

## ЦИРКАДИАННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

В.И. ШЕМОНаев<sup>1</sup>, А.А. МАЛОЛЕТКОВА<sup>1</sup>

Д.М. ФРОЛОВ<sup>2</sup>, В.В. НОВОЧАДОВ<sup>2</sup>

И.П. РЫЖОВА<sup>3</sup>

<sup>1) Волгоградский государственный медицинский университет</sup>

<sup>2) Волгоградский государственный университет</sup>

<sup>3) Белгородский государственный национальный исследовательский университет</sup>

e-mail: [anna412630@mail.ru](mailto: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 pH 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 (pH=7,0), далее электрод промывали в дистиллированной воде и помещали в пробирку с собранной РЖ для определения pH. 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 слабокислый 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 pH РЖ методом Косинор-анализа была получена усредненная синусоида. Ортофаза значений pH приходилась на 14.00 (7,03±0,06), парафаза – на 20.00 (6,58±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±0,003 ПаС. Изучение вязкости РЖ за период с 8 до 20 часов показало уменьшение её значений к 14.00 (0,127±0,006 ПаС) по сравнению со значениями в утренние часы (0,154±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±0,008 ПаС (t=3,6, p<0,05). Суточная амплитуда колебаний данного показателя составила 0,036 ПаС (табл. 1).

Таблица 1

**Циркадианная динамика pH и вязкости ротовой жидкости у обследуемых лиц**

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

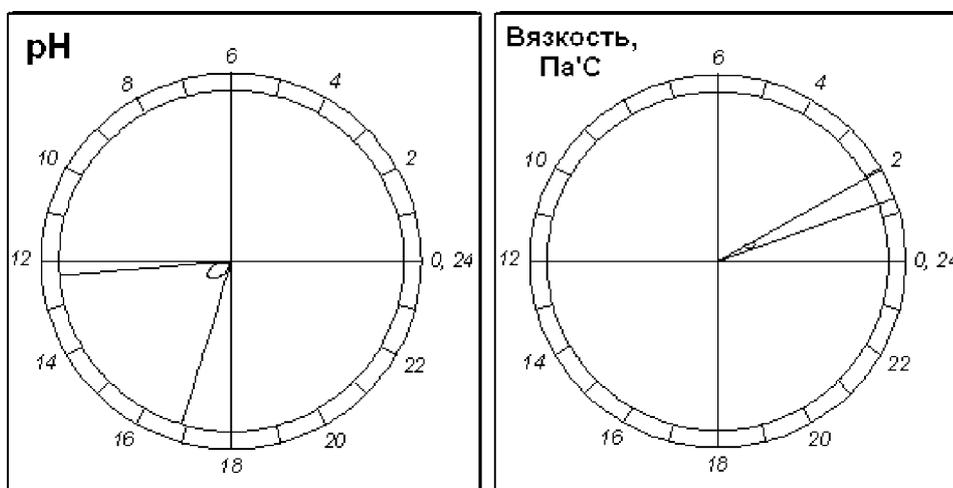


Рис. 1. Циркадианные эллипсы рассеяния pH и вязкости ротовой жидкости практически здоровых лиц



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).

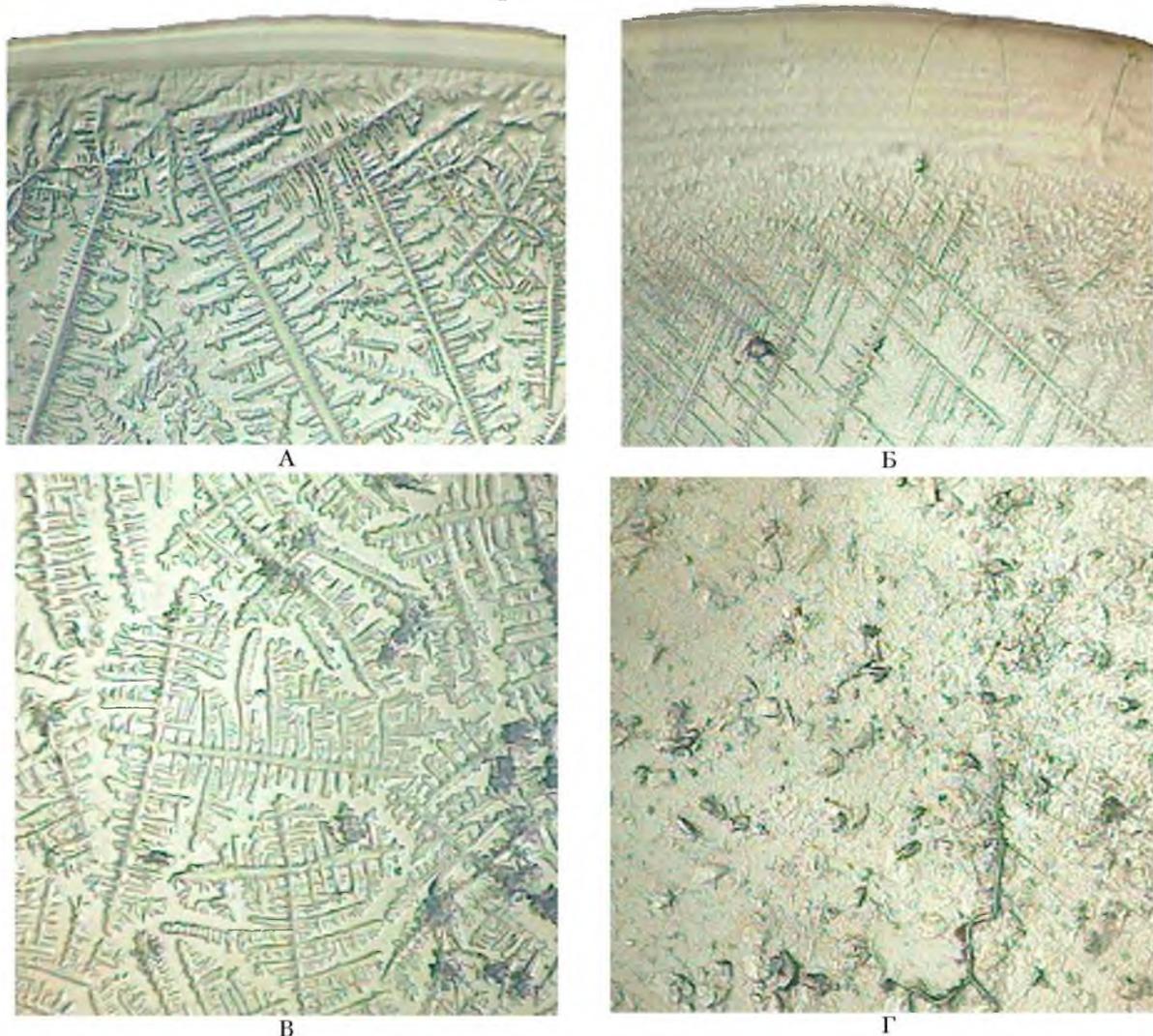


Рис. 2. Строение фации слюны обследуемого К. в различное время суток. 8.00 А. Тонкая гомогенная краевая зона с хорошо выраженным сложным рисунком перехода к кристаллической зоне. В. Центральная зона содержит мечевидные и папоротникообразные структуры, точечные включения. 14.00. Б. Более широкая краевая 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±3,1 мкм. Прослеживалась четкая циркадианная динамика величины исследуемого показателя: возрастание от 133,7±1,2 мкм в утренние часы до максимума в 14.00 (305,5±4,2 мкм) с последующим снижением с минимумом размеров краевой зоны в 18.00 (103,8±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, М±m	Достоверные различия						
		8	10	12	14	16	18	20
Радиальная толщина краевой зоны								
8.00	133,7±1,2	-		*		*		
10.00	148,5±2,0		-	*		*		
12.00	278,5±3,9	*	*	-		*	*	*
14.00	305,5±4,2	*	*		-	*	*	*
16.00	160,2±3,6			*	*	-	*	*
18.00	103,8±2,1	*	*	*	*	*	-	
20.00	120,5±2,7			*	*	*		-
Белково-кристаллический коэффициент								
8.00	0,78±0,03	-		*		*		
