

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В.

### БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ СТАРЕНИИ

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 620028, г. Екатеринбург, Россия

Старение организма протекает неравномерно, затрагивая различные органы и системы, включая ткани полости рта. Органоспецифическим компонентом полости рта является ротовая жидкость (РЖ), изменение состава которой может отражать процессы стоматологического старения. Цель работы – оценить возрастные изменения биохимических параметров РЖ практически здоровых людей и выявить потенциальные слюварные биомаркеры старения. Проведено исследование 92 практически здоровых лиц четырёх возрастных групп: детского возраста от 7 до 12 лет ( $n=24$ ), молодого - от 18 до 44 лет ( $n=28$ ), зрелого - от 45 до 59 лет ( $n=20$ ), пожилого - от 60 до 74 лет ( $n=20$ ). Для оценки физико-химических параметров РЖ применяли диагностические тест-полоски Multistix 10 SG (Siemens, США), отражательный фотометр Clinitek Status+ (Siemens, США), химический анализатор Mindray BC-240pro (Mindray, КНР). В работе проводилось определение 16-ти биохимических параметров РЖ и 4-х, рассчитанных на их основе, индексов. Поскольку РЖ является нестандартизованной биожидкостью, непосредственно определяемые параметры пересчитывали путём деления на концентрацию общего белка пробы. Установлено, что исследованные группы пациентов различались по следующим, непосредственно определяемым параметрам: общий белок, альбумин, щелочная фосфатаза, неорганический фосфор, общий антиоксидантный статус, мочевая кислота, холестерин, лактатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа-1, креатинин, мочевина, магний. После стандартизации результатов по концентрации общего белка установлены различия по следующим показателям: холестерин,  $\alpha$ -амилаза общая, С-реактивный белок, креатинин, магний. Оценивались корреляционные связи между стандартизованными параметрами и хронологическим возрастом. Установлено, что с хронологическим возрастом пациентов положительно коррелировал общий белок, альбумин, холестерин, фосфорно-кальциевое соотношение, отрицательно -  $\alpha$ -амилаза общая, С-реактивный белок. Возрастные изменения большинства исследованных параметров могут объясняться возрастным морфофункциональным преобразованием тканей полости рта. Некоторые показатели, в частности, креатинин, могут изменяться под влиянием системных факторов.

**Ключевые слова:** старение; биомаркеры старения; ротовая жидкость; здоровье полости рта

**Для цитирования:** Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В. Биохимические особенности ротовой жидкости при старении.

Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (3): 108-115. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-3-108-115>

**Для корреспонденции:** Копенкин Максим Александрович, аспирант; e-mail: maximkopenkin@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена за счёт средств государственного задания на научно-исследовательскую работу «Генетические и эпигенетические основы прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека». Регистрационный номер 122120100026-3.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.11.2023

Принята к печати 30.12.2023

Опубликовано 01.03.2024

Kopenkin M.A., Polushina L.G., Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarnyi V.V.

### CHANGE FEATURES OF SALIVA BIOCHEMICAL PARAMETERS DURING AGING

Ural State Medical University, 620109, Yekaterinburg, Russia

The aging of organism proceeds unevenly and affects various organs and systems, including oral cavity. Mixed saliva is a useful component that can reflect the aging processes of the oral cavity. The aim of the study was to evaluate age-related changes in the mixed saliva biochemical markers of healthy people and to identify potential aging biomarkers. The study included 92 healthy people of four age groups: children from 7 to 12 years old ( $n=24$ ), young people from 18 to 44 ( $n=28$ ), mature from 45 to 59 ( $n=20$ ), elderly from 60 to 74 ( $n=20$ ). Reagent strips Multistix 10SG (Siemens, USA), analyzer Clinitek Status+ (Siemens, USA), chemistry analyzer Mindray BC-240pro (Mindray, China) were used to evaluate mixed saliva physico-chemical markers. In total, 16 biochemical markers and 4 calculated indices were determined in the study. Saliva results were expressed without any correction, and corrected by total protein concentration. It was found that studied groups differed in the following markers without correction: total protein, albumin, alkaline phosphatase, inorganic phosphorus, total antioxidant capacity, uric acid, cholesterol, lactated dehydrogenase, lactate dehydrogenase-1, creatinine, urea, magnesium. After correction by total protein concentration, differences were found in the following indicators: cholesterol, total  $\alpha$ -amylase, c-reactive protein, creatinine, magnesium. Correlations between corrected markers and chronological

age were evaluated. It was found that total protein, albumin, cholesterol, phosphorus-calcium ratio, creatinine positively correlated with chronological age, and total  $\alpha$ -amylase, c-reactive protein – negatively. The change of mixed saliva composition with age can be explained by age-related oral tissues morphofunctional transformation. We combine creatinine age dynamics with system processes.

**Key words:** aging; aging biomarkers; saliva; oral health

**For citation:** Kopenkin M.A., Polushina L.G., Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarnyi V.V. Change features of saliva biochemical parameters during aging. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (3): 108-115 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-3-108-115>

**For correspondence:** Kopenkin M.A., postgraduate student; e-mail: [maximkopenkin@yandex.ru](mailto:maximkopenkin@yandex.ru)

Information about authors:

Kopenkin M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6092-3734>;

Polushina L.G., <https://orcid.org/0000-0002-4921-7222>;

Sementsova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-0296-8723>;

Mandra Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-8439-3272>;

Bazarnyi V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>.

**Acknowledgment.** The work were carries out at the expense of the state task for the research work «Genetic and epigenetic foundations for predicting human ontogenesis and aging disorders». Registration number is 122120100026-3.

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

Received 10.11.2023

Accepted 30.12.2023

Published 01.03.2024

**Введение.** Одним из направлений геронтологии является изучение биомаркеров старения (БС). Это параметры, по которым в отсутствие патологии можно предсказать функциональное состояние организма лучше, чем по хронологическому возрасту. Выделяют ряд критериев, которым должен соответствовать БС, в частности изменяться независимо с течением времени и отражать физиологический возраст [1]. При этом старение является процессом, протекающим неравномерно не только на межиндивидуальном уровне, но и на индивидуальном: возрастное ремоделирование органов и систем протекает с различной скоростью [2]. Указанные возрастные изменения характеризуются кумулятивными свойствами и могут привести к развитию возраст-ассоциированных заболеваний. Для объективной оценки функционального состояния организма требуется выработка широкого набора БС, отражающих многообразие индивидуальных возрастных преобразований.

Старение сопровождается возрастной морфофункциональной перестройкой большинства органов и систем. В тканях сердечно-сосудистой системы уменьшается содержание эластических волокон с замещением их коллагеном, кальцификацией [3]. Почки претерпевают структурные изменения с возрастом, в результате чего функциональная активность, выражаемая скоростью клубочковой фильтрации, постепенно снижается, начиная с 40 лет [4]. Возрастные метаморфозы затрагивают ткани и органы полости рта. Для твёрдых тканей зуба характерно истончение эмали, появление сколов и трещин с обнажением дентина, его повышенной стираемостью [5]. При старении пародонта наблюдается некоторая рецессия дёсен, истончение пародонтальной связки, сокращение зубного ряда [6, 7]. В слизистой оболочке полости рта (СОПР) наблюдается снижение числа эластических волокон, истощение микроциркуляторного русла, что проявляется нарушением процессов заживления ран [8]. С возрастом развивается гипопункция слюнных желез, обусловленная увеличением доли жировой и соединительной ткани, ослаблением

рефлекторной стимуляции [9]. Проблематика стоматологического старения приобретает особую значимость, поскольку сохранность физиологических функций полости рта в значительной степени определяет качество жизни в пожилом и старческом возрасте.

Постепенное развитие с возрастом дегенеративных изменений тканей, образующих полость рта, является признаком физиологического старения. Ускоренное нарастание данных преобразований способствует раннему возникновению возраст-ассоциированных стоматологических заболеваний. Распространённость патологии пародонта увеличивается с возрастом, риск возникновения такого заболевания, как красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта значительно увеличивается после достижения 40 лет [6, 10]. Одним из факторов ускоренного стоматологического старения считают снижение количества и изменение физико-химических свойств выделяемой слюны, которая выполняет антибактериальную, пищеварительную, минерализующую, регуляторную и увлажняющую функции [9]. Попадая в полость рта, секреты больших и малых слюнных желез смешиваются между собой, с десневой жидкостью, с компонентами слизистой оболочки полости рта, образуя ротовую жидкость (РЖ), изменение состава которой может отражать процессы старения тканей полости рта. Известно, что вязкость РЖ увеличивается с возрастом, однако данные об изменениях в химическом составе остаются предметом обсуждений. Содержание общего белка РЖ по некоторым данным может как снижаться, так и увеличиваться с возрастом [9, 11]. Одной из особенностей образования РЖ является высокая проницаемость гематосаливарного и гистогематического барьера СОПР. В небольших концентрациях в РЖ содержатся вещества, определяемые в периферической крови, что даёт возможность рассматривать её как инструмент неинвазивного мониторинга старения [12, 13.]. Изменение состава РЖ может отражать течение фундаментальных механизмов старения: нарушения протеостаза, клеточного старения,

митохондриальной дисфункции [7]. Саливарные БС представляют интерес в лабораторном мониторинге процессов физиологического или ускоренного старения и необходимы для выбора тактики стоматологической помощи пациентам старших возрастных групп.

Цель исследования - оценка возрастных изменений биохимических параметров РЖ практически здоровых людей и выявление потенциальных саливарных БС.

**Материал и методы.** Проведено одномоментное одноцентровое нерандомизированное исследование, в котором приняли участие 92 практически здоровых лица. Отбор участников исследования проводился в соответствии со следующей возрастной периодизацией: детский возраст - от 7 до 12 лет, молодой - от 18 до 44 лет, зрелый - от 45 до 59 лет, пожилой - от 60 до 74 лет. Сформировано четыре группы. В 1-ю группу вошли 24 практически здоровых лица детского возраста (медиана - 10 лет;  $Q_1$  - 10 лет,  $Q_3$  - 10 лет). 2-я группа представлена 28 лицами молодого возраста (20 лет;  $Q_1$  - 20,  $Q_3$  - 20). 3-ю группу составили 20 лиц зрелого возраста (55 лет;  $Q_1$  - 51,  $Q_3$  - 56). В 4-ю группу вошли 20 лиц пожилого возраста (61 год,  $Q_1$  - 60,  $Q_3$  - 64,5).

Всем участникам исследования проведено обследование на базе стоматологической клиники Уральского государственного медицинского университета. Оценивались следующие стоматологические индексы: индекс интенсивности кариеса зубов (КПУ), папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА), упрощённый индекс гигиены (УИГ). В группе детского возраста выполнялся индекс КПУ+кп, учитывающий особенности сменного прикуса и являющийся сопоставимым аналогом индекса КПУ для данного возрастного периода. Оценка соматического статуса проводилась путём анкетирования. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (Helsinki, 2000). От

всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Дизайн исследования, его новизна, допустимость и приемлемость одобрены на заседании локального этического комитета ФГБУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, протокол № 8 от 21.10.2022 года. Критерии включения пациентов: соответствие требованиям возрастной периодизации, клиническое подтверждение стоматологического статуса, отсутствие тяжёлой соматической патологии в стадии суб- и декомпенсации. Критерии исключения пациентов: травмы лицевого скелета, сахарный диабет 1, 2-го типа, отказ от участия в исследовании.

В исследовании проведён лабораторный анализ нестимулированной РЖ, полученной путём пассивного истечения в микропробирку. Биоматериал центрифугировали (3000g, 10 минут), супернатант переливали в отдельную микропробирку, замораживали и хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения исследования. Для оценки физико-химических параметров РЖ применяли диагностические тест-полоски Multistix 10 SG (Siemens, США) и отражательный фотометр Clinitek Status+ (Siemens, США). Использовали химический анализатор Mindray BC-240pro (Mindray, КНР) для определения ряда биохимических параметров (табл. 1). Используемые реагенты (Mindray, КНР; Вектор-Бест, Россия), предназначенные для работы с сывороткой или плазмой крови, могут иметь неоптимальные характеристики при исследовании РЖ. Хотя pH в группах варьировался в пределах от 7,00 до 7,50 ед., в некоторых пробах выявлялись более высокие значения, что могло отразиться на отдельных результатах. В работе представлены непосредственно определяемые величины, и значения, полученные путём деления исходных данных на концентрацию ОБ пробы для стандартизации результатов исследования.

Таблица 1

Перечень биохимических показателей

Показатель	Сокращение	Метод определения
Общий белок, г/л	ОБ	По биуретовой реакции
Альбумин, г/л	Альбумин	По реакции с бромкрезоловым зелёным
$\alpha$ -амилаза общая, ЕД/л	$\alpha$ -амл	IFCC
C-реактивный белок, мг/л	СРБ	Турбидиметрический
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	ЩФ	IFCC модифицированный
Общий кальций, ммоль/л	Кальций	По реакции с арсеназо III
Неорганический фосфор, ммоль/л	Фосфор	По реакции с образованием фосфолибдата
Магний, ммоль/л	Магний	По реакции с ксиллиловым синим
Общий антиоксидантный статус, ммоль/л	ОАС	По реакции с ABTS
Мочевая кислота, мкмоль/л	МК	По реакции с уриказой/пероксидазой
Холестерин, ммоль/л	ХС	Ферментативный (chod-PoD)
Лактатдегидрогеназа общая, ЕД/л	ЛДГ	IFCC
Лактатдегидрогеназа-1, ЕД/л	ЛДГ-1	Кинетический метод (DGKC)
Креатинкиназа-МВ, ЕД/л	КК-МВ	IFCC
Мочевина, ммоль/л	Мочевина	Кинетический уреазный/ глутаматдегидрогеназный
Креатинин, мкмоль/л	Креатинин	По реакции Яффе

Статистическую обработку результатов проводили с использованием языка программирования Python (3.9.12) и открытых библиотек SciPy (1.7.3), scikit-posthocs (0.7.0), statsmodels (0.14.0). Критический уро-

вень значимости установлен на уровне  $p < 0,05$ . Распределение данных оценивали с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Результаты представлены как медиана, 25-й - 75-й квартиль - Me ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Для сравнения групп

по номинальным данным использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона. Оценка различий по непрерывным и порядковым данным между тремя и более группами приводилась с помощью критерия Краскела-Уоллиса, при наличии значимых различий применяли тест Данна с поправкой Холма-Бонферрони. Для проверки наличия корреляционных связей использовали критерий Спирмена. Проверку линейности взаимосвязи оценивали с помощью простого линейного регрессионного анализа, перед проведением которого непрерывные данные преобразовывались путём вычисления логарифма по

основанию 2.

**Результаты.** В исследовании оценивались физико-химические и биохимические параметры РЖ практически здоровых лиц детского, молодого, зрелого и пожилого возраста. Данные о структуре соматической патологии в исследуемых группах представлены в табл. 2. Установлено, что участники исследования характеризовались полиморбидностью (сочетанием 2-3-х соматических заболеваний). Все участники исследования на момент обследования были в состоянии компенсации, вне стадии обострения соматических болезней.

Таблица 2

Структура соматической патологии обследованных групп, абс. (%)

Патология	Детский возраст (n=24)	Молодой возраст (n=28)	Зрелый возраст (n=20)	Пожилой возраст (n=20)	p
Болезни системы кровообращения, n=24	4 (16,67)	4 (14,28)	12 (60,00)	4 (20,00)	0,052
Болезни ЖКТ, n=20	6 (25,00)	2 (7,14)	8 (40,00)	4 (20,00)	0,283
Болезни органов дыхания, n=32	10 (41,67)	2 (7,14)	8 (40,00)	12 (60,00)	0,048
Болезни костей и суставов, n=20	10 (41,67)	0 (0,00)	8 (40,00)	2 (10,00)	0,006
Болезни мочеполовой системы, n=2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (10,00)	0,298
Болезни эндокринной системы и нарушения обмена веществ, n=16	2 (8,33)	6 (21,43)	4 (20,00)	4 (20,00)	0,816

Примечание. Здесь и в табл. 3 - 5: n – число обследованных.

Поскольку РЖ является органоспецифической составляющей ротовой полости, её состав может существенно изменяться при стоматологических заболеваниях, в том числе ассоциированных с возрастом [14, 15]. Это определило необходимость объективной характеристики стоматологического статуса, для чего выполнены индексы КПУ (КПУ+кп в детском возрасте), РМА, УИГ (табл. 3).

Установлено, что значение индекса КПУ в зрелом и пожилом возрасте выше по сравнению с детским и молодым. Лица молодого возраста в сравнении с группами зрелого и пожилого характеризовались меньшими значениями индекса РМА. Участники пожилого возраста отличались от лиц детского и молодого значением индекса УИГ, что свидетельствует о худшем гигиеническом состоянии полости рта в данной группе.

Таблица 3

Стоматологическая характеристика обследованных групп

Индекс	Детский возраст (n=24)	Молодой возраст (n=28)	Зрелый возраст (n=20)	Пожилой возраст (n=20)	p
КПУ	2,00 (1,80-2,25)	7,50 (3,50-9,75)	17,00 (14,00-21,00)*	21,00 (21,00-21,75)*	<0,001
РМА	31,00 (21,50-38,50)	15,00 (14,00-17,75)	36,00 (29,00-41,00)*	37,50 (31,00-39,00)*	<0,001
УИГ	0,90 (0,72-1,20)	1,60 (1,35-1,70)	1,90 (1,20-1,90)	1,90 (1,90-1,97)*	0,004

Примечание. \* - p<0,05 по сравнению с группой молодого возраста.

Оценивались возрастные изменения ряда биохимических параметров РЖ. Кроме непосредственно определяемых показателей (см. табл. 1), проводили расчёт следующих индексов: % альбумина от общего белка, отношение фосфора к кальцию (соотношение фосфор-кальций), отношение МК к ОАС (соотношение МК-ОАС), отношение ЛДГ-1 к ЛДГ (соотношение ЛДГ-1-ЛДГ). Некоторые показатели, такие как уровень креатинина и мочевины, активность ферментов ЛДГ-1 и КК-МВ, признаны маркерами патологии по-

чек и сердца, однако, некоторые авторы связывают их с возрастным ремоделированием указанных органов [16, 17]. Особенности образования РЖ, возможность неинвазивного получения материала с многократным повторным тестированием обуславливает определённый интерес к РЖ как ценному материалу в оценке возрастных преобразований отдельных органов и систем. Результаты определения физико-химических, биохимических показателей и расчётных индексов представлены в табл. 4.



Таблица 4

Результаты определения биохимических тестов в РЖ

Показатель	Детский возраст (n=24)	Молодой возраст (n=28)	Зрелый возраст (n=20)	Пожилой возраст (n=20)	p
pH, усл.ед	7,25 (6,75-8,00)	7,00 (7,00-7,50)	7,00 (6,50-7,50)	7,50 (7,15-8,00)	0,510
Отн. плотность, отн.ед	1,005 (1,003-1,006)	1,010 (1,010-1,020)*	1,010 (1,005-1,010)	1,010 (1,010-1,010)	0,004
ОБ, г/л	0,85 (0,60-1,02)	1,30 (0,92-1,40)	1,20 (1,00-1,60)	1,60 (1,22-2,15)*	0,007
Альбумин, г/л	0,10 (0,10-0,20)	0,30 (0,30-0,40)*	0,40 (0,30-0,40)*	0,40 (0,40-0,77)*	<0,001
Альбумин, %	17,42 (10,12-33,33)	29,71 (25,89-33,33)	32,52 (23,53-40,00)	30,43 (23,90-35,97)	0,183
α-амл, ЕД/л	32342,40 (27835,82-34969,97)	39241,20 (31522,25-46145,40)	31895,30 (27750,00-38459,90)	38590,45 (34024,22-47844,17)	0,225
СРБ, мг/л	1,78 (1,72-1,86)	1,75 (1,66-1,90)	1,63 (1,46-2,04)	2,26 (1,93-2,83)	0,143
ЩФ, ЕД/л	0,80 (0,40-1,52)	2,00 (1,27-4,20)	3,45 (1,90-4,40)	2,60 (1,45-8,45)*	0,027
Кальций, ммоль/л	0,18 (0,13-0,32)	0,34 (0,28-0,47)	0,27 (0,21-0,48)	0,28 (0,24-0,36)	0,088
Фосфор, ммоль/л	2,41 (1,89-2,69)	5,30 (4,15-7,11)*	4,93 (3,45-6,33)*	7,09 (5,92-7,98)*	<0,001
Соотношение фосфор-кальций	12,23 (7,79-18,22)	15,41 (11,34-18,80)	18,96 (15,01-20,29)	21,18 (15,62-29,85)	0,065
Магний, ммоль/л	0,03 (0,02-0,06)	0,15 (0,08-0,18)*	0,09 (0,05-0,15)	0,09 (0,06-0,14)	0,006
ОАС, ммоль/л	0,36 (0,33-0,45)	0,68 (0,59-0,80)*	0,69 (0,55-0,89)*	0,75 (0,60-0,83)*	<0,001
МК, мкмоль/л	82,90 (68,17-111,35)	175,25 (122,05-211,07)*	187,10 (122,00-256,80)*	164,35 (125,35-211,35)*	0,001
Соотношение МК-ОАС	232,16 (170,65-270,50)	228,23 (195,70-302,70)	265,22 (226,54-288,54)	233,15 (183,38-263,45)	0,727
ХС, ммоль/л	0,00 (0,00-0,002)	0,005 (0,00-0,01)	0,01 (0,01-0,01)*	0,01 (0,01-0,05)*	0,002
ЛДГ, ЕД/л	8,15 (3,10-31,20)	63,20 (10,55-101,42)	35,70 (21,10-77,80)	30,60 (3,67-97,97)	0,046
ЛДГ-1, ЕД/л	3,05 (1,80-21,60)	35,30 (8,95-64,25)*	21,50 (9,50-50,90)	23,40 (3,77-69,57)	0,017
Соотношение ЛДГ-1-ЛДГ	0,61 (0,52-0,79)	0,60 (0,56-0,68)	0,49 (0,44-0,65)	0,75 (0,69-0,86)	0,143
КК-МВ, ЕД/л	3,60 (1,67-6,60)	7,80 (5,35-15,05)	7,90 (4,05-11,40)	8,70 (5,37-15,87)	0,074
Мочевина, ммоль/л	2,58 (2,16-3,62)	5,87 (4,77-6,74)*	6,70 (4,23-7,74)*	8,69 (6,58-10,26)*	<0,001
Креатинин, мкмоль/л	0,00 (0,00-0,85)	0,90 (0,00-2,55)	3,70 (2,00-6,10)	14,70 (8,52-19,77)*/**	0,001

Примечание. Здесь и в табл. 5: \* - p<0,05 по сравнению с группой детского возраста; \*\* - p<0,05 по сравнению с группой молодого возраста.

Таблица 5

Стандартизованные результаты определения биохимических тестов в РЖ

Показатель	Детский возраст (n=24)	Молодой возраст (n=28)	Зрелый возраст (n=20)	Пожилой возраст (n=20)	p
α-амилаза	41441,73 (34745,90-47897,58)	33531,57 (22957,08-37961,44)	24183,70 (22508,67-26579,42)*	23404,09 (16507,55-30374,04)*	0,002
СРБ	2,21 (1,54-2,95)	1,54 (1,20-2,19)	1,02 (0,95-1,66)*	1,42 (0,99-1,89)	0,032
ЩФ	0,89 (0,58-2,14)	2,00 (1,44-2,75)	3,17 (0,82-3,64)	1,51 (0,98-2,88)	0,285
Кальций	0,27 (0,20-0,46)	0,33 (0,20-0,39)	0,23 (0,21-0,31)	0,19 (0,13-0,31)	0,257
Фосфор	2,86 (2,38-3,89)	4,93 (3,43-5,91)	4,01 (3,14-6,33)	4,97 (3,05-5,50)	0,120
Магний	0,05 (0,04-0,07)	0,13 (0,07-0,16)	0,08 (0,04-0,09)	0,04 (0,03-0,10)**	0,031
ОАС	0,46 (0,36-0,65)	0,59 (0,49-0,73)	0,55 (0,47-0,60)	0,45 (0,37-0,48)	0,222
МК	101,52 (71,98-152,96)	134,30 (103,65-199,53)	151,06 (107,09-203,33)	97,24 (62,23-123,97)	0,272
ХС	0,00 (0,00-0,002)	0,003 (0,00-0,007)	0,008 (0,006-0,01)*	0,007 (0,006-0,01)*	0,016
ЛДГ	14,95 (6,75-26,61)	53,13 (12,27-89,60)	30,83 (12,59-70,73)	26,20 (3,06-39,77)	0,155
ЛДГ-1	9,30 (2,83-19,14)	30,73 (9,99-53,17)	21,50 (7,77-46,27)	19,95 (3,24-25,80)	0,090
КК-МВ	4,29 (2,51-8,25)	8,19 (4,99-11,80)	5,53 (1,50-11,40)	4,99 (3,12-10,96)	0,525
Мочевина	3,53 (2,69-4,82)	4,77 (3,98-5,67)	5,45 (3,25-6,37)	5,55 (3,04-6,81)	0,425
Креатинин	0,00 (0,00-0,61)	0,86 (0,00-1,86)	3,01 (0,64-6,10)	7,46 (2,91-9,32)*/**	0,005

Известно, что РЖ является нестандартизованной биожидкостью, результат лабораторного исследования которой может зависеть от степени разведения, вязкости, имеющей тенденцию к увеличению в старших возрастных группах [9]. Поскольку вязкость РЖ зависит от количества растворенных веществ, преимущественно полипептидов, представляется обоснованным способ стандартизации результатов путём

деления на концентрацию ОБ данной пробы [11, 18, 19]. Результаты, стандартизованные по концентрации ОБ, указаны в табл. 5.

Установлено, что значения pH не различались между исследованными группами. В группе детей РЖ отличалась более низкими значениями относительной плотности по сравнению с группой молодого возраста, что может объясняться меньшей концентрацией

растворённых веществ. Исследованные группы различались по следующим непосредственно определяемым параметрам: ОБ, альбумин, ЩФ, фосфор, магний, ОАС, МК, ХС, ЛДГ, ЛДГ-1, мочевина, креатинин. После стандартизации результатов по концентрации ОБ установлены различия по следующим показателям:

$\alpha$ -амилаза, СРБ, магний, ХС, креатинин.

Для достижения цели исследования оценивалась связь между изменением исследованных параметров РЖ, стандартизованных по ОБ, и хронологическим возрастом, для чего был применён метод ранговой корреляции Спирмена и простой линейной регрессии (табл. 6).

Таблица 6

Связь стандартизованных показателей РЖ с хронологическим возрастом

Показатель	Корреляция Спирмена		Простая линейная регрессия*			
	rho	p	R <sup>2</sup>	$\beta$	95% ДИ	p
ОБ	0,510	<0,001	0,217	0,551	0,245; 0,857	0,001
Альбумин	0,743	<0,001	0,364	0,477	0,289; 0,665	<0,001
% альбумина от ОБ	0,316	0,034	0,088	0,297	0,036; 0,558	0,027
$\alpha$ -амилаза	-0,571	<0,001	0,285	-0,889	-1,305; -0,473	<0,001
СРБ	-0,369	0,013	0,145	-0,415	-0,702; -0,128	0,006
ЩФ	0,243	0,107	0,031	0,160	-0,049; 0,368	0,129
Кальций	-0,224	0,139	0,060	-0,314	-0,639; 0,011	0,058
Фосфор	0,201	0,185	-0,018	0,099	-0,309; 0,506	0,628
Соотношение фосфор-кальций	0,378	0,010	0,139	0,504	0,147; 0,862	0,007
Магний	-0,163	0,284	-0,023	0,015	-0,247; 0,278	0,906
ОАС	-0,094	0,537	0,004	-0,252	-0,719; 0,214	0,281
МК	-0,057	0,709	-0,021	-0,043	-0,357; 0,271	0,784
Соотношение МК-ОАС	0,014	0,927	-0,010	0,194	-0,331; 0,720	0,460
ХС	0,480	<0,001	0,203	-0,147	-0,232; -0,062	0,001
ЛДГ	0,158	0,298	-0,017	0,037	-0,110; 0,185	0,612
ЛДГ-1	0,190	0,211	0,000	0,090	-0,093; 0,273	0,328
Соотношение ЛДГ-1-ЛДГ	0,056	0,713	-0,011	0,137	-0,249; 0,523	0,477
КК-МВ	0,117	0,443	-0,023	0,017	-0,223; 0,256	0,889
Мочевина	0,212	0,161	-0,016	0,127	-0,322; 0,576	0,572
Креатинин	0,507	<0,001	0,280	0,138	0,073; 0,203	<0,001

Примечание. \* - Переменные были логарифмированы (Log<sub>e</sub>).

Положительно коррелировали с увеличением возраста ОБ, альбумин, % альбумина, соотношение фосфор-кальций, ХС, креатинин, отрицательно -  $\alpha$ -амилаза и СРБ. Увеличение хронологического возраста объяснялось изменением ряда биохимических параметров РЖ (коэффициент детерминации R<sup>2</sup>): альбумина на 36,4%,  $\alpha$ -амилаза на 28,5%, креатинина на 28,0%, ОБ на 21,7%, ХС на 20,3%, СРБ на 14,5%, фосфорно-кальциевого соотношения на 13,9%, % альбумина на 8,8%.

**Обсуждение.** В проведённом исследовании установлено, что содержание ОБ возрастало с увеличением хронологического возраста. Белковые соединения секретируются в ротовую полость слюнными железами, в меньшей степени - СОПР. Концентрация ОБ может увеличиваться при попадании примеси крови и нарушении преаналитических процедур. Состав РЖ может существенно изменяться из-за особенностей функционирования гематосаливарного и гистогематического барьера полости рта: селективность барьеров может существенно изменяться не только при стоматологических заболеваниях, но и под действием системных патологических процессов [12]. Наибольшую связь с хронологическим возрастом имело увеличение содержания альбумина, который является основным белком плазмы крови. Содержание альбумина в РЖ принято считать одним из маркеров наличия примеси

крови в РЖ, более точным, чем метод с использованием диагностических тест полосок, но уступающий способам, предполагающим определение гемоглобина или трансферрина [20]. Коррелировала с хронологическим возрастом стандартизованная по ОБ активность  $\alpha$ -амилазы. Известно, что в РЖ содержится более двух тысяч белковых соединений, среди которых  $\alpha$ -амл занимает около 60% от общего объёма [21]. Кроме участия в пищеварении  $\alpha$ -амл может выполнять антимикробную функцию, что подтверждается значительным увеличением её содержания при гингивите и хроническом пародонтите [22]. В проведённом исследовании стандартизованная активность  $\alpha$ -амилазы снижалась с возрастом, направленность связи была отрицательной, что может быть связано с возрастной дисфункцией слюнных желез.

Содержание ХС в РЖ было относительно небольшим во всех исследованных группах, несколько увеличиваясь с возрастом. Известно, что ХС входит в состав белково-липидных комплексов на поверхности эмали, защищая её от деминерализации [23]. При кариесе и заболеваниях пародонта наблюдаются более высокие уровни липидов РЖ, что может быть связано с лучшей адгезией микроорганизмов к указанным комплексам с последующим образованием биоплёнок [24]. Сообщалось о корреляции уровней ХС в РЖ и в перифериче-

ской крови, связи ХС РЖ с индексом массы тела [23]. Поэтому возрастные изменения слюварного ХС могут быть связаны как со стоматологическим старением, так и системными процессами.

Стандартизованный уровень СРБ снижался с увеличением хронологического возраста. Это противоречит существующим представлениям о хроническом воспалении как одном из ведущих механизмов старения [16]. В ряде публикаций отмечено повышение уровня СРБ в РЖ при стоматологических заболеваниях, ассоциированных с возрастом, в частности красным плоским лишаям слизистой рта и заболеваниями пародонта [25, 26]. При этом концентрации СРБ в периферической крови и в РЖ могут коррелировать, что может свидетельствовать о влиянии стоматологического здоровья на регуляцию воспалительного ответа на локальном и системном уровнях [27, 28]. Хотя полученные результаты отличаются от принятых представлений об изменении СРБ со старением или при возникновении возраст-ассоциированных стоматологических заболеваний, полученные данные имели относительно невысокую связь с возрастом. Возможно, полученный результат связан с пересчётом уровня СРБ по концентрации ОБ, чего не было сделано в приведённых источниках.

Важным звеном поддержания гомеостаза полости рта является минеральный обмен. Общий кальций и неорганический фосфор могут содержаться в РЖ в количествах, превышающих их уровни в периферической крови [13]. Они поддерживают процессы минерализации зубной эмали, могут иметь значение в ремоделировании костной ткани челюсти [29, 30]. Данные, свидетельствующие о возрастной динамике изменения кальция и фосфора противоречивы. Сообщалось, что содержание кальция в РЖ может как увеличиваться, так и уменьшаться с возрастом [31, 32]. В проведённом исследовании стандартизованные уровни кальция и фосфора не имели различий в исследованных возрастных группах и не коррелировали с изменением хронологического возраста. Величина фосфорно-кальциевого соотношения увеличивалась в старших возрастных группах, что может свидетельствовать о смещении минерального баланса в сторону процессов деминерализации эмали и костной резорбции.

Лабораторная оценка уровня слюварного креатинина предложена некоторыми авторами для мониторинга пациентов с патологией почек [33, 34]. Представляется, что креатинин попадает в РЖ из периферической крови через гематосаливарный и гистогематический барьеры полости рта при превышении определённого градиента концентрации [35]. Увеличение содержания мочевины, креатинина, цистатина С в периферической крови может являться одним из признаков возрастной дисфункции почек [36]. В нашей работе установлено, что уровень креатинина в РЖ лиц детского и молодого возраста существенно ниже, чем в зрелом или пожилом. Выявлена связь с изменением хронологического возраста. Данный результат может объясняться не только старением или возможной недиагностированной патологией почек у участников зрелого и пожилого возраста, но и зависимостью уровня креатинина от мышечной массы, пола, диеты, физических нагрузок и других факторов [37].

Установленные в работе возрастные особенности основаны на исследовании практически здоровых лиц

детского, молодого, зрелого и пожилого возраста и имеют ряд ограничений. Относительно невысокий объём исследованных групп, влияние на состав РЖ соматических процессов, образа жизни, характера питания, массы тела, физической активности других факторов могут создавать определённую интерференцию. Использованные биохимические тесты могут отражать наличие различных патологических процессов. Альбумин является основным белком сыворотки крови, содержание которого связано с функцией печени. В работе оценивалась активность общей  $\alpha$ -амилазы, изменение активности которой может быть обусловлено не только дисфункцией слюнных желез, но и заболеваниями поджелудочной железы. Принятый в работе способ стандартизации основан на том, что содержание ОБ имеет обратную зависимость со скоростью слюноотделения, а вязкость связана с количеством растворённых веществ, преимущественно полипептидов, однако поиск оптимального способа стандартизации продолжается, поскольку точность корректировки по ОБ в отдельных случаях может быть неудовлетворительной [38, 39].

**Заключение.** В проведённом исследовании оценивались возрастные изменения биохимического состава РЖ. Старение организма протекает неравномерно, затрагивая различные органы и системы, включая ткани полости рта. Ценным материалом в оценке указанных процессов является РЖ, состав которой может меняться, отражая процессы возрастной перестройки ротовой полости и слюнных желез. Сложные механизмы образования РЖ делают её перспективным материалом неинвазивного мониторинга процессов старения. Полученные результаты свидетельствуют о возрастной динамике таких показателей как ОБ, альбумин,  $\alpha$ -амилаза, СРБ, соотношение фосфор-кальций, ХС, креатинин. Предполагаем, что изменение большей части указанных параметров может быть обусловлено многообразием механизмов старения тканей полости рта: дисфункцией слюнных желез, изменениями пародонта, нарушением процессов минерального обмена. Увеличение содержания креатинина в старших возрастных группах может объясняться как процессами старения почек, так и массой других общеизвестных факторов, влияющих на уровень креатинина, поэтому для подтверждения данной гипотезы требуются дополнительные исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА (П. П. 1-6, 8-11, 14-29, 31-37 С. М. REFERENCES)

7. Базарный В.В. Саливарные биомаркеры возрастзависимых процессов (обзор литературы). *Лабораторная служба*. 2022; 11(3): 28-33. DOI: 10.17116/labs20221103128.
12. Селезнёва И.А., Гильмиярова Ф.Н., Тлустенко В.С., Доменюк Д.А., Гусякова О.А., Колотьева Н.А. и др. Гематосаливарный барьер: строение, функции, методы (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(6): 334-8. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-6-334-338.
13. Бельская Л.В., Сарф Е.А., Косенок В.К. Корреляционные взаимосвязи состава слюны и плазмы крови в норме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(8): 477-82. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-8-477-482.
30. Цепов Л., Цепова Е., Цепов А. Сочетанная патология: воспалительные заболевания пародонта, остеопороз, дефицит витамина D (обзор литературы). *Пародонтология*. 2016; 21(4): 4-9.



REFERENCES

1. Sprott R.L. Biomarkers of aging and disease: introduction and definitions. *Exp. Gerontol.* 2010; 45(1): 2-4. DOI: 10.1016/j.exger.2009.07.008.
2. Aging Biomarker Consortium. Bao H., Cao J., Chen M., Chen M., Chen W. et al. Biomarkers of aging. *Sci. China Life Sci.* 2023; 66(5): 893-1066. DOI: 10.1007/s11427-023-2305-0.
3. Jakovljevic D.G. Physical activity and cardiovascular aging: Physiological and molecular insights. *Exp. Gerontol.* 2018; 109: 67-74. DOI:10.1016/j.exger.2017.05.016.
4. Denic A., Rule A.D., Glasscock R.J. Healthy and unhealthy aging on kidney structure and function: human studies. *Curr. Opin Nephrol. Hypertens.* 2022; 31(3): 228-34. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000780.
5. Bartlett D., O'Toole S. Tooth wear and aging. *Aust. Dent. J.* 2019; Suppl.1: 59-62. DOI: 10.1111/adj.12681.
6. Lamster I.B., Asadourian L., Del Carmen T., Friedman P.K. The aging mouth: differentiating normal aging from disease. *Periodontol.* 2000. 2016; 72(1): 96-107. DOI: 10.1111/prd.12131.
7. Bazarnyi V.V. Salivary biomarkers of age-dependent processes (review). *Laboratornaya sluzhba.* 2022; 11(3): 28-33. DOI: 10.17116/labs20221103128. (in Russian)
8. Thompson L.A., Chen H. Physiology of aging of older adults. *Dental Clinics of North America.* 2021; 65(2): 275-84. DOI: 10.1016/j.cden.2020.11.002.
9. Xu F., Laguna L., Sarkar A. Aging-related changes in quantity and quality of saliva: Where do we stand in our understanding? *J. Texture Stud.* 2019; 50(1): 27-35. DOI: 10.1111/jtxs.12356.
10. González-Moles M.A., Warnakulasuriya S., Gonzalez-Ruiz I., Gonzalez-Ruiz L., Ayen A., Lenouvel D. et al. Worldwide prevalence of oral lichen planus: a systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases.* 2021; 27(4): 813-28. DOI:10.1111/odi.13323.
11. Maciejczyk M., Zalewska A., Ładny J.R. Salivary antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to proteins and lipids in healthy children, adults, and the elderly. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019; 2019: 4393460. DOI: 10.1155/2019/4393460.
12. Selezneva I.A., Gilmiyarova F.N., Tlustenko V.S., Domenjuk D.A., Gussyakova O.A., Kolotyeva N.A. et al. Hematosalivarian barrier: structure, functions, study methods (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2022; 67(6): 334-8. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-6-334-338. (in Russian)
13. Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Kosenok V.K. Correlation interrelations between the composition of saliva and blood plasmain norm. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2018; 63(8): 477-82. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-8-477-482. (in Russian)
14. Ghallab N.A. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: review of the current evidence. *Archives of oral biology.* 2018; 87: 115-24. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.022.
15. Ide M., Karimova M., Setterfield J. Oral health, antimicrobials and care for patients with chronic oral diseases – a review of knowledge and treatment strategies. *Front. Oral Health.* 2022; 3: 866695. DOI: 10.3389/froh.2022.866695.
16. Engelfriet P.M., Jansen E.H., Picavet H.S., Dollé M.E. Biochemical markers of aging for longitudinal studies in humans. *Epidemiol. Rev.* 2013; 35(1): 132-51. DOI: 10.1093/epirev/mxs011.
17. Dodig S., Čepelak I., Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem. Med. (Zagreb).* 2019; 29(3): 030501. DOI: 10.11613/BM.2019.030501.
18. Marcinkowska-Gapińska A., Siemieniak I., Kawalkiewicz W., Stieler O., Hojan-Jezińska D., Kubisz L. