

## ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В СЕКРЕТЕ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ЧЕЛОВЕКА

О.В. Мячина, А.А. Зуйкова, А.Н. Пашков, А.В. Никитин, Н.В. Парфенова, А.А. Чепрасова

*Воронежская государственная медицинская Академия им. Н.Н.Бурденко*

Проведено определение и исследование ритма секреции оксида азота (NO) у практически здоровых людей. Изучалась концентрация нитратов и нитритов в секрете слюнных желез и ритмичность их секреции. Определение содержания метаболитов NO проводили колориметрическим методом, основанном на реакции Грисса. Выявлено, что ритм секреции нитратов слюнными железами различен; колебания содержания в каждой из них оксида азота относятся к ритмам средней частоты периодом около 1 часа 20 минут, а «переключение» максимальной секреции с одной железы на другую происходит с периодом около 40 минут. Поскольку железы работают асинхронно, выделяют различный по объему и концентрации NO секрет, мы полагаем, что для чистоты эксперимента нужно исследовать секрет левой и правой околоушных желез, а не смешанную слюну. При заборе биологического материала необходимо учитывать, что уровень выделяемых нитратов в секретах слюнных желез у одного и того же человека может быть различным в зависимости от времени суток, поэтому взятие проб должно производиться в строго определенное время. Так как, уровень оксида азота в секрете слюнных желез является информативным маркером состояния физиологических и патофизиологических реакций в организме, то его определение можно использовать с диагностической целью.

### ВВЕДЕНИЕ

Все живое на нашей планете подвержено воздействию ритмических процессов. В суточных биоритмах человека максимумы и минимумы активности различных биологических реакций не совпадают по времени.

Большой интерес в этом отношении представляют эндогенные ритмы на уровне отдельной клетки, ткани, органа. Их согласованная во времени работа поддерживается благодаря постоянству химического состава биологических жидкостей. Это в полной мере относится и к слюне, наименее изученной и самой недооцененной из всех жидкостей организма. Между тем, этот небольшой по объему секрет играет жизненно важную роль в сохранении интеграции тканей полости рта, обладая бактерицидным и бактериостатическим, пищеварительным, защитным и др. действием. Известно, что по химическому составу на 99% слюна состоит из воды. Оставшийся 1% составляют большие молекулы таких органических соединений, как белки, гликопротеины, липиды, небольшие молекулы органических веществ: глюкозы, моче-

вины, а также электролитов (в основном натрий, кальций, хлорид и фосфаты). Большую часть молекул органических соединений продуцируют железистые клетки, меньшую часть синтезируют клетки протоков, некоторые из них транспортируются в слюну из крови. [1, 12]. Одним из компонентов секрета слюнных желез является оксид азота (NO). NO – короткоживущая молекула, время ее полужизни всего несколько секунд, после чего она преобразуется в нитриты. Сегодня молекула оксида азота (NO) активно изучается, ей отводится роль регулятора жизненных функций организма человека и животных. Биологические эффекты NO разнообразны и могут быть как благоприятными, так и вредными. В частности, оксид азота участвует в реализации многих важных физиологических функций, таких как вазодилатация, нейротрансмиссия, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляция тонуса гладких мышц, состояние памяти, местный противовирусный и бактерицидный эффект и др., а также некоторых патологических процессов [16, 17]. Поскольку оксид азота имеет отношение почти ко всем метаболическим и физиологическим процессам, то его изучение необходимо для решения не только фундаментальных биологических задач, но медицинских.

Слюнные железы, как и другие составляющие нашего организма, работают с определенной периодичностью. Некоторые исследователи считают, что ритм секреции и выделения слюны относится к околочасовым [7]. Сведения о временных колебаниях компонентов слюны малочисленны, плохо сопоставимы и даже противоречивы [4]. Известно, что количество и состав слюны варьируют в широких пределах в зависимости не только от времени суток, но и от принятой пищи, возраста, наличия сопутствующих заболеваний, а также состояния вегетативной и центральной нервной системы [3].

В связи с этим цель нашей работы заключалась в определении содержания в нестимулированной слюне оксида азота и в исследовании его биологического ритма в секрете слюнных желез у здорового человека.

