



УДК 612
ББК 28.707.3

РОТОВАЯ ЖИДКОСТЬ КАК ОБЪЕКТ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА¹

*М.В. Постнова, Ю.А. Мулик, В.В. Новочадов,
А.Б. Мулик, Н.О. Назаров, Д.М. Фролов*

Обосновано применение морфологического анализа ротовой жидкости при ее высушивании и компьютерной морфометрии пленки-кристаллизата (фации) в качестве эффективного индикатора функционального состояния организма. Полученные феноменологические и количественные характеристики хорошо согласуются с показателями уровня общей неспецифической резистентности организма и циркадианной организации обследованных лиц.

Ключевые слова: функциональное состояние, ротовая жидкость, слюна, кристаллография, уровень общей неспецифической реактивности организма.

Исследование функционального состояния (ФС) является одним из продуктивных направлений в физиологии человека, позволяя выходить как на новые фундаментальные закономерности жизнедеятельности, так и получать практически полезные сведения в прикладной сфере: физиологии труда, образования, популяционном экологическом мониторинге. Основные методики определения ФС базируются на анализе биохимических показателей крови, определении реакции на входное афферентное воздействие в сравнении с предварительно определенными интервалами нормы [1, с. 7–16; 5, с. 32–40; 8, с. 38–45].

Такой подход, помимо явного наличия вмешательства (инвазивности) в жизнедеятельность организма, обладает определенной односторонностью, поскольку в нем учитывается только реактивность «на входе», тогда как в идеале она должна исследоваться также и «на выходе» системы.

Аргументами для выбора ротовой жидкости (РЖ) в качестве объекта для исследования в аспекте ФС организма стали следующие. РЖ является сложным фильтратом плазмы крови, в силу чего отражает состояние

динамического постоянства внутренней среды организма [2, с. 13]. В то же время РЖ может весьма значительно меняться по составу, физико-химическим и биологическим свойствам при воздействии самых разных стимулов, то есть является индикатором реактивности организма. Третьим аргументом явилась простота и полная неинвазивность процедуры получения этой биологической жидкости. Актуальность расширения диагностического арсенала физиологии и медицины за счет внедрения неинвазивных методов исследования (прежде всего исключающих забор крови) относится к приоритетным направлениям современных наук о человеке.

Под РЖ понимают жидкое содержимое ротовой полости вне приема пищи, то есть без примесей ее компонентов. Наряду с продуктами секреции слюнных желез, а также продуктами жизнедеятельности микрофлоры полости рта в нее поступают из внутренней среды интермедиаты, биорегуляторы и конечные продукты обмена. Это сложная по составу жидкость, которая содержит 98–99 % воды, около 0,5 % неорганических солей и до 1 % органических веществ – протеинов и других компонентов [2, с. 13–18; 13, р. 1005–1011].

РЖ выполняет различные физиологические функции: пищеварительную, минерализующую, очищающую, защитную, бактерицидную, иммунную, гормональную. Регуляторная функция РЖ

заключается в том, что она влияет на процессы физиологической регенерации, эритропоэз, минеральный обмен и другие функции. В нее секретируются многочисленные цитокины и нейропептиды, которые влияют на проницаемость для белков плазмы крови и другие виды обмена [16, р. 255–258]. РЖ в полном смысле является гомеостазирующей средой для органов и тканей, контактирующих с полостью рта [2, с. 7].

Описанный комплекс свойств позволяет предположить, что РЖ может быть вполне приемлемым объектом для оценки ФС организма.

Методологический подход для проверки данной гипотезы подразумевает применение предельно простого интегративного способа оценки свойств этой жидкости, исключающего применение трудоемких и затратных способов ее комплексного химического анализа. В качестве такого метода был выбран морфологический анализ фации РЖ – пластинки-кристаллизата после ее высушивания на малоадгезивной поверхности. Этот подход, основанный на концепциях морфологии биологических жидкостей, подразумевает, что структуропостроение в процессе их высыхания отражает не только химический состав, но и прижизненные свойства, функциональные изменения. В известных работах были выявлены обязательные фигуры нормального структуропостроения в высушенной капле (фации) РЖ и основные патологические феномены [6, с. 5–7; 12, с. 180–203; 16, р. 28–33].

В исследование включены результаты дегидратационной самоорганизации РЖ 24 человек обоего пола 18–50-летнего возраста. Предварительно у всех обследованных лиц был определен уровень общей неспецифической реактивности организма (УОНРО) посредством оценки порога болевой чувствительности [7, с. 16–25]. Было выделено три группы наблюдения по 8 человек: с высоким, средним и низким УОНРО.

Для максимальной унификации взятия проб был установлен следующий алгоритм: перед каждым сбором обследуемый тщательно полоскал ротовую полость 3 раза проточной водой, затем остатки воды удалялись, после чего он вносил ротовую жидкость в пластиковую пробирку. Пробы закрывали и замораживали при температуре -20°C . Забор РЖ проводился каждые 3 часа шесть раз в течение дня: в 8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00 и 23:00.

Перед анализом пробы размораживали при $+25^{\circ}\text{C}$, центрифугировали в течение 5 мин при 3 000 об./мин. По 0,05 мл полученного супернатанта наносили на стерильные предметные стекла, которые помещали в темное закрытое место для исключения попадания пылевых частиц, при температуре $+25^{\circ}\text{C}$ на 70–80 мин.

Микроскопирование полученных фаций РЖ проводили посредством светового микроскопа «Биолам» (СПб., Россия) со встроенной цифровой камерой «Canon» (Japan, 5.0 Мпкс). Радиальную морфометрию фаций производили с помощью оригинальной программы «Radiana» [9, с. 311–313], сопряженной с программным пакетом EXCEL (Microsoft, США). Программа самостоятельно разбивала объект на выбранное число секторов и зон. В качестве первичного материала получали матрицу секторального и радиального распределения оптической плотности и преобразовывали ее в функцию радиального распределения оптической плотности. В качестве показателей определяли радиальную толщину периферической зоны фации (мкм); вариабельность плотности краевой зоны фации (%); интенсивность белок-индуцированного структуропостроения (усл. ед.); интенсивность неорганического структуропостроения (усл. ед.).

Дальнейшее исследование предусматривало выявление зависимости показателей краевой фации от УОНРО. Для стандартизации учета результатов были задействованы пробы, полученные в 8:00.

В результате исследования было определено, что краевая зона фации слюны, размеры и структуропостроение которой характеризуют белковую фракцию этой биологической жидкости, у практически здоровых лиц в значительной степени зависела от уровня общей неспецифической реактивности (рис. 1, А, Б).

Структуропостроение краевой зоны фации имело характерные особенности, зависящие от УОНРО. У лиц с высоким УОНРО краевая зона гомогенная, край ровный без резких переходов; у лиц со средним УОНРО краевая зона гомогенно-слоиста с наличием точечных включений, имеются аркоподобные структуры, край относительно ровный, местами присутствуют резкие зубчатоподобные переходы; у лиц с низким УОНРО краевая

зона имеет четкое послойное построение, присутствуют точечные кристаллические включения небелковой природы, край волнообразный, имеются растрескивания.

Обнаруживались различия структуро-построения и в центральной части фации (рис. 1, В, Г).

Радиальная высота краевой зоны фации, отражающая общее количество белка, в РЖ у лиц с высоким УОНРО составляла в среднем $99,7 \pm 13,0$ мкм от края до переходной зоны, у лиц со средним УОНРО – $118,1 \pm 12,0$ мкм, у индивидов с низким УОНРО – $153,1 \pm 20,7$ мкм ($p < 0,06$ между крайними группами). Различия статистически не достоверны, но характеризуются тенденцией к достоверным различиям между группами. Данные результаты свидетельствовали о том, что у лиц с высоким УОНРО, вне стимуляции отделения

слюны, биологическая жидкость относительно обеднена белковыми фракциями. Поскольку содержание и активность пептических ферментов в базальной слюне весьма невелики и мало информативны в отношении пищеварительных способностей этой жидкости, полученные результаты скорее следует трактовать как отражение относительно низкого содержания в слюне защитных белков – иммуноглобулинов, лизоцима – у лиц с высоким УОНРО (рис. 2).

Интенсивность белок-индуцированного структуро-построения, косвенно отражающая нативность белков ротовой жидкости, у лиц с высоким УОНРО составляла в среднем $40,5 \pm 2,6$ усл. ед., у лиц со средним УОНРО – $51,1 \pm 5,3$ усл. ед., с низким УОНРО – $40,5 \pm 6,4$ усл. ед. ($p = 0,27$ между крайними группами).

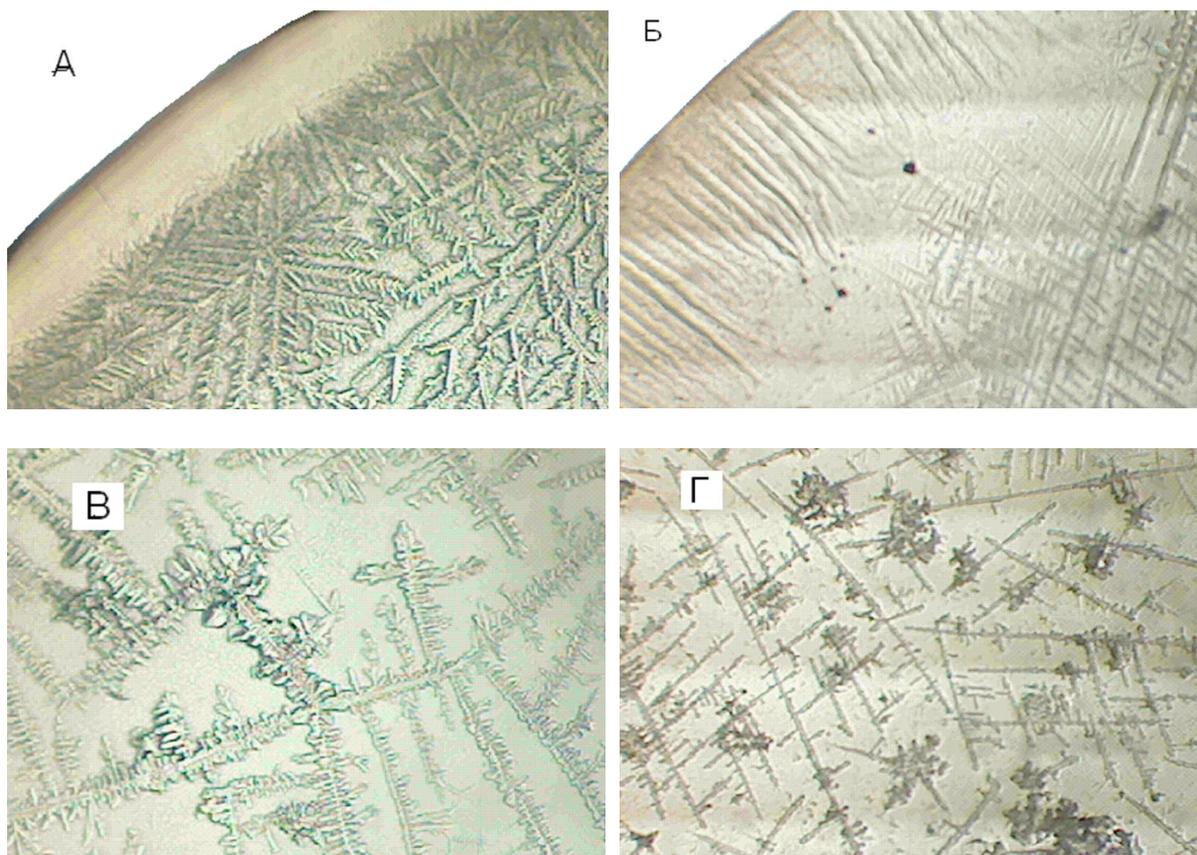


Рис. 1. Строение фации слюны лиц с различным УОНРО:

А – краевая зона при высоком УОНРО гомогенная, внутренний край четкий;

Б – краевая зона при низком УОНРО имеет радиальные складки, внутренний край размытый;

В – центральная зона при высоком УОНРО содержит мечевидные и папоротникообразные структуры;

Г – центральная зона при низком УОНРО содержит сетчатые структуры и кристаллические включения. Ув. 40

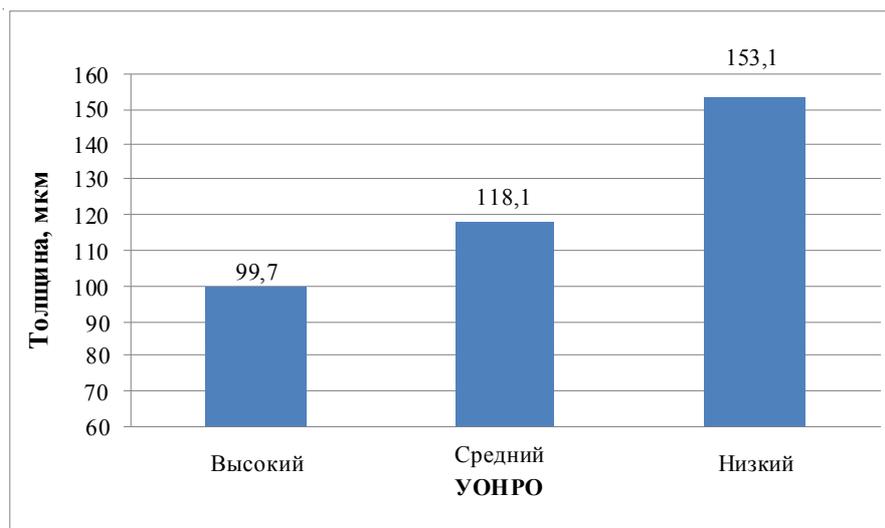


Рис. 2. Зависимость радиальной толщины краевой зоны фации слюны практически здоровых лиц от УОНРО

Вариабельность удельной оптической плотности фации, отражающая структурообразование и особенности перехода компонентов фации слюны от белковой зоны к органическим и неорганическим кристаллическим структурам, у лиц с высоким УОНРО составляла $29,3 \pm 2,42\%$, у лиц со средним УОНРО – $24,2 \pm 2,3\%$, с низким УОНРО – $30,5 \pm 1,6\%$ ($p = 0,39$ между крайними группами). Эти данные свидетельствуют об однородности состава компонентов в пробах фации слюны.

Интенсивность неорганического структурообразования отражала состав и активность низкомолекулярных компонентов РЖ. У лиц с высоким УОНРО она составляла $39,7 \pm 2,5$ усл. ед., у лиц со средним УОНРО – $48,1 \pm 5,3$ усл. ед., с низким УОНРО – $59,7 \pm 6,4$ усл. ед. ($p = 0,42$ между крайними группами).

Дальнейшие исследования были направлены на изучение циркадианной динамики показателей кристаллографии фации слюны.

Структурообразование краевой зоны фации слюны в различное время суток имело некоторые характерные особенности (рис. 3).

В 8:00 краевая зона варьировала от гомогенной до слоистой, у некоторых лиц присутствовали единичные включения, край фации был относительно ровный. В 11:00 краевая зона варьировала от гомогенной до слоистой, в ней присутствовали аркадные структуры и точечные включения, край фа-

ции переходил от ровного до извилистого. В 14:00 краевая зона варьировала от гомогенной до слоистой, в единичных образцах присутствовали аркадные структуры, растрескивание фации и точечные включения, край фации также переходил от ровного до извилистого. В 17:00 краевая зона варьировала от гомогенной до слоистой, присутствовали частые аркадные и морщиноподобные структуры, а также имелись растрескивания краевой фации, край фации оставался неизменным. В 20:00 краевая зона преимущественно была слоистой, присутствовали аркадные структуры, а также имелись растрескивания краевой фации, край фации не изменялся. В 23:00 краевая зона преимущественно была гомогенной, в некоторых образцах присутствовали морщиноподобные структуры, край фации преимущественно был ровным, но в единичных случаях переходил в извилистый.

Радиальная толщина краевой зоны фации у проб, взятых в утренние часы, составляла $120,5 \pm 12,7$ мкм, к 14:00 она достигла своего максимума ($242,4 \pm 40,5$ мкм), затем начинала уменьшаться и достигла своего минимума к 20:00 ($104,1 \pm 7,3$ мкм); в 23:00 она вновь начинала возрастать. При сравнении циркадианной динамики данного показателя у лиц с различным УОНРО наиболее выраженные суточные колебания были отмечены для обследованных с низким УОНРО (рис. 4).

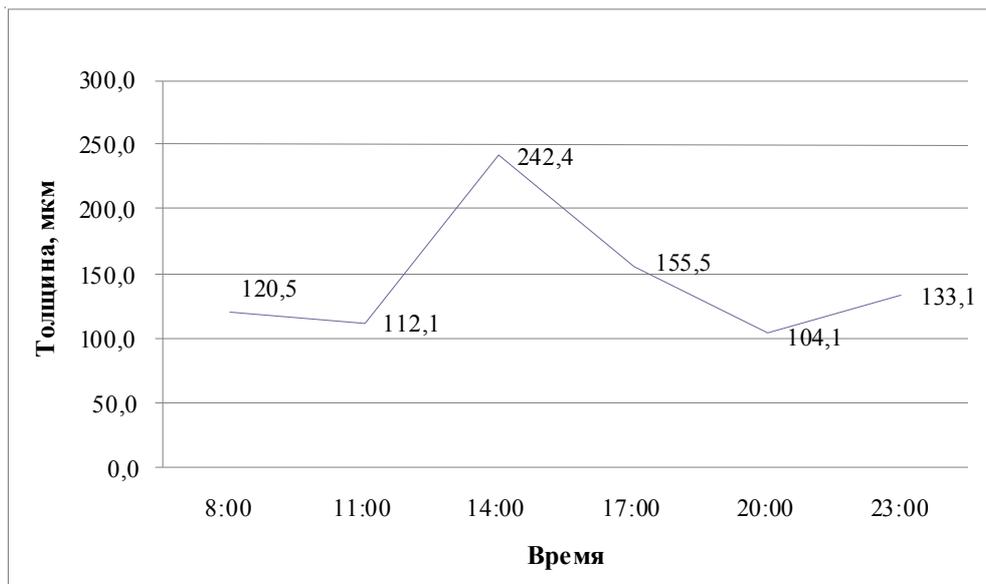


Рис. 3. Циркадианная динамика радиальной толщины фации ротовой жидкости практически здоровых лиц

