

ЛЕКЦИЯ

УДК 577.1

© Коллектив авторов

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ

Т.П. Вавилова^{1}, И.Г. Островская¹, А.Е. Медведев^{1,2}*

¹Московский государственный медико-стоматологический университет
имени А.И. Евдокимова, Москва, эл. почта: tpvavilova@rambler.ru

²Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
Научно-исследовательский Институт Биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича Российской Академии Медицинских Наук
(ФГБУ "ИБМХ" РАМН), Москва

Слюна – биологическая жидкость человека, легкодоступная для анализа самых разнообразных соединений. С появлением новых методик, позволяющих определять низкие концентрации химических веществ, интерес к исследованиям слюны заметно возрос. Определение гормонов в слюне имеет важное значение при изучении различных (пато)физиологических состояний. В данной лекции рассмотрены возможности исследования гормонов в слюне и их потенциальная диагностическая ценность.

Ключевые слова: слюна, гормоны, особенности определения, патология.

ВВЕДЕНИЕ. Все клетки, ткани и органы человека взаимосвязаны между собой и в этой взаимосвязи важную роль играет эндокринная система, реализующая своё действие путём секреции гормонов, поступающих в кровь, и оказывающих воздействие на клетки-мишени. К клеткам-мишеням гормоны доставляются по кровеносному руслу либо в свободной форме, либо в связанном со специфическими белками. Транспорт гормонов определяется их химической природой. После инактивации гормонов образуются их метаболиты. Они как и неизменённые гормональные вещества находятся не только в плазме крови, но могут попадать в мочу и другие биологические жидкости, в частности в слюну.

В последнее время возрос интерес к исследованиям слюны. Это связано как с лёгкостью её получения, так и появлением новых методик, позволяющих определять очень малые концентрации химических веществ.

Слюна содержит определённый уровень и набор гормонов, но скорость и возможность их поступления из плазмы крови в секрет слюнных желёз регулируется их клетками.

1. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА УРОВЕНЬ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ

В первую очередь – это механизмы их транспорта. Свободные стероидные гормоны из плазмы крови попадают в клетки слюнных желёз, а затем в слюнный проток путём диффузии по градиенту концентрации. Однако, содержание стероидных гормонов в слюне отличается от их содержания

* - адресат для переписки

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ

в плазме крови. Так, например, слюна содержит только 10% свободного кортизола от его количества в плазме крови.

Часть гормонов пептидной природы, например инсулин, попадает в слюну с помощью белков-переносчиков. Селективность транспорта инсулина в полость рта подтверждает тот факт, что количество этого гормона увеличивается в слюне после повышения уровня глюкозы в крови. В то же время, образующийся в ходе протеолитического процессинга молекулы проинсулина, С-пептид, в слюне не обнаруживается. Считается, что ряд гормонов, которые синтезируются в клетках слюнных желёз, секретируются путём экзоцитоза (рисунок).

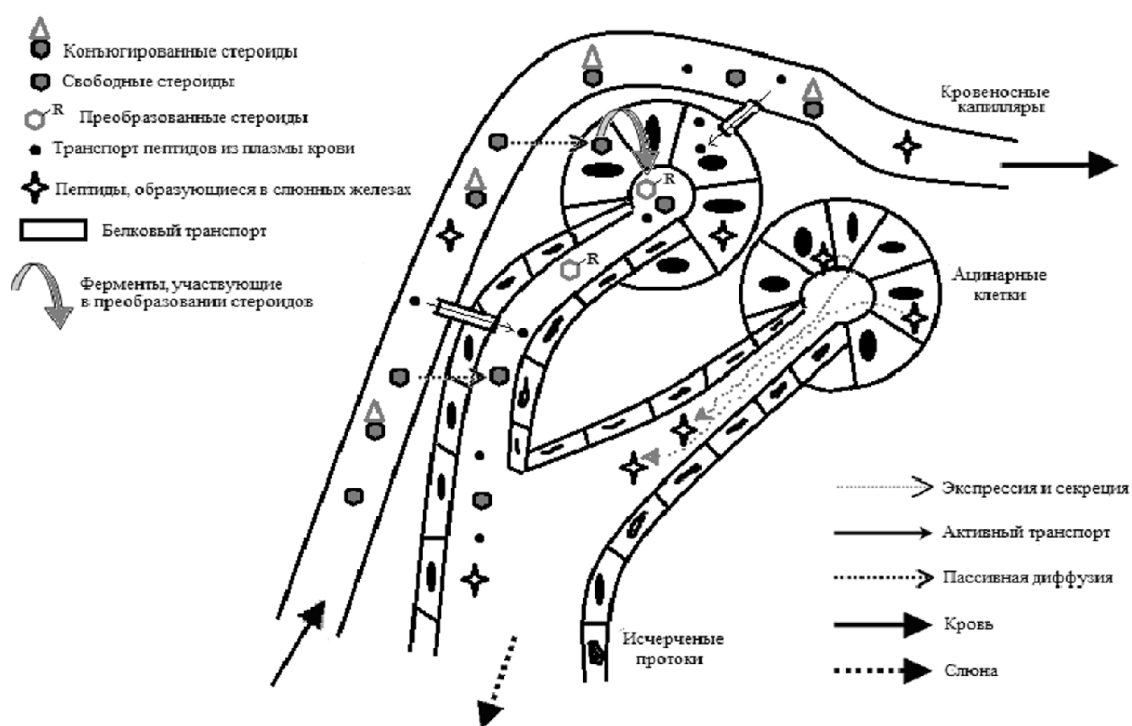


Рисунок.

Механизмы транспорта гормонов в смешанную слюну.

Во-вторых, в слюне зачастую определяются не сами гормоны, а их метаболиты. Так, стероидные гормоны захватываются гепатоцитами и более 95% кортизола и кортизона вступают в реакцию конъюгации с остатками глюкуроновой и серной кислот, что сопровождается изменениями их растворимости. Поскольку данные вещества становятся гидрофильными, то они из плазмы крови поступают в почки и выводятся с мочой, поэтому только в слюне определяется только 1% нативного кортизола.

Стероидные гормоны в печени подвергаются не только конъюгации, но и действию фермента 11 β -гидроксистеролдегидрогеназы. Таким способом значительные количества кортизола превращаются в биологически неактивный кортизон, из которого в последующем образуется тетрагидрокортизон.

Все эти превращения обуславливают экскрецию примерно равных количеств метаболитов кортизона и кортизола. При исследовании слюны эти превращения часто недооценивают, но они влияют на показатели уровня

и клиренса кортизола. Несомненно, всё вышесказанное вызывает сложности при исследовании стероидных гормонов в слюне.

В-третьих, на уровень гормонов в слюне влияют методы сбора слюны и её хранения. Существуют различные способы получения слюны. Они включают сбор данной биологической жидкости без стимуляции и с применением таких стимуляторов как парафин, лимонная кислота и др. Однако, анализируя стимулированную слюну следует помнить об эффекте разведения, обусловленном большим содержанием воды по сравнению с нестимулированной слюной.

Смешанную слюну можно собирать как в стандартные мерные стеклянные ёмкости, так и в специальные полипропиленовые контейнеры, а также с помощью впитывающего хлопкового или синтетического тампона, помещённого на дно полости рта.

Сниженное содержание гормонов в образцах стимулированной слюны может быть обусловлено их адсорбцией на парафине и хлопковых тампонах. Действительно, замена хлопкового тампона на синтетический или использование специальных систем, таких как Salivette (“Sarstedt”, Германия), Quantisal (“Immynalysis”, Канада), Saliva Collection System (“Greiner BioOne”, Австрия) улучшает качество анализа и влияет на уровень гормонов в исследуемых образцах слюны.

На уровне гормонов в слюне сказываются и условия её хранения. Ряд гормонов, в первую очередь стероидные гормоны (андрогены и глюкокортикоиды) сохраняют свои свойства при хранении образцов слюны при комнатной температуре в течение нескольких дней. Добавление консервантов значительно продлевает стабильность стероидных молекул слюны, что имеет существенное значение, например, для пересылки образцов слюны почтой.

Наиболее “капризными” при сборе и подготовке образцов слюны для исследования являются гормоны пептидной природы. Они обладают способностью адсорбироваться на стенках пробирки при сборе слюны, а также гидролизуются при участии протеолитических ферментов клеточного происхождения. Эти факторы обеспечивают существенные потери при исследовании данных гормонов. Единственным выходом является исследование образцов сразу после их получения, или добавление консервантов. Особенно это касается гормонов с коротким периодом жизни. Адсорбционная потеря и протеолиз гормонов могут быть минимизированы при сборе слюны через катетер, хранении образцов слюны в криопробирках и добавлении таких консервантов как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

В-четвёртых, не менее важным является способ определения гормонов в слюне. Первые лабораторные методы исследования гормонов носили “кустарный” характер. Развитие радиоизотопной диагностики *in vitro* относится к началу 60-х годов прошлого столетия, когда были обоснованы первые методики радиоконкурентного анализа. Введение в конкурентный анализ радиоиммунологической реакции “антиген-антитело” резко увеличило как специфичность и чувствительность, так и точность исследований, что теперь позволяет определять довольно низкие концентрации гормонов в образце. Эти методы широко использовались для определения стероидных гормонов. Расширение лабораторных возможностей ознаменовалось появлением методов иммуноферментного анализа, которые позволили детектировать не только стероиды, но и гормоны пептидной природы (табл. 1).

