

УДК 576.8.078: 663.1

## **ПРИМЕНЕНИЕ ДИСПЕРСИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ КОСМОНАВТОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТАХ И ОБСЛЕДУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ**

**Носовский А.М., Соловьева З.О., Ильин В.К.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр РФ – Институт медико – биологических проблем Российской академии наук, Москва, E-mail collega1952@yandex.ru*

Дисперсионный анализ (ANOVA), давно приобрёл статус одного из самых используемых методов статистического анализа в биологии и медицине. Целью данной работы явилось использование дисперсионного анализа для оценки результатов исследований иммунологических показателей в десневой жидкости космонавтов при длительных космических полетах и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии. Космический полет (КП) оказывает существенное влияние на различные системы человеческого организма, включая и систему иммунитета. В двух модельных экспериментах «сухая» иммерсия участники подвергались воздействию эффекта невесомости. Воздействие на человека специфического комплекса факторов, присущих условиям КП, может приводить к изменению некоторых показателей функционального состояния полости рта и развитию воспалительных изменений слизистой полости рта и десен. В формировании резистентности полости рта существенная роль принадлежит десневой жидкости. Исследование местного иммунитета включало определение количества иммуноглобулинов в десневой жидкости и наличие пародонтопатогенных видов микроорганизмов в полости рта участников 5 экспедиций на Международную космическую станцию (МКС) и 14 человек, находившихся в условиях 5-суточной «сухой» иммерсии. Забор проб производился: при иммерсии на 1-е сутки, на 5-е сутки и на 7-е сутки по окончании иммерсии; при КП на 60-е, 14-е сутки до старта, единожды в период полета за 1-2 суток до отправления пробоотборников на Землю, на 1-е, 7-е сутки после посадки. Пробы отбирались стерильными тампонами из 8 точек. При изучении иммунологических показателей обследуемых учитывалось содержание иммуноглобулинов классов sIgA, IgA и IgM в десневой жидкости. Обработка полученного материала проводилась с помощью иммунохимических методов исследования. Качественный состав основных пародонтопатогенных видов микроорганизмов определялся применяя современные методы молекулярно-биологического исследования. Показана корректность применения дисперсионного анализа при оценке данных о динамике содержания иммуноглобулинов в десневой жидкости космонавтов при длительных космических полетах и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии. Характер изменения содержания иммуноглобулинов (sIgA, IgA, IgM) в десневой жидкости у обследуемых может говорить о возможности возникновения воспалительного процесса в тканях пародонта. Также обнаружено наличие в ротовой полости обследуемых основных пародонтопатогенных видов – *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*. Полученные данные о содержании иммуноглобулинов в десневой жидкости и состоянии микробиоценоза полости рта могут быть использованы для выявления групп риска развития воспалительных заболеваний пародонта под влиянием экстремальных факторов и для выработки адекватных средств профилактики.

**Ключевые слова:** дисперсионный анализ, МКС, «сухая» иммерсия, ткани пародонта, пародонтопатогенная микрофлора, нарушения колонизационной резистентности пародонта, иммунологические показатели

## **APPLICATION OF THE ANALYSIS OF VARIANCE FOR AN ESTIMATION OF CHANGE OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN GINGIVAL FLUID OF THE COSMONAUTS AT LONG SPACE FLIGHTS AND SURVEYED IN CONDITIONS «DRY» IMMERSION**

**Nosovsky A.M., Solovieva Z.O., Ilyin V.K.**

*State Scientific Center of Russian Federation-Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Sciences, Moscow, E-mail collega1952@yandex.ru*

The analysis of variance (ANOVA), for a long time has got the status of one of the most used methods of the statistical analysis in biology and medicine. The purpose of this work was the use of analysis of variance to assess the results of studies of immunological parameters in the gingival fluid of the cosmonauts at long space flights and surveyed in conditions “dry” immersion. Space flight has a significant impact on the various systems of the human body, including the immune system. Two model experiments “dry” immersion of the participants were exposed to zero gravity effect. Human exposure to a unique combination of factors specific to the conditions of the space flight, can lead to a change of some indicators of the functional state of the oral cavity and the development of inflammatory changes of the oral mucosa and gums. The development of resistance of the mouth plays a significant role gingival fluid. A study of local immunity included a determination of the amount of immunoglobulins in the gingival fluid and the presence of the parodontopathogen species of microorganisms in the mouth of members 5 expeditions to the International Space Station (ISS) and the 14 people who were in a 5-day “dry” immersion. Sampling was carried out: the immersion on day 1, on day 5 and day 7 by the end of the immersion; space flight at 60 th, 14 th day before the start, once in the flight period of 1-2 days before departure samplers on Earth, on the 1 st, 7 th day after planting. Samples were collected with sterile swabs of 8 points. In the study of immunological parameters surveyed consider the contents of the immunoglobulin classes sIgA, IgA, and IgM in the gingival fluid. Treatment of the resulting material was carried out using immunochemical methods. Qualitative composition parodontopathogeny

species of microorganisms was determined using modern methods of molecular biological studies (PCR). Statistical data processing was spent by the two-factorial dispersive analysis. The correctness of application of the analysis of variance is shown at an estimation of data about dynamics of the content of immunoglobulins in the gingival fluid of the cosmonauts at the long space flights and surveyed in conditions "dry" immersion. The nature of changes in the content of immunoglobulin (sIgA, IgA, IgM) in the gingival fluid of subjects can talk about the possibility of inflammation in the periodontal tissues. It is also detected the presence in the oral cavity surveyed parodontopatogennyh basic types-Prevotella intermedia, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis. The data on the content of immunoglobulins in the gingival fluid and state microbiocenosis oral cavity can be used to identify groups at risk of inflammatory periodontal diseases under the influence of extreme factors and for developing adequate means of prevention.

**Keywords: analysis of variance, ISS, "dry" immersion, the periodontal tissues, parodontopatogennyh microflora, periodontal colonial resistance disorders, immunological parameters**

Дисперсионный анализ (ANOVA), давно приобрёл статус одного из самых используемых методов статистического анализа в биологии и медицине.

В данной работе рассматривается возможность использования дисперсионного анализа для обработки результатов исследований иммунологических показателей участников 5 экспедиций на Международную космическую станцию (МКС) и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии (2 эксперимента).

Особенностью проводимых нами исследований иммунологических показателей является наличие малых выборок значений иммуноглобулинов. Наряду с этим полученные результаты исследований являются важными данными для понимания состояния полости рта обследуемых и для принятия своевременных мер для обеспечения инфекционной безопасности членов экипажей длительно действующих орбитальных станций [3]. В формировании защитных механизмов ведущее место принадлежит иммунологической защите полости рта и микробиоценозу, имеющему важное значение в защите полости рта от патогенной микрофлоры.

Возможность развития неблагоприятных изменений в тканях пародонта экипажей космических кораблей была подтверждена при осуществлении модельных исследований с участием обследуемых [1, 6, 9].

Поэтому, важное значение имеет выбор метода математической статистики для обработки результатов исследований. Не всегда получается объединить казалось бы одинаковые исследования, такие как, «сухая» иммерсия, что становится понятным проведя определенную статистическую обработку полученных данных.

Целью данной работы явилось использование дисперсионного анализа для оценки результатов исследований иммунологических показателей в десневой жидкости космонавтов при длительных космических полетах и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии.

## Материалы и методы

Изучалось содержание иммунологических показателей в десневой жидкости и пародонтопатогенных видов микроорганизмов в полости рта участников 5 экспедиций на МКС и 14 добровольцев, находившихся в условиях 5-суточной «сухой» иммерсии.

При проведении исследований пробы десневой жидкости отбирались в следующих местах: снаружи между 1 и 2 резцами справа, слева, на верхней и нижней челюсти. Пробы отбирались стерильным тампоном, который прикладывался к месту отбора на 2 минуты. Забор микробиологических проб осуществлялся с зубной бляшки 7-го зуба справа и слева на верхней и нижней челюсти, языка, буккального эпителия, глотки и неба с помощью пробоотборников.

В рамках клинико-физиологических обследований исследования иммунологических показателей в десневой жидкости проводили на 90-е, 60-е, 14-е сутки до старта, в процессе полета, на 1-е, 7-е сутки после посадки. В те же сроки осуществляли микробиологические обследования. При проведении «сухой» иммерсии эти же пробы брались на 1-е сутки, на 5-е сутки и на 7-е сутки по окончании иммерсии.

