$ характерны именно для проблемы множественных сравнений, и с введением поправки Бонферрони все они могут трактоваться как случайные.

Тем не менее это впечатление не подтвердилось. Как это видно из таблицы, лимитирующим фактором для достижения уровня значимости различий между активностью α -амилазы в начале и в конце экспериментов является не оттенок запаха пищевого ароматизатора и не возможные сезонные изменения чувствительности организмов волонтеров, а размер выборки. При объединении данных трёх плановых экспериментов ($n = 30$) и всех пяти экспериментов ($n = 45$) достоверность различий между активностью α -амилазы в слюне волонтеров до и после опыта с запасом выдерживает поправку Бонферрони ($p = 0,0093$ и $p = 0,0096$ соответственно). При этом на точечных графиках, один из которых приведён на рис. 3, отчётливо видно, что под снижением средневыворочных статистик (медианы и квартилей, см. рис. 3, а) скрываются разнонаправленные изменения индивидуальных показателей: в сторону увеличения при низких стартовых значениях и в сторону снижения, с доминированием по амплитуде, — при высоких (см. рис. 3, б). Для остальных шести показателей, включая содержание в слюне ИЛ-6 (маркера-кандидата, по результатам планового эксперимента с использованием кофейного ароматизатора), объединение результатов всех экспериментов в одну выборку с $n = 45$ не приводило к появлению достоверных различий между стартовыми значениями и значениями после сеанса ольфактометрии.

Обсуждение

Анализ объединённого массива полученных данных свидетельствует о том, что активность α -амилазы слюны при контакте людей с пищевыми ароматизаторами всё же менялась, но эти изменения определяются как достоверные толь-

ко в достаточно больших выборках по двум причинам: из-за того, что они оказались слабыми (как и ожидали, исходя из времени контакта участников с одорантами), и из-за того, что данный маркер продемонстрировал признаки фенотипического полиморфизма с разнонаправленными изменениями индивидуальных значений в зависимости от их положения в исходном распределении. Для использованных условий стандартного протокола минимальный размер выборки, позволяющий выдержать поправку Бонферрони, составил 30 человек (при объёме налофановых мешков, рассчитанном максимум на 10–12 участников). Следовательно, для изучения влияния запахов на лабораторные показатели в пробах слюны людей нужно прежде всего модифицировать стандартный ольфакто-одориметрический протокол, увеличив время контакта участников с тестируемым ароматизатором.

Точка перегиба разнонаправленных изменений активности α -амилазы в ответ на воздействие одорантов находилась при стартовых значениях около 120 Ед/мл слюны (см. рис. 3, б), что примерно соответствует положению медианы исходного распределения (см. таблицу, 109,9 Ед/мл). Если стартовое значение активности α -амилазы находилось ниже медианы, то оно либо не менялось, либо увеличивалось; если стартовое значение находилось выше медианы, то оно почти всегда снижалось. Эта особенность α -амилазы слюны, до сих пор никем не описанная и сама по себе интересная, имеет ещё и явное отношение к проблемам статистической обработки соответствующих данных.

Статистические тесты для анализа парных выборок (как более простой критерий знаков, так и тест Уилкоксона, учитывающий степень отклонения переменных от исходных значений) основаны на представлении о том, что при отсутствии воздействия будут видны случайные флуктуации изучаемой величины, то есть равные или близкие к равным суммарные отклонения в сторону увеличения и снижения. Напротив, при наличии воздействия будут преобладать сдвиги либо в сторону увеличения значений, либо в сторону их снижения. При этом пары с нулевыми сдвигами выбывают из анализа, а разнонаправленные изменения «гасят» друг друга, поскольку по определению разнонаправленность сдвигов рассматривается как проявление случайных флуктуаций.