### МЕТОДИКА

Нами проведено динамическое исследование содержания оксида азота в секрете слюнных желез 33 здоровых людей в возрасте от 17 до 27 лет. Из них 12 женщин и 21 мужчины. Забор секрета слюнных желез производился на протяжении двух часов с интервалами в 20 минут. Мы выбрали время между 9 и 11 часами утра в связи с тем, что забор биологического материала производят в утренние часы, а так же в это время концентрация в слюне электролитов, затрудняющих определение других химических элементов, находится на нижней отметке диапазона циркадных вариаций, в эти часы индивидуальная вариабельность химического состава слюны наименее выражена и максимальна скорость выделения слюны. Это заключение следует из того, что именно в этот период отмечено наибольшее число минимальных значений коэффициентов вариаций средних значений концентраций содержащихся веществ [2, 4]. Исследование проводили в весенний период: с марта по май.

Перед сбором секрета слюнных желез обследуемые тщательно прополаскивали рот дистиллированной водой, 2-3 раза сплевывали в раковину. После чего в течение 10 минут собирали биологический материал при помощи слюносорборника (Sarstedt D-51588 Numbrecht), представляющего собой центрифужную пробирку, внутри которой находится контейнер с гигроскопичным тампоном, и крышку. Во время забора ротовой жидкости тампоны закладывали в места выводных протоков желез ротовой полости: в преддверии полости рта на уровне верхнего второго моляра (II большого коренного зуба) справа и слева (выводные прото-

ки околоушных слюнных желез) и в области дна полости рта у переднего края уздечки языка (выводные протоки подчелюстных и подъязычных желез) в течение 10 минут. Для предотвращения факторов, способных повлиять на состав и количество выделяемого секрета, обследуемые сидели, дышали через нос, не разговаривали. За час до сбора слюны не разрешалось курить. Сразу после забора проб тампоны со слюной помещали в пробирку и центрифугировали в течение 15 минут. Для анализа использовали по 0,5 мл секрета слюнных желез. К пробе добавляли 0,5 мл реактива Грисса (растворы альфа-нафтиламина и сульфониловой кислоты смешивали в равных объемах непосредственно перед употреблением) до объема 5мл дистиллированной водой, раствор тщательно перемешивали и через 15 минут фотометрировали против контроля в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Регистрацию спектра поглощения исследуемого раствора проводили при длине волны 540 нм в кювете 10 мм на спектроколориметре «Spekol 20». Образующийся азокраситель имеет оптическую плотность, пропорциональную концентрации нитрит ионов. Контрольную кювету заполняли дистиллированной водой, в которую также добавляли реактив Грисса. После колориметрирования проб по соответствующему калибровочному графику определяли концентрацию нитритов и нитратов в 1 мл слюны, учитывая объем выделившейся за это время жидкости.

Статистическую обработку данных проводили, используя критерий Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании жидкости, выделяемой слюнными железами, мы обнаружили, что объем секреции каждой из желез постоянно изменяется. Максимальный объем на протяжении всего времени наблюдения отмечается в секрете подчелюстных и подъязычных желез. Очевидно, это связано с тем, что выводные протоки этих желез открываются либо рядом, либо одним протоком на переднем крае уздечки языка. Таким образом, для исследования мы получаем смешанный секрет. В 9 часов утра в каждой из желез выделяется наибольшее количество жидкости за все время наблюдения. Уже через 20 минут объем секреции снижается (достоверная разница для левой железы –  $p < 0,05$ , для правой –  $p < 0,045$  и для смешанного секрета –  $p < 0,05$ ). С 9:20 до 10:40 объем секрета в слюнных железах достоверно не изменяется (Таб. 1).

Таб. 1.

Мезор и размах ритмов выделения оксида азота в секрете слюнных желез в зависимости от объема секрета.

Мезор	время	л		п		п/я	
		С, мкг/мл	V, мл	С, мкг/мл	V, мл	С, мкг/мл	V, мл
Мезор	9:00	8,65	1,26	9,33	1,30	4,52	1,54
	9:20	6,14	0,93	6,42	1,00	5,57	1,38
	9:40	4,29	0,94	6,39	0,91	6,45	1,2
	10:00	6,0	0,98	6,30	0,92	5,94	1,28
	10: 20	9,1	0,91	8,31	0,75	8,83	1,28
	10: 40	7,51	0,86	6,7	0,85	5,61	1,24
Размах	9:00	3,9-16,9	0,95-2,10	4,0-17,7	0,23-1,85	1,25-11,6	0,70-2,10
	9:20	0,7-12,4	0,11-2,0	2,45-16,4	0,05-2,0	1,5-17,7	0,28-2,05
	9:40	1,15-7,25	0,15-2,0	2,2-14,6	0,10-2,0	3,55-9,9	0,4-1,9
	10:00	1,6-18	0,14-2,10	2,45-18,5	0,20-2,1	2,05-10,4	0,5-1,8
	10: 20	4,1-18,9	0,2-2,0	4,85-16,7	0,25-1,95	4,45-19,45	0,33-1,8
	10: 40	2,15-15,65	0,2-1,87	1,25-11,9	0,3-1,85	1,6-13,2	0,6-1,75

**Примечание:** л – левая околоушная железа, п – правая околоушная железа, п/я – подъязычная и поднижнечелюстная железы; С – концентрация NO в секрете слюнной железы, V – объем секрета.

При исследовании здоровых людей мы обнаружили, что уровень нитратов в секрете слюнных желез в течение всего времени наблюдения так же неодинаков. Большая вариабельность показателей концентрации оксида азота (Таб. 1) согласуется с данными литературы [6]. Возможным объяснением большого разброса значений концентраций NO может служить наличие многих факторов, влияющих на эти показатели: диета, которой придерживается исследуемый, индивидуальные особенности клиренса, стресс и др.

Биологический ритм секреции оксида азота, для наглядности, проследим отдельно в каждой исследуемой слюнной железе. Нами определено, что 9 часов утра наибольшее содержание NO наблюдается в правой околоушной железе (п) – 9,33 мкг/мл, спустя 20 минут отмечается достоверное снижение концентрации нитратов ( $p < 0,05$ ) – 6,42 мкг/мл. С

9:20 до 10:00 количество оксида азота остается сниженным и существенно не изменяется. К 10:20 вновь происходит достоверный прирост NO ( $p < 0,054$ ) и его концентрация составляет 8,31 мкг/мл. В течение последующих 20 минут содержание нитратов снижается до 6,7 мкг/мл (рис. 1).

В секрете подчелюстных и подъязычных желез (п/я) в 9:00 уровень оксида азота наименьший – 4,53 мкг/мл. К 9:20 активность желез возрастает, содержание нитратов в них – 5,57 мкг/мл и к 10 ч. 40 мин. их количество продолжает достоверно увеличиваться ( $p < 0,005$ ) и составляет уже 6,44 мкг/мл. В 10 часов утра наблюдается спад секреции NO в подчелюстных и подъязычных железах до 4,3 мкг/мл. К 10:20 концентрация, выделяемого оксида азота в смешанном секрете вновь достоверно ( $p < 0,045$ ) увеличивается и составляет 8,83 мкг/мл. В течение

Уровень секреции оксида азота в правой околоушной железе

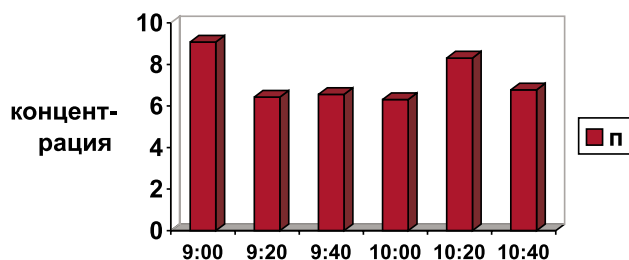


Рис. 1.

Уровень секреции оксида азота подчелюстными и подъязычными железами

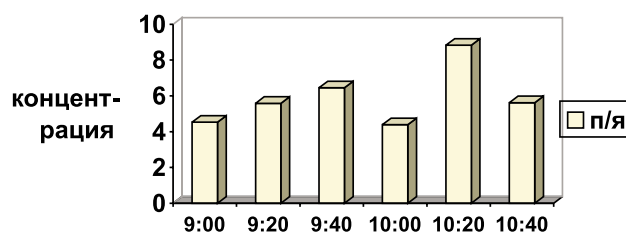


Рис. 2.

Уровень секреции оксида азота в левой околоушной железе

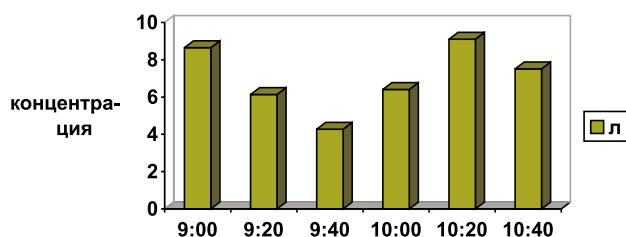


Рис. 3.

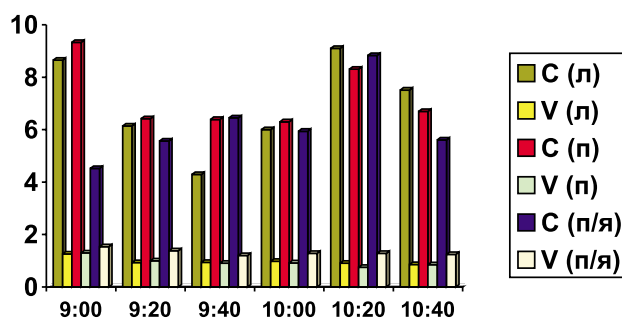
последующих 20 минут уровень нитратов в секрете железы снижается до 5,61 мкг/мл (рис. 2).

В 9 часов утра в левой околоушной железе (л) – концентрация NO составила 8,65 мкг/мл. Затем на протяжении 40 минут наблюдается снижение нитратов: так в 9:20 концентрация NO в ее выделениях составляет 6,14 мкг/мл, а к 9:40 снижается до 4,29 мкг/мл. В 10 часов утра наблюдается увеличение исследуемого показателя до 6 мкг/мл. К 10:20 продолжающийся прирост количества оксида азота в секрете ( $p < 0,05$ ) приводит к максимальной экскреции нитратов левой околоушной железой по сравнению с другими железами – их содержание в ее секрете 9,1 мкг/мл. К 10:40 уровень нитратов снижается до 7,51 мкг/мл. (рис. 3).

В результате проведенного исследования, мы выявили, что в 9 часов максимальное содержание NO в секрете правой околоушной железы, минимальное – в подчелюстных и подъязычных, в левой железе определяются средние значения. При обработке этих данных получены статистически достоверные различия между уровнем NO в секретах правой и левой околоушных желез по сравнению с подчелюстными и подъязычными ( $p < 0,055$ ). К 9:40 происходит инверсия показателей: активность правой околоушной железы сменяется усиленной работой подчелюстных и подъязычных желез. К 10:20 вновь происходит достоверная смена доминирующих желез:  $p < 0,05$  для секрета левой,  $p < 0,054$  для правой и  $p < 0,055$  для смешанного секрета. Максимально нитраты начинают экскретироваться в левой околоушной железе.

Достоверность данных, полученных при сравнении содержания оксида азота в секретах слюнных желез, позволяют выявить в их работе ритм секреторной деятельности выделения оксида азота в виде циклов с периодом около 40 минут. Однако фазы активности каждой из желез смещены друг относительно друга, поэтому, когда одна из желез наиболее активна в других происходит спад секре-

Зависимость концентрации NO от объема секреции



где С (л) – концентрация NO в левой околоушной железе; С (п) – концентрация NO в правой околоушной железе; С (п/я) – концентрация NO в поднижнечелюстной и подъязычной железе.

Рис. 4.

ции NO. Кроме того, в течении двух часов наблюдения за экскрецией NO каждой из желез, мы обнаружили 2 пика активности с периодом около 1 часа 20 минут. Цикл состоит из фазы относительного покоя, когда концентрация оксида азота постепенно снижается и в течение какого-то времени существенно не изменяется ( $\pm 20$  минут) и фазы секреторной активности, во время которой происходит увеличение содержания нитратов.