При изучении иммунологических показателей обследуемых учитывалось содержание иммуноглобулинов классов sIgA, IgA и IgM в десневой жидкости. Для определения иммуноглобулинов использовался иммуноферментный метод анализа (ИФА). Применялись наборы реагентов «IgA общий-ИФА-Бест», «IgM общий-ИФА-Бест», «IgA секреторный-ИФА-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Качественный состав основных пародонтопатогенных видов микроорганизмов определялся применяя полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция являются одними из самых распространенных лабораторных диагностических методов [5]. Все исследования проводились натощак, перед чисткой зубов.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета Statgraphics Plus 5.1.

**Результаты и обсуждения**

При обработке данных были проанализированы следующие факторы, влияющие на результаты исследования:

- индивидуальный фактор, под которым подразумеваются участники эксперимента (5, 8, 6 человек);
- временной фактор, под которым подразумеваются сроки отбора проб (сут);
- фактор локализации, под которым подразумеваются исследуемые точки отбора проб (8 точек);
- фактор эксперимента, под которым подразумеваются проводимые эксперименты (3 эксперимента).

Результаты исследования являются индивидуальными для каждого обследуемого.

В ранее проведенных нами исследованиях была показана необходимость проверки малых выборок экспериментальных данных на однородность по дисперсии [4, 7, 8]. В представленной работе мы определяли однородность по структуре данных при многомерном шкалировании. Для малых выборок экспериментальных данных однородность по структуре важнее, чем однородность по дисперсии. Анализируемые данные не являются однородными по структуре.

При рассмотрении факторов (временного, локализации, эксперимента) отмечено различное их влияние на результаты исследований, что показано в табл. 1, 2.

Вклад каждого фактора измеряется устранив влияние всех других факторов. Показана статистическая значимость каждого из факторов. Там где Р-значение менее 0,05 факторы оказывают статистически значимое влияние на значения иммуноглобулинов на уровне достоверности 95,0%.

Так как, статистически значимыми чаще оказываются временной фактор и фактор

эксперимента, то для них приводятся примеры графического представления результатов рис. 1, 2 соответственно.

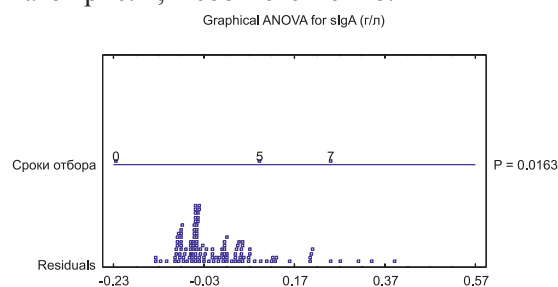


Рис. 1. Пример влияния временного фактора на результаты исследований в иммерсии 1 для sIgA [г/л].

По горизонтальной оси - распределение остатков значений sIgA. Количество обследуемых n=5.

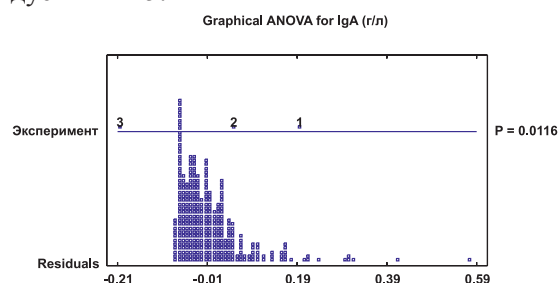


Рис. 2. Пример влияния фактора эксперимент на результаты исследований для иммуноглобулина IgA [г/л].

По горизонтальной оси - распределение остатков значений IgA. Количество обследуемых n=5.

Из рис. 1 видно, что для иммуноглобулина sIgA влияние временного фактора на исследование является значимым (p=0.0163). Значимо различны результаты исследований на 0 сутки и после окончания иммерсии на 7 сутки.

**Таблица 1**

Влияние факторов (временного, локализации) на результаты исследования.