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ

Таблица 1. Концентрация гормонов, определяемых в слюне разными методами.

Гормоны	Метод	Особенности	Концентрация
Кортизол	DELFA РИА ИФА	сбор образцов слюны сразу после сна	3,6–35,1 нмоль/л
Тестостерон	ИФА	уменьшение концентрации при хранении образцов при 25°C	140,30±154,15 пг/мл
Дегидроэпи- андростерон- сульфат	ИФА	нет эффекта от хранения образцов при 25°C	291,21±294,81 пг/мл
Прогестерон	РИА	антитела связываются с другими стероидными гормонами	в лютеиновую фазу: 436±34 пмоль/л в фолликулярную фазу: 22,1±2,7 пмоль/л
Эстрадиол	РИА	антитела связываются с другими стероидными гормонами	в лютеиновую фазу: 20,6±0,4 пмоль/л
Альдостерон	РИА		138–475 пмоль/л
Катехоламины	ВЭЖХ	определяются метилированные метаболиты катехоламинов	250–800 пг/мл
Трийодтиронин (Т ₄)	ИФА	сбор образцов слюны в утренние часы до 9.00	1,10±0,07 нмоль/л
Соматотропин	ИРМА		8,6±11,1 мкЕ/л

Примечание: DELFIA – двухсайтовый флуоресцентный иммуноанализ; РИА – радиоиммунологический анализ; ИФА – иммуноферментный анализ; ИРМА – иммунорадиометрический анализ; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

В последнее время для быстрого мультианалитического определения гормонов в слюне стали применять белковые чипы. Высокой аналитической чувствительностью и специфичностью обладает жидкостная хроматография и её использование особенно важно при определении гормонов белковой природы. Применение этой методики позволяет выявлять такой низкомолекулярный пептид как гормон “голода”, грелин.

Активно применяемый в последнее время протеомный анализ слюны позволяет качественно выявлять наличие гормонов в этой биологической жидкости, но пока редко используется для количественного анализа.

Трудно установить референсные значения, в частности, андрогенов в слюне, количество которых варьирует в зависимости от возраста обследуемого. Кроме того, на определение различных гормонов сказывается растущее количество на мировом рынке наборов реагентов от разных фирм-производителей. Для того, чтобы с полной уверенностью говорить о сходстве или отличиях в определении концентраций гормонов теми или иными тест-системами, необходимо устранить возможные вариации, возникающие при проведении анализов в разных лабораториях, более того – в разных городах, что неминуемо связано с замораживанием/размораживанием образцов, их транспортировкой. Поэтому желательно определять концентрации гормонов в слюне в пределах одной лаборатории с использованием тест-систем одного и того же производителя.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГИПОФИЗ-НАДПОЧЕЧНИКИ

Ежедневно организм человека подвергается многочисленным стрессорным воздействиям, и ответная реакция обусловлена выбросом катехоламинов и *стероидных* гормонов. Однако, определение катехоламинов в слюне, вследствие их нестабильности и низкой концентрации, практически невозможно. При этом следует помнить, что вместе с адреналином при стрессе секретируются другие вещества, определение которых можно использовать в качестве альтернативного анализа. К таким соединениям относят кислый пептид – *хромогранин* А. Он стабилен и легко определяется в смешанной слюне. Увеличение его количества в слюне выявляется при сильном звуковом воздействии, а снижение – после приступов длительного смеха. На фоне стресса также меняется количество фермента α -амилазы, уровень которой в слюне может служить маркером адренергической стимуляции.

Для хронического стресса характерно повышение уровня кортизола. Его можно исследовать в слюне, но следует учитывать целый ряд особенностей. Сбор материала должен проводиться в комфортных для обследуемого условиях, в противном случае имеется риск получения заведомо завышенных показателей, но с другой стороны, получение образцов слюны, в отличие от забора крови, не вызывает у обследуемого психологического напряжения. Поэтому, исследование уровня гормонов в слюне для психологической оценки стресс-неустойчивых пациентов, более предпочтительно. Также следует учитывать и то, что концентрация кортизола в слюне значительно ниже, чем в плазме крови и не всегда удаётся найти корреляции между уровнем этого гормона и развитием хронического стресса.