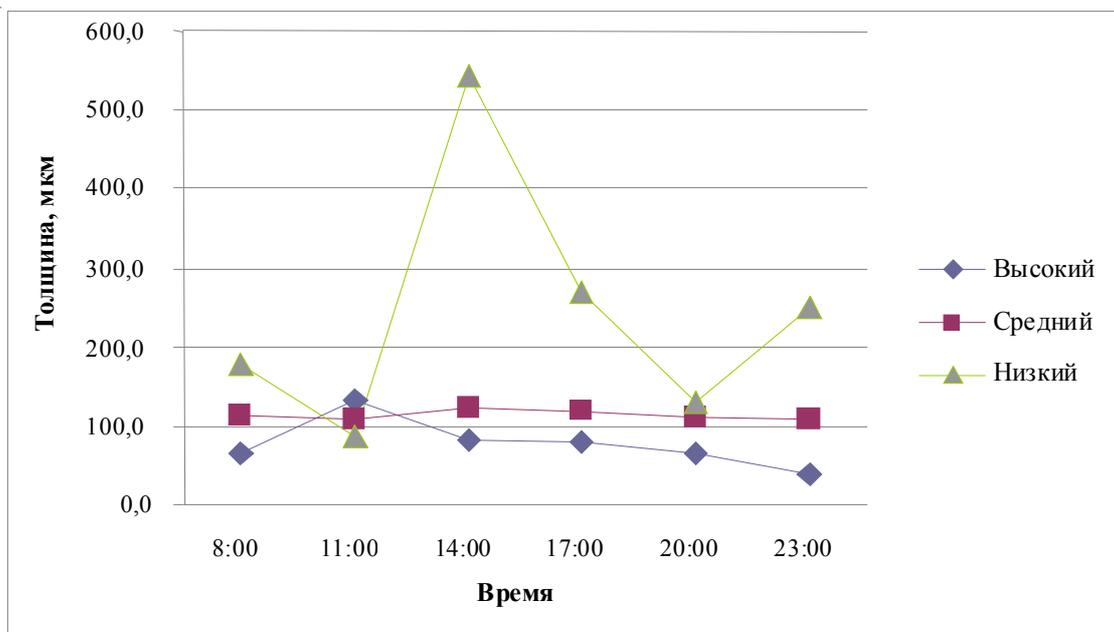


Рис. 4. Циркадианная динамика радиальной толщины краевой зоны фации ротовой жидкости у практически здоровых лиц с различным УОНРО

Интенсивность белок-индуцированного структурообразования фации РЖ в течение суток существенной динамики не претерпевала. Различия статистически недостоверны. Вариабельность оптической плотности краевой фации, отражающая структурообразование и переход компонентов фации слюны от кристаллоорганических образований к неорганической кристаллизации, также имела незначительную циркадианную динамику. В отношении интен-

сивности неорганического структурообразования фации РЖ существенной циркадианной динамики выявлено не было (см. табл.).

Обсуждая полученные данные, необходимо уточнить несколько моментов формирования фации РЖ. По данным литературы, дегидратация биологических жидкостей сопровождается следующими процессами [10, с. 104–111; 11, с. 17–21; 12, с. 48–52, 16, р. 28–33]:

Циркадианная динамика показателей компьютерной морфометрии фазии ротовой жидкости практически здоровых лиц

Время забора	Показатели морфометрии			
	Радиальная толщина краевой зоны, мкм	Интенсивность белок-индуцированного структуропостроения, усл. ед.	Вариабельность плотности краевой зоны, %	Интенсивность неорганического структуропостроения, усл. ед.
8:00	120,5 ± 12,7	43,2 ± 4,5	26,0 ± 1,3	56,2 ± 4,4
11:00	112,0 ± 12,5	45,7 ± 4,2	32,2 ± 1,9	54,1 ± 4,3
14:00	242,4 ± 40,5 *	53,1 ± 5,9	23,5 ± 1,2	46,5 ± 5,9
17:00	155,1 ± 26,7	48,2 ± 2,3	27,4 ± 2,2	51,5 ± 2,3
20:00	104,1 ± 7,3 **	37,7 ± 3,5	23,6 ± 1,0	62,0 ± 3,4
23:00	133,1 ± 37,6	46,1 ± 3,6	33,6 ± 3,0	54,1 ± 3,6

* P < 0,01 с предыдущим сроком наблюдения.

** P < 0,05.

1. Направленное торообразное движение частиц веществ, радиально от центра, против часовой стрелки. Вероятно, такое вращение связано с развитием неустойчивости Марангони.