Факторы	Исследования								
	Иммерсия 1			Иммерсия 2			КП		
	sIgA	IgA	IgM	sIgA	IgA	IgM	sIgA	IgA	IgM
	P-значение			P-значение			P-значение		
Сроки отбора проб	0.0163*	0.6996	0.1466	0.6630	0.0034	0.2000	0.0282*	0.0001*	0.0001*
Точки отбора проб	0.8640	0.2231	0.0011*	0.6779	0.0248	0.1816	0.8938	0.9182	0.7432

**Таблица 2**

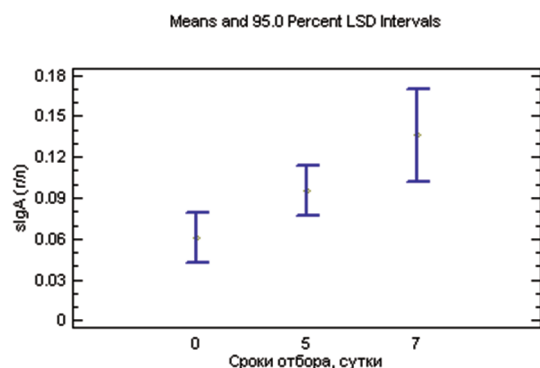
Влияние фактора (эксперимента) на результаты исследования.

Фактор	sIgA	IgA	IgM
	P-значение		
Эксперимент	0.0722	0.0116*	0.0043*

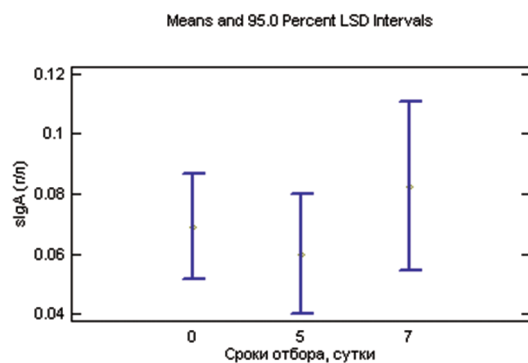
\* - p < 0,05.

Из рис. 2 видно, что для иммуноглобулина IgA влияние фактора эксперимент на исследование является значимым ( $p=0.0116$ ). Значимо различны результаты исследований в условиях иммерсии 1 и 2 (точки 1, 3). Следовательно, данные по значениям иммуноглобулинов, полученные в двух разных иммерсиях, объединять было бы не корректно.

**А. «Сухая» иммерсия 1. Количество обследуемых  $n=8$**



**Б. «Сухая» иммерсия 2. Количество обследуемых  $n=6$**



**В. КП. Количество обследуемых  $n=5$**

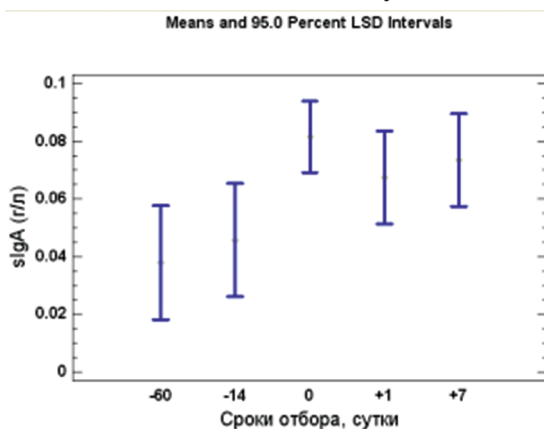
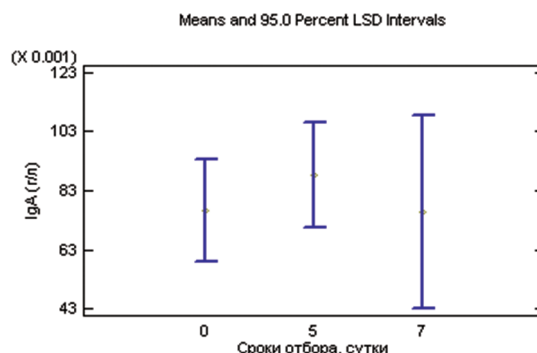


Рис. 3. Содержание иммуноглобулина класса sIgA в десневой жидкости космонавтов (В) и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии (А, Б)

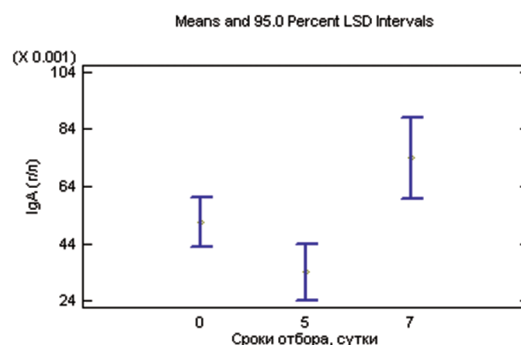
По горизонтальной оси – сроки отбора проб; По вертикальной оси - уровень содержания sIgA [г/л].

Теперь рассмотрим характер изменений значений иммуноглобулинов в исследованиях (рис. 3, 4, 5). Содержание иммуноглобулина класса sIgA в десневой жидкости космонавтов и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии в различные сроки исследования представлено на рис. 3. Норма содержания sIgA в слюне по данным Вектор-Бест составляет 0,1153-0,2997 [г/л].

**А. «Сухая» иммерсия 1. Количество обследуемых  $n=8$**



**Б. «Сухая» иммерсия 2. Количество обследуемых  $n=6$**



**В. КП. Количество обследуемых  $n=5$**

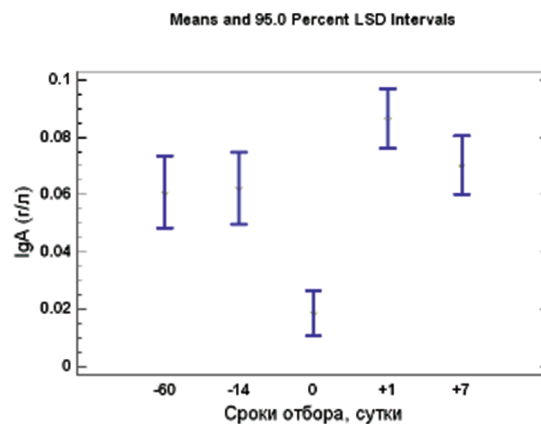
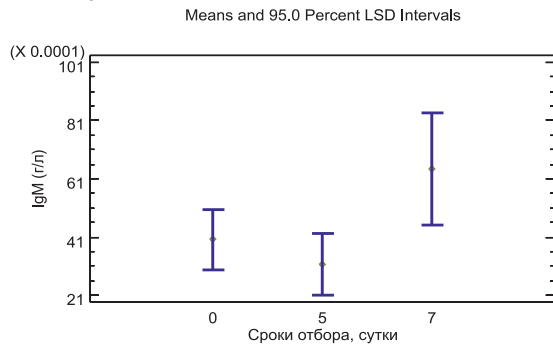


Рис. 4. Содержание иммуноглобулина класса IgA в десневой жидкости космонавтов (В) и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии (А, Б)

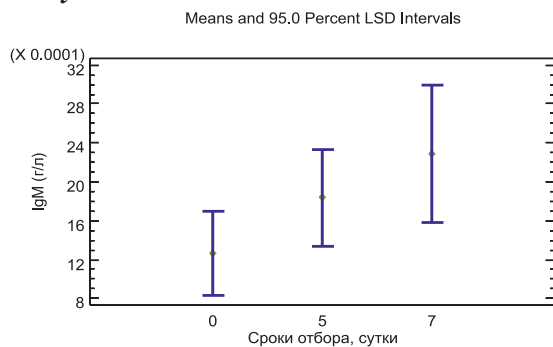
По горизонтальной оси – сроки отбора проб; По вертикальной оси - уровень содержания IgA [г/л].

Содержание иммуноглобулина класса IgA в десневой жидкости космонавтов и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии в различные сроки исследования представлено на рис. 4. Норма содержания IgA в слюне по данным Вектор-Бест составляет  $0,069 \pm 0,028$  [г/л].

**А. «Сухая» иммерсия 1. Количество обследуемых n=8**



**Б. «Сухая» иммерсия 2. Количество обследуемых n=6**



**В. КП. Количество обследуемых n=5**

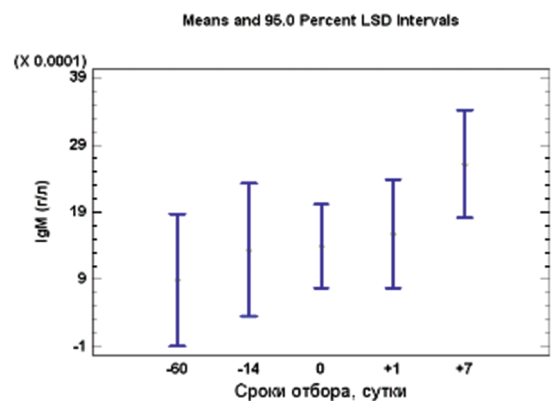


Рис. 5. Содержание иммуноглобулина класса IgM в десневой жидкости космонавтов (В) и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии (А, Б)

По горизонтальной оси – сроки отбора проб; По вертикальной оси - уровень содержания IgA [г/л].

Содержание иммуноглобулина класса IgM в десневой жидкости космонавтов и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии в различные сроки исследования представлено на рис. 5. Норма содержания IgM в слюне по данным Вектор-Бест составляет  $0,055 \pm 0,011$  [г/л].

Таким образом, можно определить несколько направлений изменения содержания иммунологических показателей в десневой жидкости космонавтов и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии. Первое направление — содержание иммуноглобулинов постоянно возрастает (sIgA в иммерсии 1, IgM в иммерсии 2). Второе направление — содержание иммуноглобулинов уменьшается с последующим увеличением в конце исследования (sIgA в иммерсии 2, IgA в иммерсии 2 и КП, IgM в иммерсии 1). Третье направление — содержание иммуноглобулинов увеличивается с последующим уменьшением в конце исследования (sIgA в КП, IgA в иммерсии 1). Четвертое направление — содержание иммуноглобулинов остается на одном уровне (IgM в КП).

Это говорит о том, что: решающим звеном всегда остается макроорганизм, состояние его неспецифической резистентности и специфической защиты; направления изменения содержания иммунологических показателей в десневой жидкости космонавтов и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии сравнимы.

Проведённая детекция маркерной дезоксирибонуклеиновой кислоты пяти основных пародонтопатогенных видов – *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, показала наличие в ротовой полости обследуемых всех представителей этой группы.

Комменсальная микрофлора десневой борозды способна значительно усилить свои патогенные свойства под влиянием факторов, «запускающих» изменение пропорций резидентных микроорганизмов на фоне сниженной резистентности тканей пародонта. Экзо- и эндотоксины, продуцируемые пародонтопатогенными штаммами бактерий определяют агрессивность альтернативного воспаления соединительнотканых структур пародонта, запускают каскад патогенетических реакций, приводящий к формированию пародонтального очага хронической инфекции [2].

Таким образом, под влиянием факторов космического полета и, в частности, моделируемого фактора невесомости наблюдается нарушение как минимум в двух барьерах колонизации пародонта. Это барьер, сформированный комменсальной микро-

флорой и барьер, формируемый гуморальным иммунитетом.

Это определяет необходимость создания комплекса профилактических мер, опробованных в модельных экспериментах и направленных на укрепление естественных барьеров колонизации пародонта.

Работа проводилась в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре РФ – Институте медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Хорошевское шоссе 76 а, факс: 8 (499) 195-22-53, сотрудниками Института.

#### Список литературы

1. Дубинин Д.М. Влияние факторов космического полета на состояние полости рта и кожи людей // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. М. 1985. С. 25.
2. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П. Микрофлора полости рта: норма и патология. Нижний Новгород.: НГМА. 2004. С. 160.
3. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. Колонизационная резистентность организма в изменённых условиях обитания. М.: Наука. 2005. С. 276.
4. Ильин В.К., Шумилина Г.А., Соловьева З.О., Носовский А.М., Каминская Е.В. Некоторые показатели состояния полости рта и зубов космонавтов при полетах на МКС // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2016. Т.50. №6. С. 25-30.
5. Маерле А.В., Сергеев И.А., Алексеев Л.П. Метод иммуно-ПЦР: перспективы использования // Иммунология. 2014. №1. С. 44-48.
6. Мальнева Н.С. Изменение состояния тканей пародонта при воздействии некоторых экстремальных факторов // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. М. 1997. С. 17.
7. Носовский А.М., Соловьева З.О., Ильин В.К. Применение метода главных компонент для оценки однородности результатов исследований микрофлоры в условиях «сухой» иммерсии // Биомедицинская радиоэлектроника. 2012. № 2. С. 42-47.
8. Носовский А.М., Соловьева З.О., Ильин В.К. Применение дисперсионного анализа для оценки изменения микрофлоры покровных тканей космонавтов и кандидатов в космонавты при длительных космических полетах // Биомедицинская радиоэлектроника. 2014. №1. С. 16-22.
9. Г.А. Шумилина Г.А., Зарубина К.В. Оценка функционального состояния полости рта космонавтов в условиях космического полета // Космическая биология и авиакосмическая медицина. Материалы XII Конференции. М. 2002. С. 361-362.