Иными словами, тесты для зависимых выборок априори не рассчитаны на показатели, которые при воздействии могут изменяться в противоположных направлениях. В частно-

сти, при использовании теста Уилкоксона в наших экспериментах определена не достоверность изменений активности α -амилазы у всех членов выборки, а достоверность различий между её суммарным снижением у людей с более высокими исходными значениями и суммарным увеличением у людей с более низкими. Эта величина в свою очередь зависит от соотношения в выборке людей с противоположной реакцией на воздействие, которое в маленьких выборках может колебаться очень сильно (см. рис. 2, б, з) и только в достаточно больших (см. рис. 3, б) будет близким к среднепопуляционному значению. Специальных статистических тестов для таких переменных нет, и проблемы будут преодолены только после того, как станет понятной причина разнонаправленных изменений.

То, что на текущий момент известно о генетическом полиморфизме α -амилазы слюны, её свойствах и влияющих на неё факторах, не объясняет характера выявленной закономерности: α -амилаза слюны (α -1,4- α -D-глюкан-4-глюкогидролаза, ЕС 3.2.1.1) – пищеварительный фермент, роль которого заключается в расщеплении высокомолекулярных углеводов пищи (крахмала, гликогена и т. п.) до более коротких углеводов, таких как декстрины и мальтоза. Этот фермент синтезируется слюнными железами под контролем симпат-адреналовой системы организма. Активность α -амилазы слюны зависит от количества копий гена *AMY1* [28, 29] и широкого круга эпигенетических факторов: характера питания, включая долю углеводов и текстуру пищевых продуктов [30–32], циркадных ритмов [33, 34], психологического и физиологического стресса [35–37], спортивных нагрузок [38], общего состояния полости рта и зубов [39] и др. Противоположные изменения активности α -амилазы слюны описаны только при сравнении реакции мужчин и женщин на острый холодовой стресс: у женщин активность α -амилазы в слюне увеличивалась, у мужчин – снижалась [37]. Однако найденную в настоящем исследовании зависимость нельзя объяснить половыми различиями, поскольку в группе участников было всего двое мужчин, и значения активности α -амилазы в пробах их слюны ничем не выделялись из других.

С другой стороны, опираясь на полученные данные (см. рис. 3, а) и аппроксимируя их на натурные исследования,

можно достаточно уверенно предположить, что снижение средневыборочных значений активности α -амилазы слюны с характерным опережающим сдвигом вниз верхнего квартиля является признаком рефлекторной реакции населения на воздействие компонентов выбросов, обладающих запахом, – по крайней мере в районах расположения предприятий пищевой промышленности. Отсутствие таких изменений в проведенном ранее обследовании детей в городе с развитой пищевой промышленностью [4] не является противоречием, поскольку рефлекторные реакции реализуются только в момент непосредственного воздействия стимула.

Ограничения данного пилотного исследования связаны с тем, что оно было проведено в рамках стандартного ольфакто-одориметрического протокола при теоретической возможности перепрограммирования ольфактометра в направлении увеличения времени экспозиции.

Заключение

1. Использование ольфакто-одориметрии для изучения влияния запахов на неинвазивные показатели состояния организма человека перспективно, но требует разработки протоколов с увеличенным временем экспозиции.

2. Снижение средневыборочных значений активности α -амилазы слюны с характерным опережающим сдвигом вниз верхнего квартиля может быть признаком рефлекторной реакции населения на выброс компонентов, обладающих запахом, в районах расположения предприятий пищевой промышленности.

3. Впервые показано, что запах пищевых ароматизаторов вызывает увеличение активности α -амилазы слюны у людей с более низкими фоновыми значениями (ниже медианы исходного распределения) и уменьшение – у людей с более высокими (выше медианы). Выявленная закономерность снижает мощность статистических тестов, но может оказаться интересной отправной точкой при изучении способности людей воспринимать запахи и реагировать на них. Актуальность этого направления исследований значительно возросла в период пандемии COVID-19.