Имеются определённые разночтения в оценке хронического стресса по уровню кортизола в слюне. Так, было показано, что уровень кортизола в слюне повышается на фоне хронического стресса, у социально неудовлетворённых людей и на фоне депрессивных состояний. Однако, не выявлена корреляция между количеством кортизола в слюне и уровнем стресса. Возможно, что это связано с физиологическими особенностями или патологическими процессами, протекающими в организме. Кроме того, вариабельность уровня кортизола в слюне может зависеть от методологических подходов к исследованию, таких как стандартизация времени суток сбора слюны, а также наличие референсных значений, необходимых для интерпретации результатов.

В работах по изучению влияния острого и хронического стресса на состояние слюнных желёз и состав смешанной слюны было показано, что стрессорные воздействия приводят к морфологическим изменениям в слюнных железах, уменьшению объёма выделяемой слюны, снижению активности ряда секреторных ферментов, количественным и качественным изменениям белкового состава слюны.

Выделение кортизола со слюной возрастает при увеличении уровня личностной тревожности. При этом установлены достоверные корреляционные связи между изменением концентрации кортизола в слюне и уровнем тревожности у детей, имеющих нарушение функции внимания. Была обнаружена достоверная взаимосвязь между личностными особенностями и содержанием кортизола в слюне. При разделении больных по шкале экстраверсии, наиболее высокая концентрация кортизола в слюне имела у интравертов, а самая низкая у экстравертов. Примечательно, что корреляции между выраженностью экстраверсии в баллах и содержанием кортизола отсутствуют. Так, наиболее высокий уровень кортизола в слюне наблюдается

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ

у меланхоликов, несколько меньший у флегматиков, а у холериков содержание кортизола в слюне было ниже по сравнению с меланхоликами. Самый низкий уровень кортизола был зарегистрирован у сангвиников.

Предлагается проводить определение уровня кортизола в слюне с целью объективной оценки адаптации человека к изменяющимся условиям внешней среды. Однако, проведённый мультифакторный корреляционный анализ не выявил взаимосвязи между количеством кортизола в слюне и полом, возрастом и степенью выраженности вегетативных реакций (кроме дермографизма).

Определение кортизола в слюне используют не только для оценки стрессорных состояний, но и в целях диагностики таких патологических процессов как явление гиперкортицизма. Синдром гиперкортицизма проявляется в избыточном образовании гормонов коры надпочечников, и наиболее часто эндогенный гиперкортицизм обусловлен повышенной выработкой в гипофизе адренокортикотропного гормона. Он может возникнуть на фоне передозировки глюкокортикоидов при лечении различных заболеваний (экзогенный гиперкортицизм). Достаточно часто гиперсекреция кортизола наблюдается при ожирении, хронической алкогольной интоксикации, беременности и некоторых психических и неврологических заболеваниях (функциональный гиперкортицизм). У пациентов с гиперкортицизмом секреция кортизола повышена круглосуточно. Именно поэтому круглосуточный мониторинг уровня кортизола удобнее проводить по слюне, а не по плазме крови. Существенным моментом для этих пациентов является то, что для такого исследования не требуется их госпитализация, а сбор слюны можно проводить и в домашних условиях для последующего анализа в лаборатории. Не менее важным является возможность исследования количества кортизола слюны в ночное время суток для контроля за лечением синдрома Иценко-Кушинга. В силу различных клинических проявлений болезни Иценко-Кушинга возникают трудности в интерпретации результатов уровня кортизола в слюне, собранной в ночное время суток. Поэтому, для определения уровня кортизола в течение суток, помимо сбора слюны, дополнительно рекомендуется собирать мочу. Вследствие простоты и удобства сбора слюны, измерение кортизола особенно предпочтительно у педиатрических и гериатрических пациентов. Определение кортизола в слюне показано для выявления функционального гиперкортицизма и его контроля при лечении дексаметазоном.

При врождённой гиперплазии коры надпочечников в слюне определяются высокие концентрации предшественника кортизола – 17-гидроксипрогестерона, уровень которого следует анализировать в слюне трижды в день (утром, в полдень и вечером). Данный показатель позволяет судить о качестве заместительной терапии врождённой гиперплазии надпочечников кортизолом, преднизолоном и дексаметазоном. При многих формах врожденной гиперплазии коры надпочечников усиливается секреция в этих эндокринных железах андрогенов. Это приводит к вирилизации (маскулинизации) пациенток женского пола. Поэтому в дополнении к исследованию 17-гидроксипрогестерона в слюне можно определять уровень андростендиона.

Несмотря на целый ряд положительных моментов при исследовании гормонов коры надпочечников в слюне, всё же необходимо помнить, что непрерывный сбор слюны снижает количественный состав глюкокортикоидов в слюне. Небрежность сбора слюны и её хранения, часто наблюдаемая у детей и подростков, приём лекарственных препаратов непосредственно перед сбором образца, могут затруднить достоверную оценку диагноза и эффективности проводимого лечения.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ

В слюне присутствуют женские и мужские половые гормоны – **андрогены, эстрогены и прогестерон**. По исследованию концентрации эстрадиола и прогестерона в слюне было предложено определять фазы овуляторного цикла (табл. 2). Определение концентраций прогестерона является важным показателем оценки функции яичников. Так, концентрация прогестерона в слюне в фолликулярную фазу значительно меньше, а в перiovуляторный период его концентрация достигает пиковых значений. Определение прогестерона в слюне (реже эстрадиола) необходимо проводить в комплексе с выявлением уровня этих гормонов в моче. Анализ на присутствие и количества тестостерона в слюне используется и для выявления мужского гипогонадизма или эугонадизма. Показатели слюны очень хорошо коррелируют с наличием свободного тестостерона в крови. При дефиците андрогенов у мужчин количество тестостерона в слюне достигает менее 25 пмоль/л, а в случае более высокого уровня данного мужского полового гормона в слюне диагноз гипогонадизм может быть снят.

Таблица 2. Концентрация половых гормонов в смешанной слюне и плазме крови (по данным различных авторов).

Гормоны	Обследуемые	Смешанная слюна	Плазма крови	Ед. изм.
Альдостерон	женщины	29-118	80-790	пмоль/л
Андростендион	мужчины	140-630	1200-11000	пмоль/л
	женщины	62-482	1400-11900	пмоль/л
ДГЭА	женщины в менопаузе	0,3-1,0	4,5-34,5	нмоль/л
	мужчины	0,3-1,7	6,2-43,3	нмоль/л
Эстрадиол	женщины фолликулярная фаза овуляторного цикла	2-18	26-650	пмоль/л
	женщины межфазовый пик овуляторного цикла	9-29	180-1420	пмоль/л
Эстриол	женщины гестация 40 недель	4,5-9,8	330-1596	пмоль/л
Эстрон	женщины	10-21	92-1294	пмоль/л
	мужчины	10-21	92-555	пмоль/л
17-ОН- прогестерон	мужчины	50-360	150-4900	пмоль/л
	женщины, лютеиновая фаза	140-320	600-8800	пмоль/л
Прогестерон	женщины фолликулярная фаза	< 160	500-3500	пмоль/л
	женщины лютеиновая фаза	200-1600	4900-72000	пмоль/л
Тестостерон	женщины в менопаузе	10-52	200-2860	пмоль/л
	мужчины	95-205	9900-27800	пмоль/л
5α-дигидро- тестостерон	женщины в менопаузе	10-26	80-1270	пмоль/л
	мужчины	34-172	860-3410	пкмоль/л

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОРМОНОВ В СЛЮНЕ

Количество андрогенов и эстрогенов зависит от полового созревания и может меняться при патологии репродуктивной системы. Уровень прогестерона и эстрогенов в слюне, как и в плазме крови, меняется в фазы менструального цикла. Исследования в слюне 17β -эстрадиола используют у пациенток с бесплодием. Установлено, что уровень 17β -эстрадиола в слюне коррелирует с таковым в плазме крови. При поликистозе яичка, сопровождающегося бесплодием, в слюне повышается концентрация свободного тестостерона, а при поражении надпочечников и использовании в заместительной терапии кортизола в слюне увеличивается содержание 17α -гидрокситестостерона. На ранних сроках беременности и при раке печени в слюне появляется хорионический гонадотропин.

В коре надпочечников и частично в половых железах из 17-гидроксипрогестерона образуется дегидроэпиандростерон (ДГЭА), который через фосфолипидный слой мембран эпителиальных клеток из расположенных рядом кровеносных сосудов свободно попадает в полость рта и слюну. Однако, между уровнями ДГЭА в образцах слюны и плазмы крови отсутствует корреляция. Появлению типичных признаков половой зрелости предшествует повышение активности надпочечников, отражающееся на уровне ДГЭА. Низкий уровень ДГЭА в слюне обнаруживают при задержке полового созревания, а его повышение наблюдается при преждевременном половом созревании (табл. 3).

Таблица 3. Возрастные и гендерные показатели уровня ДГЭА в слюне в норме (в утреннее время).

Женщины		Мужчины	
Возраст (лет)	Диапазон концентраций (пг/мл)	Возраст (лет)	Диапазон концентраций (пг/мл)
20 - 29	106 - 300	20 - 29	137 - 336
30 - 39	77 - 217	30 - 39	82 - 287
40 - 49	47 - 200	40 - 49	68 - 221
50 - 59	38 - 136	50 - 59	49 - 177
60 - 69	36 - 107	60 - 69	40 - 158
70 - 79	32 - 99	70 - 79	35 - 135
> 80	33 - 90	> 80	37 - 106

Дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭА-С) секретируется корой надпочечников (95%) и яичниками (5%). Он выделяется с мочой и составляет основную фракцию 17-кетостероидов. В процессе метаболизма ДГЭА-С в периферических тканях образуются тестостерон и дигидротестостерон. Наличие заряженной группы препятствует транспорту ДГЭА-С через мембрану клетки во внеклеточное пространство. Поэтому присутствие в слюне ДГЭА-С чаще всего связано с кровоточивостью в полости рта.

Андростендион образуется в надпочечниках и гонадах и является промежуточным продуктом при синтезе как тестостерона, так и эстрона. Андростендион проявляет относительно слабую андрогенную активность, которая соответствует $\leq 20\%$ от активности тестостерона. Однако уровни андростендиона в сыворотке (и в норме, и при патологии) часто выше, чем тестостерона. У женщин секреция и скорость образования андростендиона

выше таковых для тестостерона, причем значительно выражена венадпочечниковая конверсия андростендиона в тестостерон. Наиболее высокие уровни андростендиона определяются утром. Повышенные уровни свидетельствуют о врожденной вирилизирующей гиперплазии надпочечников, синдроме поликистозных яичников, стромальном гипертекозе яичников, дефиците 3β -гидрокси-стероиддегидрогеназы и других случаях гирсутизма (оволосение по мужскому типу) у женщин, при вирилизирующих опухолях надпочечников или яичников. В слюне женщин в норме концентрация андростендиона невысока, а при гирсутизме она возрастает в 2-6 раз. У мужчин в слюне уровень этого гормона не отличается от такового у женщин.

4. ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ГОРМОНОВ ЭПИФИЗА В СЛЮНЕ

Деловая жизнь многих людей требует от них перемещений в различные часовые пояса. Внутренние часы человека зачастую не могут приспособиться к этим изменениям, вызывая явление нарушения ритма организма, относящееся к разобщению между циркадным ритмом и местным временем. Поэтому основным заказчиком исследований уровня мелатонина в слюне является хрономедицина. **Мелатонин** – производное аминокислоты триптофана, секретируется эпифизом в ночное время суток. В течение дня концентрация мелатонина снижается до очень низких значений. Поскольку мелатонин проходит эпителиальные барьеры таким же образом как стероиды, то это позволяет определять его в слюне.

Концентрация мелатонина, очень низкая днем (1-3 пг/мл), начинает возрастать часа за два до привычного для данного субъекта времени отхода ко сну, при условии, что в это время человек не находится на ярком свете. Быстрый рост уровня мелатонина наблюдается после выключения света в спальне, достигая 100-300 пг/мл. В ранние предутренние часы обычно начинается снижение уровня мелатонина, достигая своего минимума после пробуждения.

Показано, что мелатониновый паттерн у каждого человека на удивление стабилен от ночи к ночи, в то время как паттерны разных людей одного пола и возраста в деталях настолько различны, что дает основание говорить об индивидуальном паттерне, характеризующем данную личность.

Секреция мелатонина подчинена суточному ритму, определяющему, в свою очередь, ритмичность гонадотропных эффектов и половой функции. У взрослого человека за сутки синтезируется около 30 мкг мелатонина, и его концентрация в сыворотке крови ночью в 30 раз больше, чем днем, причём пик активности приходится на 2 часа ночи. Постепенное снижение циркадных уровней гормона, определяемого в слюне, происходит довольно рано, приблизительно около 40 лет. Пациенты среднего возраста сохраняют лишь 60% амплитуды выброса мелатонина молодых пациентов и самые низкие дневные его уровни, хотя при этом у них самая длинная продолжительность пиковых концентраций содержания гормона.

Синтез и секреция мелатонина зависят от освещённости. Избыток света понижает его образование, напротив, снижение освещённости увеличивает синтез и секрецию гормона. Исследование циркадного ритма концентрации мелатонина в слюне выявило, что у 50% добровольцев максимальная концентрация мелатонина была в вечерние часы, у 31% добровольцев не выявлено различий между утренним и вечерним уровнем гормона, а у 19% обследованных утренние значения данного показателя превышали вечерние.

Кроме суточного существует и сезонный паттерн выделения мелатонина. По-видимому, именно с ритмом секреции мелатонина связаны,

в конечном счёте, хорошо известные сезонные изменения в общей активности и эмоциональном состоянии человека (включая так называемые “сезонные депрессии”).