В связи с этим, в зависимости от того в какое время происходит забор биологического материала, уровень выделяемых нитратов в секретах слюнных желез у одного и того же человека может быть различным. Это необходимо учитывать при взятии проб и производить забор в строго определенное время на протяжении 10 минут.

Объем выделяющейся за это время жидкости в каждой из желез, неодинаков. Количество NO так же постоянно варьирует. В связи с этим, интересно пронаблюдать зависимость выделяющихся нитратов от общего объема секреции для каждой из желез (рис. 4).

Из представленного графика видно, что концентрация выделенного NO находится в обратной зависимости от объема секреции. По – видимому, с уменьшением объема происходит концентрирование экскретируемых веществ, что и повышает содержание оксида азота.

Таким образом, результаты проведенных ритмологических исследований позволили установить:

1. У здоровых людей в возрасте 17- 27 лет обнаружены статистически значимые различия в секреции оксида азота в слюнных железах.
2. Ритм секреции NO слюнными железами относится к ритмам средней частоты с перио-

дом около 40 минут (происходит «переключение» максимальной экскреции нитратов с одной железы на другую). Период работы каждой из желез составляет около 1 часа 20 минут.

3. При заборе биологического материала необходимо учитывать, что уровень выделяемых нитратов в секретах слюнных желез у одного и того же человека может быть различным в зависимости от времени суток, поэтому взятие проб должно производиться в строго определенное время.

4. Поскольку железы работают асинхронно, выделяют различный по количеству и концентрации NO секрет, мы полагаем, что для чистоты эксперимента нужно использовать секрет левой и правой околоушных желез, а не смешанную слюну.

5. Так как, уровень оксида азота в секрете слюнных желез является информативным маркером состояния физиологических и патофизиологических реакций в организме, то его определение можно использовать с диагностической целью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ванин А. Ф.* // Биохимия. 1998. Т. 63. №7. С. 867-869.

2. *Багиров Ш. Т., Зайчик В. Е., Калашиков В. М.* / Азербайджанский медицинский журнал. 1985. №8. С.29-33.

3. *Боровский Е. В., Грошиков М. Н., Патрикеев Е. К.* Терапевтическая стоматология. М. 1973.

4. *Зайчик В. Е., Багиров Ш. Т.* // Стоматология. 1991. Т. 70. №1. С. 14-17.

5. *Кадиоров Ш. К., Бутабаев М. Т., Мун Н.* // Медицинский журнал Узбекистана. 1990. №5. С. 29.

6. *Кобьялянский А. Г., Кузнецова Т. В., Соболева Г. Н., 4. Бондаренко О. Н. и др.* // Биомедицинская химия. 2003. Т. 49. № 6. С. 597-603.

7. *Комаров Ф. И., Рапопорт С. И.* Хронобиология и хрономедицина. Триада-Х. 2000. 488 с.

8. *Коротько Г. Ф., Кадиоров Ш.* // Стоматология. 1994. Т. 73. № 1. С.26-28.

9. *Курносков М. Н.* // Лабораторное дело. 1991. №3. С.34-37.

10. *Лебедев Н. Н.* Биоритмы пищеварительной системы. М. Медицина. 1987. 256 с.

11. *Маркелова Е. В., Майстровская Ю. В., Майстровский К. В., Шуматова Т. А.* // Иммунопатология. 2000. № 3. С. 11-12.

12. *Марков Х. М.* // Успехи физиол. наук. 1996. Т. 27. №4. С.30-43.

13. *Пискунович М. Л., Яковлева В. И.* // Здоровоохранение Белоруссии. 1985. №1. С. 36-38.

14. *Пожарицкая М. М., Максимовский Ю. М., Макарова О. В. и др.* // Стоматология. 1992. Т. 71. № 3/4/5/6. С.53-55.

15. *Суходуло В. Д., Дидоренко А. О., Гайнутдинова Р. К. и др.* // Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова. 1970. №12. С. 1820-1827.

16. *Nakaki T.* Physiological and clinical significance of NO (nitric oxide) – a review. Keio J. Med.-1994; Vol.43; 15-26.

17. *Nathan C., Xie Q.* Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell. 1994; Vol.79; 915-918.