



ЦИРКАДИАННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

В.И. ШЕМОНаЕВ¹, А.А. МАЛОЛЕТКОВА¹
Д.М. ФРОЛОВ², В.В. НОВОЧАДОВ²
И.П. РЫЖОВА³

¹⁾ Волгоградский государственный
медицинский университет

²⁾ Волгоградский государственный
университет

³⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: anna412630@mail.ru

Работа посвящена изучению биоритмологической организации параметров ротовой жидкости человека. Методом Косинор-анализа проведено моделирование их среднесуточного ритма. Определена четкая временная структура изменения изучаемых параметров ротовой жидкости в пределах циркадианного ритма.

Ключевые слова: ротовая жидкость, хронобиология.

Введение. Ротовая жидкость (РЖ) – сложная по происхождению и составу биологическая среда, участвующая в реализации множества функций: иммунологическом надзоре, пищеварительной, минерализующей, очищающей. Несмотря на то, что РЖ содержит лишь 0,2–0,4% белка и не более 2% других веществ, она обладает высокой внутренней структурированностью, что обусловлено наличием в ней мицелл на основе фосфата кальция. Присутствие в смешанной слюне кислых белков, богатых пролином, придает ей вязкость и тягучесть. Важным компонентом местного гомеостаза является кислотно-основное равновесие в полости рта, с которым тесно связаны физические и биохимические свойства РЖ [2, 10].

Исследование морфологии биологических жидкостей – принципиально новое научное направление, которое имеет комплексный системный подход к их изучению с позиций физической химии, кристаллографии и принципов синергетики. Кристаллостроение в процессе высушивания РЖ отражает не только ее химический состав, но также прижизненные свойства и функциональные изменения [4, 8, 9].

Процессы, происходящие в биологических системах, имеют ритмический характер с различной периодичностью ввиду своей изменчивости во времени. Известно, что циркадианные ритмы оказывают влияние более чем на 300 физиологических констант организма с изменением состояния вегетативной иннервации и эндокринных желез [1, 11]. Поэтому необходимо более глубокое исследование свойств РЖ в зависимости от биоритмов.

Целью исследования стало изучение циркадианной организации физико-химических свойств ротовой жидкости у практически здоровых людей.

Материалы и методы. В исследование были включены 200 человек (100 мужчин и 100 женщин) в возрасте 21–25 лет, случайно отобранных из группы лиц с полными зубными рядами и ортогнатическим прикусом, не нуждающихся по результатам стоматологического обследования в санации полости рта.

За 30 минут до исследования исключали прием пищи, питья, курение и физические упражнения. Перед каждой пробой обследуемый полоскал ротовую полость водой трижды, удалял остатки воды чистой салфеткой, вносил РЖ в пластиковую пробирку с крышкой [2].

Определение рН проводили сразу после получения РЖ при помощи прибора «Acorn pH5 series pH/°C Meter» (Oakton, США). Перед началом работы производили калибровку прибора по стандартному буферу (рН=7,0), далее электрод промывали в дистиллированной воде и помещали в пробирку с собранной РЖ для определения рН. Перед последующим определением электрод промывался в физиологическом растворе и дистиллированной воде.



Определение вязкости РЖ проводили при помощи ротационного вискозиметра DV-II+ (Brookfield, США) с использованием SS-адаптера для образцов малого объема. Значения вязкости получали в сантипуазах (сПз), затем переводили полученные данные в единицы системы СИ – ПаС.

Для морфологического исследования и компьютерной кристаллографии пробирка с 0,5 мл РЖ помещалась в холодильник на 8-12 часов. За этот отрезок времени происходило осаждение крупных частиц и формирование осадка. Затем проводили забор надосадочной жидкости в количестве 0,02 мл при помощи полуавтоматического дозатора и наносили каплю на предметное стекло. Капля высушивалась при температуре 20-25°C, относительной влажности 65-70% и минимальной подвижности окружающего воздуха в течение трех часов. По истечении этого времени получали фацию РЖ, которая представляла собой высушенную пленку. Изучение полученных фаций проводили под микроскопом [8].

На качественном уровне морфологическое исследование слюны включало в себя выделение наиболее типичных типов структуропостроения в периферической и центральной зоне фации.

Количественный анализ объектов был осуществлен с помощью аппаратного компьютерного комплекса «Видеотест–Морфо 3,0», включающего исследовательский микроскоп класса Цейс, цифровую камеру, компьютер с пакетом встроенных лицензионных программ изготовителя. Осуществляли цифровую съемку дегидратированной капли препарата (фации) под микроскопом при увеличении 10 и сохраняли файл в JPEG-формате.

Радиальную морфометрию фаций производили с помощью оригинальной программы «Радиана», разработанной одним из авторов [6], с выводом результатов в формат Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Раздельно определяли интегральную яркость периферической и центральной зон фации в системе RGB, захватывая в выделенную зону не менее 20% их общей реальной площади.

Для количественного доказательства циркадианной зависимости оцифрованные изображения фаций РЖ были использованы для расчета трех показателей:

- радиальной толщины краевой зоны (R, мкм);
- безразмерного белково-кристаллического коэффициента (БКК), отражающего соотношение площадей краевой и центральной зон;
- коэффициента интенсивности структуропостроения, отражающего сложность взаимопереходов на границе между зонами.

Статистический анализ проводился поэтапно с помощью программного пакета «STATISTICA 6.0». После проверки выборки на нормальность распределения вычислялась средняя арифметическая величина (M) и стандартная ошибка средней арифметической (m). Проверка достоверности различий осуществлялась по критерию Стьюдента (t) [3]. Параметры биоритмов были рассчитаны с помощью компьютерной программы «Cosinog v2.5 for Excel 2000/XP/2003», в которой реализован математический алгоритм на основе косинор-анализа [7].

Результаты и их обсуждение. При определении рН, вязкости РЖ, а также ее кристаллографических характеристик исходили из того, что для этого имеются объективные предпосылки: определенная цикличность приема пищи и ассоциированные с ними изменения деятельности системы пищеварения в целом, суточная динамика гормональной регуляции водно-солевого и других видов обмена, цикличность деятельности центральной нервной системы и организма в целом.

Значение **рН ротовой жидкости** за период исследования с 8.00 до 20.00 составляло в среднем $6,82 \pm 0,10$. При изучении суточной динамики рН РЖ был обнаружен сдвиг значений в щелочную сторону к 14.00 ($7,03 \pm 0,06$), по сравнению со значением в утренние часы ($6,65 \pm 0,15$). Данные различия статистически достоверны ($t=4,8$, $p<0,05$). Также выявлено изменение значений к 20.00 с возвращением значений рН к слабокислотной реакции РЖ ($6,58 \pm 0,11$), разница между показателями достоверна ($t=3,5$, $p<0,05$). Суточная амплитуда колебаний рН РЖ составила 0,45 (табл. 1).

С 8.00 до 14.00 происходит постепенное уменьшение концентрации H^+ и сдвиг среды РЖ в щелочную сторону, а с 14.00 до 20.00 – наоборот, показатель рН смещается в кислую сторону. С учетом того, что рН является отрицательным десятичным логарифмом



рифмом концентрации H^+ в жидкости, реальные суточные колебания этих ионов в РЖ составляют более 6 раз.

При моделировании среднесуточной динамики рН РЖ методом Косинор-анализа была получена усредненная синусоида. Ортофаза значений рН приходилась на 14.00 ($7,03 \pm 0,06$), парафаза – на 20.00 ($6,58 \pm 0,11$). Построение эллипса рассеяния и его доверительных границ в пределах околосуточного ритма методом Косинор-анализа подтвердила наличие ритмичной периодичности изучаемого показателя (рис. 1).

Исследование вязкости РЖ показало, что её значения составляют в среднем $0,148 \pm 0,003$ ПаС. Изучение вязкости РЖ за период с 8 до 20 часов показало уменьшение её значений к 14.00 ($0,127 \pm 0,006$ ПаС) по сравнению со значениями в утренние часы ($0,154 \pm 0,008$ ПаС), различия статистически достоверны ($t=2,7, p<0,05$). К 20.00, по сравнению с 14.00, отмечалось увеличение вязкости РЖ до $0,163 \pm 0,008$ ПаС ($t=3,6, p<0,05$). Суточная амплитуда колебаний данного показателя составила $0,036$ ПаС (табл. 1).

Таблица 1

Циркадианная динамика рН и вязкости ротовой жидкости у обследуемых лиц

Время	Значение, $M \pm m$	Достоверные различия						
		8	10	12	14	16	18	20
рН ротовой жидкости								
8.00	$6,68 \pm 0,12$	-			*	*		
10.00	$6,77 \pm 0,08$		-					
12.00	$6,83 \pm 0,08$			-	*			
14.00	$7,03 \pm 0,06$	*		*	-		*	*
16.00	$7,00 \pm 0,05$	*				-	*	
18.00	$6,81 \pm 0,06$				*	*	-	
20.00	$6,58 \pm 0,11$				*			-
Вязкость								
8.00	$0,154 \pm 0,009$	-			*			
10.00	$0,149 \pm 0,009$		-		*			
12.00	$0,142 \pm 0,008$			-	*			
14.00	$0,127 \pm 0,006$	*	*	*	-	*	*	*
16.00	$0,144 \pm 0,005$				*	-		
18.00	$0,156 \pm 0,007$			*	*		-	*
20.00	$0,163 \pm 0,008$				*			-

* – достоверные отличия с величинами показателя в соответствующие часы

Построение усредненной синусоиды и эллипса рассеяния средней синусоиды методом Косинор-анализа также доказывало четкую временную структуру вязкости РЖ (рис. 1).

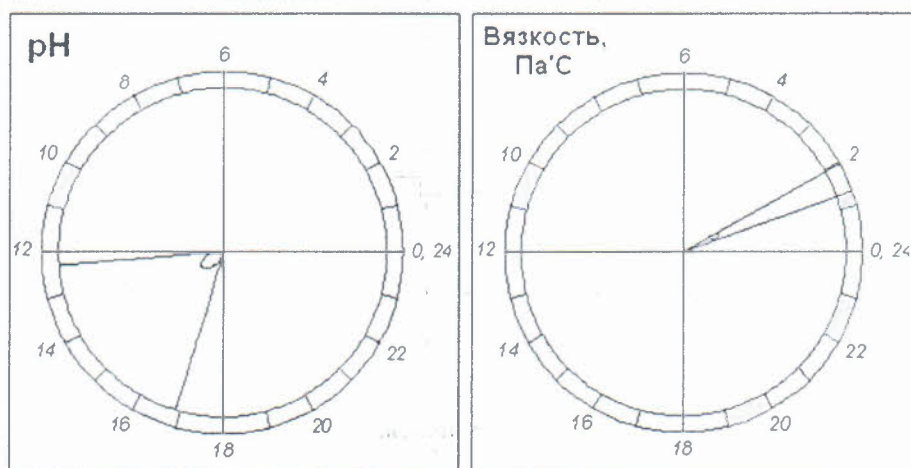


Рис. 1. Циркадианные эллипсы рассеяния рН и вязкости ротовой жидкости практически здоровых лиц



Для исследования микрокристаллизации РЖ методом высушивания и компьютерной кристаллографии из общей группы было отобрано случайным образом 50 человек: 25 мужчин и 25 женщин. В результате были получены данные, свидетельствующие в пользу четкой циркадианной организации интегральных физико-химических свойств РЖ.

При анализе фации РЖ, полученной в 8.00, обращали внимание на относительно небольшую краевую (белковую) зону, гомогенную или гомогенно-слоистую по строению. Переход к центральной (кристаллической) зоне был четко структурирован, сложно организован, содержал многочисленные взаимопереходы от зоны к зоне. Центр фации был представлен многочисленными крупными мечевидными или папоротникообразными кристаллическими структурами солей с присутствием небольшого числа темных точечных включений (рис. 2).