Литература

(п. п. 5–14, 16, 19, 24–35 см. References)

- Семутникова Е.Г., Яровая С.К. Предложения по координации действий природоохранных органов исполнительной власти в решении проблемы запахов от промышленных предприятий. *Сборник докладов Международной конференции «Актуальные вопросы оценки и регулирования запаха»*. М.; 2006: 64–8.
- Бударина О.В., Сабирова З.Ф., Шипулина З.В. Анализ международного опыта изучения влияния загрязнения атмосферного воздуха запахом на здоровье населения (обзор литературы). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019; 5: 88–92.
- Карелин А.О., Ломтев А.Ю., Фридман К.Б., Еремин Г.Б., Панькин А.В. Выявление источников выбросов загрязняющих веществ, вызывающих жалобы населения на неприятные запахи. *Гигиена и санитария*. 2019; 6: 601–7.
- Хрипач Л.В., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Маковецкая А.К., Коганова З.И. и др. Скрининг и пост-скрининг маркеров загрязнения атмосферного воздуха в пробах слюны детей дошкольного возраста. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(6): 610–17. <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-6-610-617>
- Вахрушев С.Г., Сибатян А.С. Диагностическая ценность различных методов ольфактометрии. *Российская оториноларингология*. 2016; 3(82): 48–53.
- Савватеева Д.М., Лопатин А.С. Диагностика и лечение обонятельной дисфункции у больных острым риносинуситом. *Российская ринология*. 2010; 2: 8–11.
- Алексеева Н.С., Пономарева Т.А. Диагностика нарушений обоняния с помощью Сниффинг Стикс-теста при болезни Паркинсона и полипозном риносинусите. *Вестник оториноларингологии*. 2014; 1: 37–40.
- Хрипач Л.В. Применение свободнорадикальных методов для оценки влияния полихлорированных диоксинов и фуранов на состояние здоровья населения. *Гигиена и санитария*. 2002; 2: 72–6.
- Покровский А.А., Кравченко Л.В., Тутьляев В.А. Влияние афлатоксина и митомицина С на активность лизосомальных ферментов. *Биохимия*. 1971; 36(4): 690–6.
- Гржибовский А.М., Иванов С.В., Горбатова М.А. Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. *Наука и здравоохранение*. 2016; 5: 5–29.
- Пелоси П. *Обоняние. Увлекательное погружение в науку о запахах*. М.: КоЛибри; 2020. 304 с.

References

- Semutnikova E.G., Yarovaia S.K. Proposals for coordinating the actions of environmental executive authorities in solving the problem of odors from industrial enterprises. *Sbornik докладov Mezhdunarodnoy konferentsii «Aktual'nye voprosy ocenki i regulirovaniya zapakha» (Collection of Reports of the International Conference «Topical issues of odor assessment and regulation»)*. М.; 2006: 64–8. (In Russian)
- Budarina O.V., Sabirova Z.F., Shipulina Z.V. Analysis of international experience in studying the effect of atmospheric air pollution by smell on public health (literature review). *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij (International journal of applied and fundamental research, Russian journal)*. 2019; 5: 88–92. (In Russian)
- Karelin A.O., Lomtev A.Yu., Friedman K.B., Yeremin G.B., Pankin A.V. Identification of emission sources of pollutants causing complaints of unpleasant odours. *Gigiena I Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019; 98(6): 601–7. (In Russian)
- Khripach L.V., Knyazeva T.D., Zheleznyak E.V., Makovetskaya A.K., Koganova Z.I., Budarina O.V. et al. Screening and post-screening of air pollution markers in mixed saliva of preschool children. *Gigiena I Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(6): 610–17. (In Russian). <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-6-610-617>
- Atsumi T., Tonosaki K. Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. *Psychiatry research*. 2007; 150(1): 89–96.