10.00	0,83±0,05		-	*		*		
12.00	0,89±0,06	*	*	-		*	*	*
14.00	1,31±0,08	*	*		-	*	*	*
16.00	0,90±0,05			*		-	*	
18.00	0,58±0,03	*	*	*	*	*	-	
20.00	0,47±0,03	*	*	*	*	*		-
Интенсивность структуропостроения фации								
8.00	14,25±0,45	-	*	*	*	*	*	*
10.00	9,78±0,33	*	-		*	*		
12.00	6,74±0,23	*		-	*			*
14.00	2,71±0,17	*	*	*	-	*	*	*
16.00	4,82±0,21	*	*	*	*	-	*	*
18.00	7,29±0,36	*	*	*	*	*	-	
20.00	10,80±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).

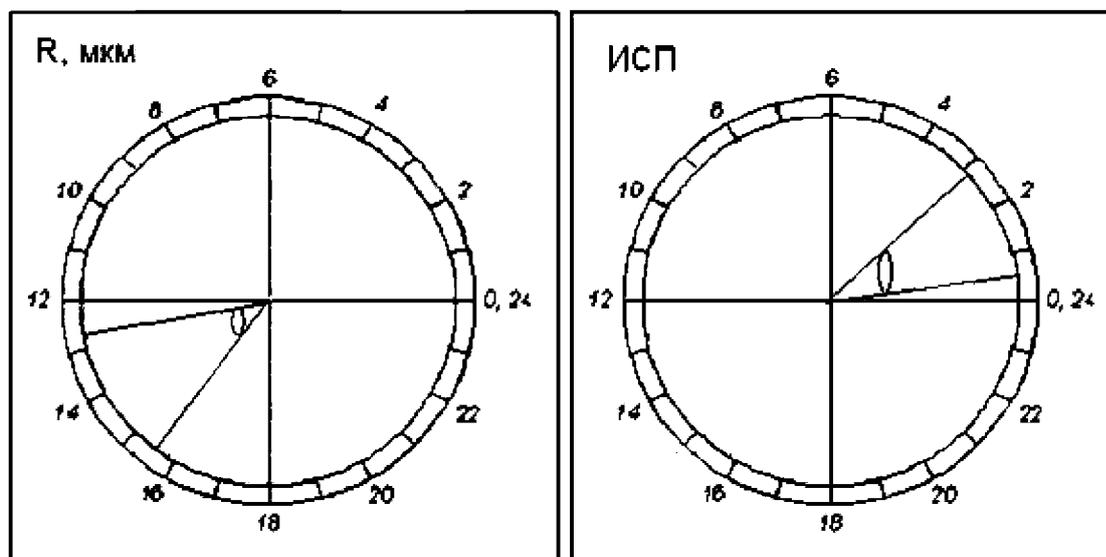


Рис. 3. Циркадианная динамика и эллипсы рассеяния основных показателей строения фации ротовой жидкости практически здоровых лиц

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 структуроупорядочения.

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. SHEMONAEV<sup>1</sup>, A.A. MALOLETKOVA<sup>1</sup>**

**D.M. FROLOV<sup>2</sup>, V.V. NOVOCHADOV<sup>2</sup>**

**I.P. RYZHOVA<sup>3</sup>**

<sup>1)</sup> *Volgograd State Medical University*

<sup>2)</sup> *Volgograd State University*

<sup>3)</sup> *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.