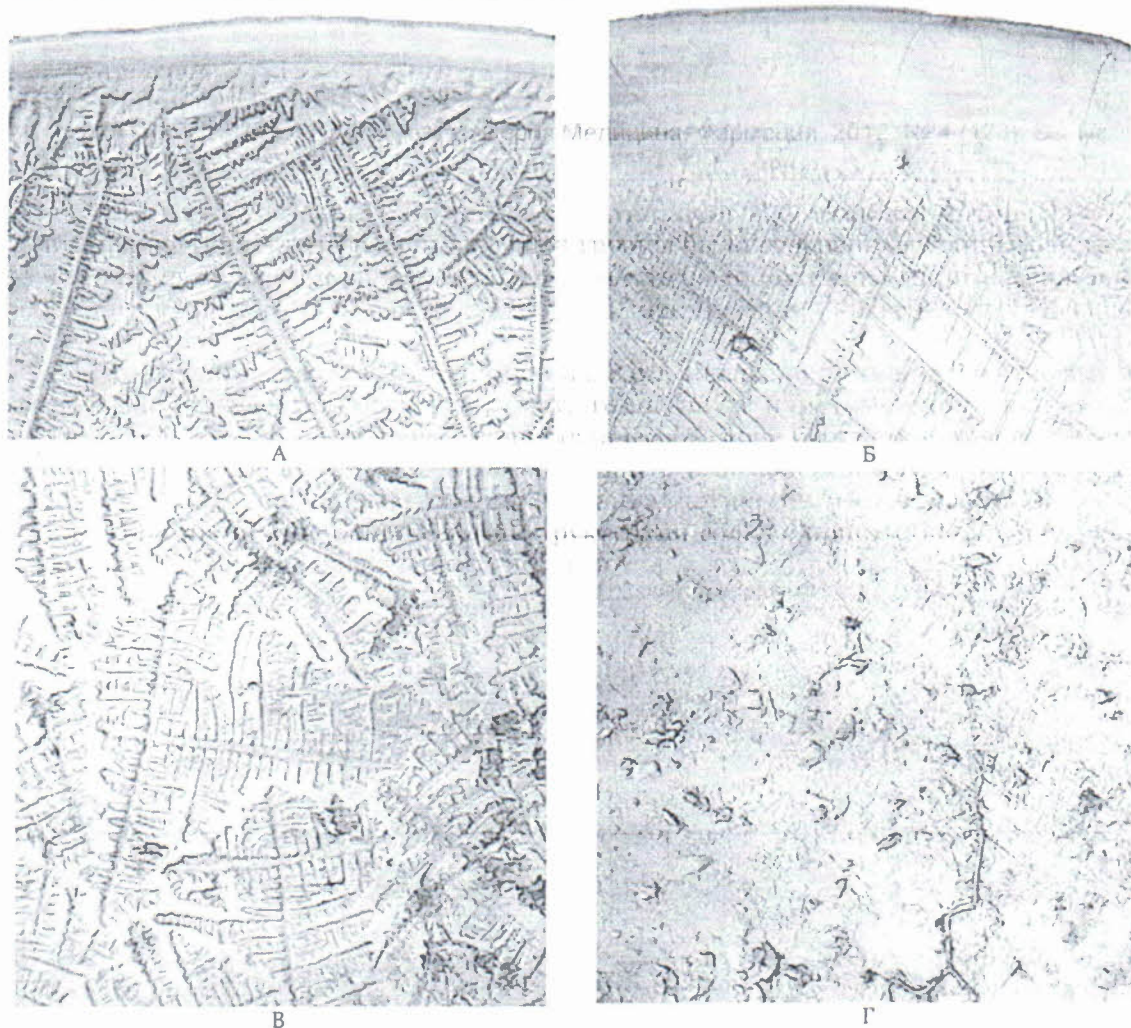


Рис. 2. Строение фации слюны обследуемого К. в различное время суток. 8.00 А. Тонкая гомогенная краевая зона с хорошо выраженным сложным рисунком перехода к кристаллической зоне. В. Центральная зона содержит мечевидные и папоротникообразные структуры, точечные включения. 14.00. Б. Более широкая краевая зона с размытым плавным переходом к кристаллической. Г. Относительно гомогенная кристаллическая зона с множеством аморфных структур. Окраска нативная, увеличение 10.