6. Shiina Y., Funabashi N., Lee K., Toyoda T., Sekine T. et al. Relaxation effects of lavender aromatherapy improve coronary flow velocity reserve in healthy men evaluated by transthoracic Doppler echocardiography. *J. Cardiol.* 2008; 129: 193–7.
7. Polonini H., Mesquita D., Lanine J., Dijkers E., Gkinis S., Raposo N.R.B., de Oliveira Ferreira A. Intranasal use of lavender and fennel decreases salivary cortisol levels and improves quality of sleep: a double-blind randomized clinical trial. *European Journal of Integrative Medicine.* 2020; 34: 101015. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.101015>
8. Toda M., Morimoto K. Effect of lavender aroma on salivary endocrinological stress markers. *Arch. Oral Biol.* 2008; 53: 964–8. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.04.002>
9. Takagi C., Nakagawa S., Hirata N. et al. Evaluating the effect of aromatherapy on a stress marker in healthy subjects. *J. Pharm. Health Care Sci.* 2019; 5: 18. <https://doi.org/10.1186/s40780-019-0148-09>
10. Yamaguchi M., Tahara Y., Kosaka S. Influence of concentration of fragrances on salivary alpha-amylase. *J. Cosmet. Sci.* 2009; 31: 391–5. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00507.x10>
11. Pasyar N., Rambod M., Araghi F. (2020). The effect of bergamot orange essence on anxiety, salivary cortisol, and alpha amylase in patients prior to laparoscopic cholecystectomy: A controlled trial study. *Complementary Therapies in Clinical Practice.* 2020; 39: 101153. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2020.101153>
12. Odours and Human Health. Environmental Public Health Science Unit, Health Protection Branch, Public Health and Compliance Division, Alberta Health, Edmonton, Alberta. 2017. Available at <https://open.alberta.ca/dataset/04b23f8e-ee1-48bb-b69c-2625ab6a2a08-/resource/b87aeb58-f1f7-4c70-a07e-6440f0b1d613/download/Odours-and-Human-Health-2017-FINAL.pdf>
13. Masuo Y., Satou T., Takemoto H., Koike K. Smell and Stress Response in the Brain: Review of the Connection between Chemistry and Neuropharmacology. *Molecules.* 2021; 26: 2571. <https://doi.org/10.3390/molecules26092571>
14. Klein B., Bautze V., Maier A.-M., Deussing J., Breer H., Strotmann J. Activation of the mouse odorant receptor 37 subsystem coincides with a reduction of novel environment-induced activity within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 2015; 41: 793–801.
15. Vakhrushev S.G., Smbatyan A.S. Diagnostic value of different olfactometry methods. *Rossiyskaya Otorinolaringologiya (Russian Otorhinolaryngology, Russian journal).* 2016; 15(3): 48–53. (In Russian).
16. Rumeau C., Nguyen D.T., Jankowski R. How to assess olfactory performance with the Sniffin' Sticks test(®). *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* 2016; 133(3): 203–6.
17. Savvateeva D.M., Lopatin A.S. Diagnosis and treatment of the olfactory dysfunction in patients with acute rhinosinusitis. *Rossiyskaya Rinologiya (Russian Rhinology, Russian journal).* 2010; 2: 8–11. (In Russian)
18. Alekseeva N.S., Ponomareva T.A. Diagnostics of olfactory disorders in the patients with parkinson's disease and polypous sinusitis with the use of the Sniffin' Sticks test. *Vestnik Oto-Rino-Laringologii (Bulletin of Otorhinolaryngology, Russian journal).* 2014; 1: 37–40. (In Russian)
19. European committee for standardisation. *Air quality – Determination of odour concentration by dynamic olfactometry.* European standard EN 13725: 2003. 70 p.
20. Khripach L.V. Application of free radical methods to assess the effect of polychlorinated dioxins and furans on the health status of the population. *Gigiena I Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal).* 2002; 2: 72–6. (In Russian)
21. Pokrovsky A.A., Kravchenko L.V., Tutelyan V.A. Effect of aflatoxin and mitomycin C on the activity of lysosomal enzymes. *Biokhimiya (Biochemistry, Russian journal).* 1971; 36(4): 690–6. (In Russian)