2. Начало высыхания капли с периферии, при котором наблюдается образование концентрических кольцеобразных структур. Перемещение границы твердой фазы к центру происходит скачками с интервалами 1–2 с на расстоянии 10–20 мкм.

3. Растрескивание кольцеобразной пленки белка на периферии фазии по направлению к центру. При дальнейшем высыхании пленки сектора начинают растрескиваться, формируя ячеистую структуру. В фазии сыворотки крови здорового человека растрескивание носит регулярный характер, у больного человека – хаотичный характер.

4. В секторах начинают формироваться ядра, или конкреции. Утверждение о том, что эти ядра образованы солями, экспериментально не подтверждено. В фазиях биологических жидкостей от больных можно наблюдать дополнительные структуры в виде бляшек, морщин, ковровых и языкообразных структур.

5. Формирование кристаллических структур в центральной части образца. Выпадающие в осадок частицы создают дополнительный энергетический барьер, препятствующий перемещению границы раздела, граница раздела окончательно закрепляется.

В зависимости от содержания неорганических веществ в биологической жидкости наблюдаются разные типы узора трещин: при малых концентрациях неорганических ве-

ществ образуются равномерно расположенные радиальные трещины, идущие от края капли к ее центру; при среднем содержании неорганических веществ трещины расположены хаотично; при большом содержании неорганических веществ образуется одна круговая трещина. Эти свойства связаны с изменением формы капли при ее испарении, которая, в свою очередь, зависит от содержания неорганических веществ в суспензии [12, с. 36–42].

Высокая структурированность ротовой жидкости связана с наличием в ней мицелл, построенных на основе фосфата кальция. Эти соединения находятся в ротовой жидкости в высокой и неравновесной концентрации (фосфата существенно больше кальция), способны образовывать нерастворимое ядро мицеллы, создавая вокруг него за счет избытка ионов слой потенциалоопределяющих противоионов. Защитные оболочки мицелл образуются за счет белковых структур.

Полученные в ходе проведенного исследования данные свидетельствуют о том, что РЖ человека является вполне пригодным объектом, кристаллографические изменения в котором при высушивании и получении фазии отражают системную организацию секреторных процессов у данного индивида. Соответственно, эмпирически полученные параллели между УОНРО и характером фазии РЖ, а также наличие убедительной циркадианной динамики ее показателей свидетельствуют о том, что данный метод приемлем в качестве компонента комплексного исследования ФС организма человека. Существенным преимуществ

ществом методики является ее малозатратность и простота, что делает ее доступной в массовых скрининговых исследованиях популяции человека.

Обобщая результаты исследования, необходимо сделать ряд выводов.

1. Морфологический анализ фаций РЖ является простым, неинвазивным, малозатратным способом для дополнительной оценки функционального состояния организма человека, применимым в массовом скрининговом обследовании популяции.

2. Морфологическая картина фаций РЖ и результаты ее компьютерной морфометрии устойчиво сочетаются с УОНРО человека и имеют отчетливую циркадианную динамику основных параметров.

3. Наиболее информативным при анализе фаций РЖ человека с целью выявления его функционального состояния следует считать анализ качественных характеристик периферической зоны фации (размеры и гомогенные белковые депозиты, структура границы между наружной и внутренней зонами) и их количественных эквивалентов (толщина и интенсивность кристаллообразования).

ПРИМЕЧАНИЕ

¹ Статья подготовлена в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. по теме «Выявление природы и прикладное использование феномена пластичности популяционных механизмов гомеостаза в условиях средовой нагрузки» (Государственный контракт № П1262 от 27.08 2009 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баевский, Р. М. Прогнозирование состояний на грани нормы и патологии / Р. М. Баевский. – М. : Медицина, 1979. – 295 с.
 2. Боровский, Е. В. Биология полости рта / Е. В. Боровский, В. К. Леонтьев. – М. : Медицина, 1991. – 304 с.
 3. Гольбрайх, Е. О формировании узора трещины в свободно высыхающей пленке водного раствора белка / Е. Гольбрайх, Е. Г. Рапис, С. С. Мои-

сеев // Журнал технической физики. – 2003. – Т. 73, вып. 10. – С. 116–122.

4. Гудкова, Л. К. Популяционная физиология человека / Л. К. Гудкова. – М. : Изд-во ЛКИ, 2008. – 316 с.

5. Жирмунская, Е. А. В поисках объяснения феноменов ЭЭГ / Е. А. Жирмунская. – М. : НПФ Биола, 1995. – 117 с.

6. Кристаллизация и кристаллография: Медико-биологические аспекты / А. Л. Волчецкий, Л. Г. Рувинова, Б. А. Спасенников, В. П. Зеновский. – Архангельск : Изд-во Помор. гос. ун-та, 1999. – 190 с.

7. Мулик, А. Б. Уровень общей неспецифической реактивности организма: Разработка, оценка, практическое применение / А. Б. Мулик. – Волгоград : Изд-во ВолГУ, 2001. – 144 с.

8. Мулик, А. Б. Уровень общей неспецифической реактивности человека / А. Б. Мулик, М. В. Постнова, Ю. А. Мулик. – Волгоград : Волгогр. науч. изд-во, 2009. – 224 с.

9. Новочадов, В. В. Радиальная морфометрия: перспективы и способы применения в гистологическом и цитологическом исследовании // Новые технологии в медицине : тр. ВолГМУ. – Т. 61, вып. 1. – Волгоград : ВолГМУ, 2005. – С. 311–313.

10. Рапис, Е. Свойства и виды симметрии твердотельной кластерной фазы белка / Е. Рапис // Журнал технической физики. – 2001. – Т. 71, вып. 10. – С. 104–111.

11. Тарасевич, Ю. Ю. Качественный анализ закономерностей высыхания капли многокомпонентного раствора на твердой подложке / Ю. Ю. Тарасевич, Д. М. Православнова // Журнал технической физики. – 2007. – Т. 77, вып. 2. – С. 17–21.

12. Шабалин, В. Н. Морфология биологических жидкостей человека / В. Н. Шабалин, С. Н. Шапотохина. – М. : Хризостом, 2001. – 304 с.

13. Oral glucose retention, saliva viscosity and flow rate in 5-year-old children / M. Negoro [et al.] // Arch. Oral Biol. – 2000. – Vol. 45, N 11. – P. 1005–1011.

14. Pauchard, L. Influence of salt content on crack patterns formed through colloidal suspension desiccation / L. Pauchard, F. Parisse, C. Allain // Phys. Rev. – 1999. – Vol. 59. – P. 3737–3740.

15. Saliva as an alternative body fluid for therapeutic drug monitoring of the nonnucleoside reverse transcription inhibitor nevirapine / R. P. Van Heeswijk [et al.] // Ther. Drug Monit. – 2001. – Vol. 23, N 3. – P. 255–258.

16. The crystallographic symmetry test for the correctness of a set of phases / P. Tzamalís, K. Bethanis, A. Hountas, G. Tsoucaris // Acta Crystallogr. A. – 2003. – Vol. 59, Pt. 1. – P. 28–33.

MOUTH FLUID AS AN OBJECT OF ESTIMATING FUNCTIONAL CONDITION OF HUMAN BODY

M.V. Postnova, Yu.A. Mulik, V.V. Novochadov, A.B. Mulik, N.O. Nazarov, D.M. Frolov

The articles states the objectivity of morphological analysis of mouth fluid when dried and a computerized morphometrics of crystallized layer (facie) as an indicator of human body condition. The received qualitative and quantitative characteristics conform perfectly well to the indexes of general unspecific reactivity of the body and Circadian organization of the examined.

Key words: *functional condition, mouth fluid, saliva, crystallography, level of general unspecific reactivity of the body.*