К 10.00 краевая зона фации РЖ становилась несколько толще, приобретала отчетливую слоистость, граница с центральной зоной сохраняла четкость и сложную структуру взаимопереходов. На фоне преобладания мечевидных и папоротникообразных структур появлялись единичные мелкие кристаллы простых солей, количество точечных плотных включений несколько возросло. В 12.00 толщина краевой зоны фа-



ции значительно увеличивалась, одновременно значительно упрощался и размывался рисунок перехода к центральной (кристаллической) зоне. Центр фации имел мозаичную структуру с чередованием небольших участков структур папоротникообразного, мечевидного и аморфного типа. Присутствовало множество мелких темных включений, эксцентрично выявлялись скопления аморфных темных плотных участков. При исследовании в 14.00 фация имела максимально выраженную краевую зону, которая была относительно гомогенной, а переход к центральной зоне был плавным и нечетко структурирован. Центральная зона большей частью была выполнена аморфными кристаллическими структурами и скоплениями темного плотного материала (рис. 2).

В 16.00 изменения, развившиеся за предыдущие 8 часов наблюдения, приобрели обратное развитие: несколько уменьшались размеры и гомогенность краевой зоны, визуализировалась граница между зонами, вновь появлялись папоротникообразные структуры, несколько снижалось количество темных включений. В 18.00 в фации четко выделялась маленькая краевая фация, имевшая ярко выраженное слоистое строение и четкую рельефную границу с центральной зоной. Центр фации был выполнен классическими мечевидными структурами с небольшим количеством папоротникообразных, число темных плотных включений было минимальным. При исследовании в 20.00 фация РЖ практически сохраняла строение, выявленное на предыдущем сроке наблюдения.

Радиальная величина краевой зоны фации РЖ составила в среднем $178,6 \pm 3,1$ мкм. Прослеживалась четкая циркадианная динамика величины исследуемого показателя: возрастание от $133,7 \pm 1,2$ мкм в утренние часы до максимума в 14.00 ($305,5 \pm 4,2$ мкм) с последующим снижением с минимумом размеров краевой зоны в 18.00 ($103,8 \pm 2,1$ мкм). Суточная амплитуда колебаний величины показателя составила $201,7$ мкм, с максимальными отклонениями в 41,8% от среднесуточного (табл. 2).

Таблица 2

Циркадианная динамика количественных показателей строения фации ротовой жидкости обследуемых лиц

Время	Значение, $M \pm m$	Достоверные различия						
		8	10	12	14	16	18	20
Радиальная толщина краевой зоны								
8.00	$133,7 \pm 1,2$	-		*		*		
10.00	$148,5 \pm 2,0$		-	*		*		
12.00	$278,5 \pm 3,9$	*	*	-		*	*	*
14.00	$305,5 \pm 4,2$	*	*		-	*	*	*
16.00	$160,2 \pm 3,6$			*	*	-	*	*
18.00	$103,8 \pm 2,1$	*	*	*		*	-	
20.00	$120,5 \pm 2,7$			*	*	*		-
Белково-кристаллический коэффициент								
8.00	$0,78 \pm 0,03$	-		*		*		
10.00	$0,83 \pm 0,05$		-	*		*		
12.00	$0,89 \pm 0,06$	*	*	-		*	*	*
14.00	$1,31 \pm 0,08$	*	*		-	*	*	*
16.00	$0,90 \pm 0,05$			*		-	*	
18.00	$0,58 \pm 0,03$	*	*	*	*	*	-	
20.00	$0,47 \pm 0,03$	*	*	*	*	*		-
Интенсивность структуропостроения фации								
8.00	$14,25 \pm 0,45$	-	*	*	*	*	*	*
10.00	$9,78 \pm 0,33$	*	-		*	*		
12.00	$6,74 \pm 0,23$	*		-	*			*
14.00	$2,71 \pm 0,17$	*	*	*	-			*
16.00	$4,82 \pm 0,21$	*	*	*	*	-	*	*
18.00	$7,29 \pm 0,36$	*	*		*	*	-	
20.00	$10,80 \pm 0,61$	*		*	*	*		-

При использовании метода Косинор-анализа, удалось провести моделирование среднесуточного ритма размеров краевой зоны фации РЖ. Полученная при этом усредненная синусоида имела четкую циркадианную зависимость с ортофазой в 14.00. Эллипс рассеяния не перекрывал начало системы координат, следовательно, радиаль-

ная толщина краевой зоны фации РЖ имела ритмы, статистически достоверные на принятом доверительном уровне (рис. 3).