22. Grjibovski A.M., Ivanov S.V., Gorbatova M.A. Analysis of quantitative data in three or more independent groups using Statistica and SPSS software: parametric and non-parametric tests. *Nauka i zdravoohraneniye (Science and health care, Kazakhstan journal).* 2016; 5: 5–29. (In Russian)
23. Pelosi P. *On the Scent: A journey the science of smell.* M.: KoLibri; 2020. 304 p. (In Russian)
24. Belitz H.D., Grosch W. (1999) Aroma Substances. In: *Food Chemistry.* Springer, Berlin, Heidelberg; 1999: 319–77. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-07281-3-6>
25. Flament I., Bessièrre-Thomas Y. *Coffee flavor chemistry.* New York: Wiley; 2002. 410 p.
26. Nebesny E., Budryn G., Kula J., Majda T. The effect of roasting method on headspace composition of robusta coffee bean aroma. *European Food Research and Technology.* 2007; 225(1): 9–19. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0375-0>
27. Caldeira I., Mateus A.M., Belchior A.P. Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrels. *Analytica chimica acta.* 2006; 563(1–2): 264–73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.008>
28. Oppenheim F.G., Salih E., Siqueira W.L., Zhang W., Helmerhorst E.J. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1098: 22–50.
29. Carpenter D., Mitchell L., Armour J. Copy number variation of human AMY1 is a minor contributor to variation in salivary amylase expression and activity. *Human Genomics.* 2017; 11: 2. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0097-3>
30. Santos J.L., Saus E., Smalley S.V., Cataldo L.R., Alberti G., Parada J., Gratacòs M., Estivill X. Copy Number Polymorphism of the Salivary Amylase Gene: Implications in Human Nutrition Research. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics.* 2012; 5: 117–31.
31. Morquecho-Campos P., Bikker F.J., Nazmi K., de Graaf K., Laine M.L., Boesveldt S. A stepwise approach investigating salivary responses upon multisensory food cues. *Physiology & Behavior.* 2020; 226: 113116. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113116>
32. Mandel A.L., Peyrot des Gachons C., Plank K.L., Alarcon S., Breslin P.A. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary α -amylase levels, and the perception of oral starch. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013352>
33. Wingenfeld K., Schulz M., Damkroeger A., Philippsen C., Rose M., Driessen M. The diurnal course of salivary alpha-amylase in nurses: an investigation of potential confounders and associations with stress. *Biol. Psychol.* 2010; 85(1): 179–81.
34. Lim P.W., Nambiar S., Muhardi L., Abdul Kader U.H., Garssen J., Sandalova E. Young Children Display Diurnal Patterns of Salivary IgA and Alpha-Amylase Expression Which Are Independent of Food Intake and Demographic Factors. *Biomed Res. Int.* 2019; 2019: 1–11.
35. Rohleder N., Nater U.M., Wolf J.M., Ehlert U., Kirschbaum C. Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1032: 258–63.
36. Takai N., Yamaguchi M., Aragaki T., Eto K., Uchihashi K., Nishikawa Y. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch. Oral Biol.* 2004; 49(12): 963–8.
37. Carr A., Scully A., Webb M., Felmingham K. (2015). Gender differences in salivary alpha-amylase and attentional bias towards negative facial expressions following acute stress induction. *Cognition & Emotion.* 2015; 30: 1–10. <https://doi.org/10.1080/02699931.2014.999748>
38. Koibuchi E.R., Suzuki Y. Exercise upregulates salivary amylase in humans. *Exp. Therap. Medicine.* 2014; 7(4): 773–7.
39. Ahmadi-Motamayel F., Goodarzi M.T., Jamshidi Z., Mahdavinzhad A., Rafeian N. (2016). Evaluation of salivary and serum alpha amylase level in dental caries of adolescence. *Brazilian Dental Science.* 2016; 19(2): 40–6.