5. ИССЛЕДОВАНИЕ В СЛЮНЕ ГОРМОНОВ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В тимусе (вилочковая железа) образуются пептидные гормоны: тимозин- α_1 (3,1 кДа), тимозин- β_1 (8,5 кДа), тимозин- β_4 (5,0 кДа) и др. Тимозины стимулируют продукцию иммуноглобулинов, участвуют в дифференцировке Т-лимфоцитов, активируют синтез многих интерлейкинов. В слюне новорождённых детей обнаружено присутствие тимозина- β_4 и тимозина- β_{10} . Соотношение между этими гормонами остаётся величиной постоянной до достижения ребёнком возраста 1,5 лет. Концентрация тимозина- β_4 в слюне увеличивается по мере роста ребёнка и наибольшего уровня достигает в возрасте 7 месяцев, что в 20 раз превышает таковую у взрослых людей. У младенцев в секрете слюнных желёз выявляются активные секреторные гранулы, которые содержат тимозины- β . Пик активности этих гормонов в слюне выявлена от 12 до 24 недели жизни новорождённого младенца, которая впоследствии снижается и практически исчезает по мере взросления ребёнка. Наблюдаемое явление свидетельствует о нормальном постэмбриональном развитии тимуса. Недоразвитие тимуса у детей может проявляться снижением клеточного иммунитета и характеризуется отсутствием тимозинов в слюне и иммуноглобулинов в плазме крови

6. ИССЛЕДОВАНИЕ В СЛЮНЕ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ И ПАРАЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗ

В щитовидной железе синтезируется два йодсодержащих гормона – **тетрайодтиронин** (T_4) (тироксин) и **трийодтиронин** (T_3). В слюне количество T_3 и T_4 невелико. При гипопункции щитовидной железы эти гормоны в слюне не выявляются. При опухолях щитовидной железы в слюне возрастает концентрация тиреоглобулина.

Кальцитонин первично синтезируется в парафолликулярных С-клетках щитовидной железы. Данный гормон способствует уменьшению уровня кальция в крови, а в слюне увеличению уровня фосфатов. Кальцитонин также играет важную роль в развитии боли и служит биологическим маркером активации тригемино-вазкулярной системы тройничного нерва. Считается, что кальцитонин участвует в регуляции слюноотделения. Пик концентрации этого гормона в слюне наблюдается через 10 минут после приёма пищи, а через час возвращается к исходному уровню. В эксперименте было показано, что кальцитонин оказывает стимулирующий эффект на секрецию α -амилазы слюнными железами.

7. ИССЛЕДОВАНИЕ В СЛЮНЕ ГОРМОНОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Инсулин образуется в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Он оказывает многогранное влияние на обменные процессы практически во всех тканях организма. Различают две формы инсулина: 1) свободную, вступающую во взаимодействие с антителами, полученными к кристаллическому инсулину, и стимулирующую усвоение глюкозы мышечной и жировой тканями; 2) связанную, не реагирующую с антителами и активную только в отношении жировой ткани.

Уровень инсулина определяют в целях уточнения типа сахарного диабета, а также для диагностики тканевой инсулино-резистентности. Исследование концентрации инсулина и глюкозы в крови и слюне до и после сахарной нагрузки показало, что количество инсулина в слюне

здоровых лиц исходно было в пределах 2,5-2,7 мкЕд/мл, а после нагрузки возрастало до 13-14,5 мкЕд/мл. В то же время уровень инсулина в слюне у глюкозотолерантных пациентов до нагрузки был ниже (1,24-1,30 мкЕд/мл), но после нагрузки возрастал до 44-45 мкЕд/мл.

Другие исследователи установили более высокие значения уровня инсулина в слюне. Так, у здоровых лиц уровень инсулина в слюне достигал $6,48 \pm 1,13$ мкЕд/мл, а после пероральной нагрузки глюкозой повышался до $45,5 \pm 10,1$ мкЕд/мл. У пациенток с толерантностью к глюкозе уровень инсулина в слюне был меньше ($5,18 \pm 1,39$ мкЕд/мл), а через 3 часа после нагрузки глюкозой его значения увеличивались до $83,3 \pm 25,9$ мкЕд/мл. То есть, несмотря на различные уровни инсулина в слюне, сохраняются определённые закономерности в поступлении данного гормона в ответ на нагрузку сахарозой и данные определения можно использовать в диагностических целях.

Также показано, что более высокий уровень инсулина в слюне определяется у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта.

Возможно, что разные показатели уровня инсулина в слюне определяются в зависимости от используемого метода, а также присутствующей формы инсулина. Так, при исследовании уровня инсулина в крови и слюне пациентов с сахарным диабетом 1 типа было выявлено, что в сыворотке крови процент связанного инсулина достигал $58,8 \pm 5,2\%$, а в слюне $45,0 \pm 3,5\%$, что определило соотношение 1:1,6.

Таким образом, установлено присутствие инсулина в смешанной слюне, и он может находиться как в связанной, так и в свободной форме.

8. ИССЛЕДОВАНИЕ В СЛЮНЕ УРОВНЯ ГОРМОНОВ, ОКАЗЫВАЮЩИХ ВЛИЯНИЕ НА ФИЗИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ

Анализ количества гормонов в слюне используется в спортивной медицине и при проведении допингового контроля.

Для наращивания мышечной массы и снижения болевой чувствительности атлеты нередко принимают анаболические гормоны – андрогены, которые нередко рассматривают в качестве допинговых средств.

Удобно оценивать у спортсменов уровень гормонов в слюне, так как её можно собирать в перерывах между соревнованиями и во время интенсивного физического напряжения. Так, во время игровой практики у футболистов, регбистов и дзюдоистов в слюне определяли уровень андрогенов и глюкокортикоидов. Поскольку эти два гормона определяются в слюне, то намного удобнее собирать образцы в присутствии свидетелей, не нарушая частной жизни атлета, тогда как для сбора мочи требуется изолированное помещение.

Не менее важным является определение в слюне спортсменов гормонов пептидной природы соматотропина и эритропоэтина. Употребление соматотропина спортсменами направлено на увеличение роста мышечной массы, а эритропоэтин способствует увеличению числа эритроцитов, что позволяет спортсмену получать большее количество кислорода. Количество этих двух пептидов в слюне очень невелико по отношению к их уровню в плазме.

Имеется несколько опубликованных отчётов по выявлению соматотропина в слюне. В человеческой слюне было обнаружено незначительное количество соматотропина. В эксперименте было показано, что соматотропный гормон экскретируется в слюну после парасимпатической стимуляции слюнных желёз у крыс. Также в экспериментах на трансгенных мышях установлено, что пик секреции этого гормона в слюну проявляется в период половой

зрелости. С другой стороны, слюна содержит инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), и его уровень отражает действие соматотропного гормона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Определение гормонов в слюне имеет важное значение при изучении патологических и физиологических состояний и возможно получение сопоставимых показателей по отношению к плазме крови.

Преимуществом проведения гормонального анализа в слюне заключается в безболезненном сборе образцов, что очень важно для людей, боящихся венопункции, особенно это касается пациентов, страдающих гемофилией. Реакция в ответ на венопункцию может повлиять на уровень глюкокортикоидов, что следует учитывать при диагностике болезни Иценко-Кушинга. Ежедневный сбор слюны для определения фазы менструального цикла, циркадного ритма, фармакокинетики лекарственных средств возможен в домашних условиях даже у плохо обучаемых людей, а также во время спортивных соревнований.

Однако имеется целый ряд факторов, ограничивающих повсеместное использование слюны в различных сферах здравоохранения. В большинстве своём это связано с нежеланием врачей-клиницистов переходить на новые методы исследований в силу отсутствия справочных референсных значений уровня гормонов в слюне с указанием типа стимуляции слюны, пола, возраста, времени суток и используемой тест-системы. Мало опубликованных разработок фирм-производителей тест-систем для определения в слюне кортизола, тестостерона и мелатонина.

Нужно приложить еще немало усилий для признания важности проводимых исследований слюны в клинических условиях. В первую очередь, это относится к созданию единого протокола сбора слюны, времени испытаний и аналитических исследований, а также внедрения и доступности информации о полученных результатах.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Vining R.F., McGinley R.A.* (1986) Hormones in saliva. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., **23**, 95-146.
2. *Вавилова Т.П.* (2011) Биохимия тканей и жидкостей полости рта: учебное пособие. 2-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа.
3. *Higashi T.* (2012) Salivary hormone measurement using LC/MS/MS: specific and patient-friendly tool for assessment of endocrine function. Biol. Pharm. Bull., **35**, 1401-1408
4. *Zolotukhin S.* (2013) Metabolic hormones in saliva: origins and functions. Oral Dis., **19**(3), 219-229.
5. *Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г.* (2014) Слюна. Аналитические возможности и перспективы. — М.: БИНОМ.
6. *Вавилова Т.П., Медведев А.Е.* (2014) Биологическая химия. Биохимия полости рта. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.

Поступила: 19. 03. 2013.

LECTURE: PROSPECTS OF HORMONE ANALYSES IN SALIVA

T.P. Vavilova¹, I.G. Ostrovskaya¹, A.E. Medvedev^{1,2}

¹Evdokimov Moscow State Medical and Dental University, Moscow, Russia;
e-mail: tpvavilova@rambler.ru

²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Science,
Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119121, Russia

Key words: saliva, hormones, pathology.