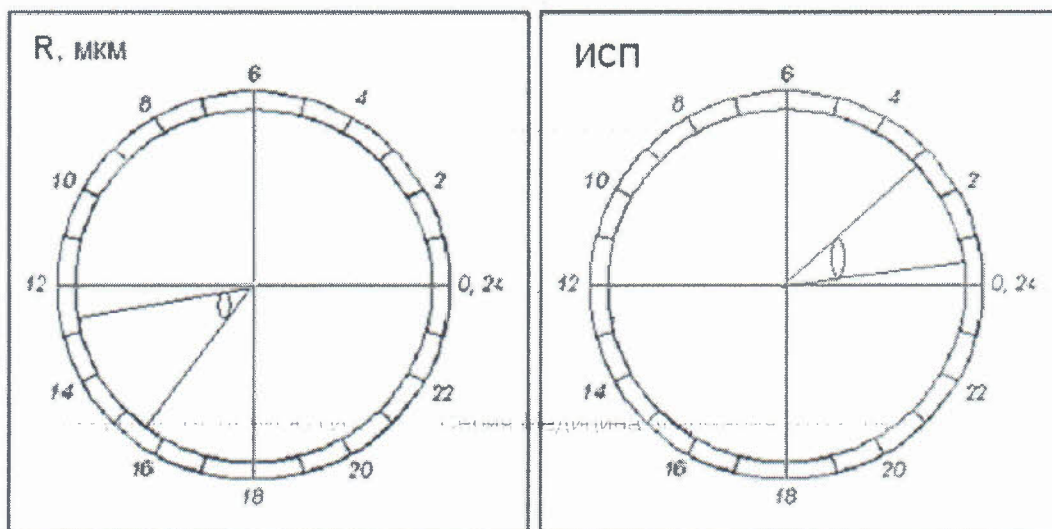


Рис. 3. Циркадианная динамика и эллипсы рассеяния основных показателей строения фации ротовой жидкости практически здоровых лиц

Значение **белково-кристаллического коэффициента** за период исследования фаций РЖ с 8.00 до 20.00 составило в среднем $0,82 \pm 0,08$. При изучении суточной динамики белково-кристаллического коэффициента было обнаружено монотонное увеличение значений этого показателя к 14.00 ($1,31 \pm 0,08$), по сравнению со значением при измерении в утренние часы ($0,78 \pm 0,03$). Полученные различия статистически достоверны ($t=6,2$; $p < 0,001$). После выявленного пика наблюдалась обратная динамика со снижением величины белково-кристаллического коэффициента до значений ниже, чем в утренние часы (в 20.00 – $0,47 \pm 0,03$). Суточная амплитуда колебаний коэффициента составила 0,84, или по 54,9% в каждую сторону от среднесуточной величины.

Восстановление среднесуточной динамики белково-кристаллического коэффициента и построение эллипса рассеяния и его доверительных границ в пределах околосуточного ритма методом Косинор-анализа подтвердили наличие ритмичной периодичности изучаемого показателя.

Исследование интенсивности структуропостроения фации РЖ показало, что значение этого безразмерного показателя составляло в среднем $8,14 \pm 0,31$. Интенсивность структуропостроения фации РЖ, как это видно из динамики ее показателя, монотонно уменьшалась более чем в 5,2 раза (с $14,25 \pm 0,45$ до $2,71 \pm 0,17$), различия достоверны ($t=24,0$ и $p < 0,001$). В последующем величина коэффициента интенсивности структуропостроения увеличивалась, но не достигала значений, выявленных в утренние часы (к 20.00 – до $10,80 \pm 0,61$). Суточная амплитуда колебаний данного показателя составила 11,54, или 76,8%.

При моделировании среднесуточной динамики интенсивности структуропостроения фации РЖ была получена усредненная синусоида, на которой четко прослеживается наличие ритмических колебаний данного показателя в течение суток. Построение усредненной синусоиды, а также эллипса рассеяния и его доверительных границ в пределах околосуточного ритма методом Косинор-анализа подтвердило наличие ритмичной периодичности изучаемого показателя. Парафаза значений показателя приходилась на 14.00, а ортофаза – на 8.00.

Заключение. Проведенная оценка хронофизиологической организации изучаемых параметров выявила, что большинство из них имеет четкую временную зависимость в пределах циркадианного ритма.

Полученные результаты исследования характеристик РЖ выявили сходность хроноструктур уровня секреции и показателя рН и её вязкости: постепенный сдвиг рН



в щелочную сторону происходил с 8.00 до 14.00, а с 14.00 до 20.00 отмечалось относительное «закисление» среды. При этом наибольшие величины этих показателей отмечены в дневное время в период с 12.00 до 16.00, а наименьшие – в вечерние часы и ночное время. Изменение вязкости ротовой жидкости в течение дня происходило следующим образом: в период с 8.00 до 14.00 отмечается постепенное уменьшение вязкости ротовой жидкости, а затем её увеличение к 20.00.

Аналогичным образом подтверждается околосуточная физико-химических свойств РЖ по количественным показателям компьютерной кристаллографии: радиальной толщине краевой зоны фации, белково-кристаллическому коэффициенту и показателю интенсивности структурообразования.

Полученные результаты подтверждают и дополняют проведенные нами ранее исследования [5], а знание временной организации РЖ в пределах циркадианного ритма может быть полезно для формирования хронофизиологического подхода к лечению стоматологических пациентов.

Литература

1. Агаджанян, Н.А. Хронофизиология, хронофармакология и хронотерапия / Н.А. Агаджанян, В.И. Петров, И.В. Радыш, С.И. Краюшкин. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. – 336 с.
2. Боровский, Е. В. Биология полости рта / Е. В. Боровский, В. К. Леонтьев. 2-е изд.- М.: Медицинская книга, 2001. – 304 с.
3. Герасимов, А.Н. Медицинская статистика / А. Н. Герасимов. – М.: Изд-во: МИА, 2007. – 480 с.
4. Мартусевич, А.К. Визуаметрия и спектрометрия в кристаллосаливадиагностике / А.К. Мартусевич, А.В. Воробьев, Ю.В. Зимин, Н.Ф. Камакин // Рос. стоматол. журнал. – 2009. – №4. – С. 30-32.
5. Малолеткова, А.А. Биоритмологическая организация диагностически-информативных параметров ротовой жидкости человека / А.А. Малолеткова, В.И. Шемонаев, Т.В. Моторкина // Вестник РУДН, 2009. №4. – С. 128-134.
6. Новочадов, В.В. Радиальная морфометрия: перспективы и способы применения в патогистологическом и цитологическом исследовании // Новые технологии в медицине: Труды ВолГМУ. – Т. 61, вып. 1. – Волгоград: ВолГМУ. – 2005. – С. 311-313.
7. Святуха, В.А. Обработка биоритмологических данных модифицированным методом Косинор-анализа / В. А. Святуха // Биофизика. – 1992. – Т. 37. – № 4. – С. 821-824.
8. Шатохина, С.Н. Морфологическая картина ротовой жидкости – диагностические возможности / С.Н. Шатохина, С.Н. Разумова, В.Н. Шабалин // Стоматология. – 2006. – №4. – С. 14-17.
9. Upgrading the twin variables algorithm for large structures /K. Bethanis [et al.]// Acta Crystallogr. A. – 2000. – Vol. 56, Pt 2. – P. 105-111.
10. Humphrey, S.P. A review of saliva: norm; 11 composition, flow, and function / S.P. Humphrey, R.T. Williamson // J. Prosthet. Dent. – 2001. – Vol. 85, N 2. – P. 162-169.
11. Kariyawasam, A.P. A circannual rhythm in unstimulated salivary flow rate when the ambient temperature varies by only about 2 degrees / A.P. Kariyawasam, C. Dawes // Arch. Oral Biol. – 2005. – Vol. 50, N10. – P. 919-922.

CIRCADIAN ORGANIZATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF ORAL LIQUID OF APPARENTLY HEALTHY PEOPLE

**V.I. SHEMONAEV¹, A.A. MALOLETKOVA¹
D.M. FROLOV², V.V. NOVOCHADOV²
I.P. RYZHOVA³**

¹⁾ *Volgograd State Medical University*

²⁾ *Volgograd State University*

³⁾ *Belgorod National Research University*

e-mail: anna412630@mail.ru

The present study is devoted to biorhythmical organization of human oral liquid parameters. A definite temporary structure of oral liquid parameters modification in the range of circadian rhythm was detected.

Key words: oral liquid, chronobiology.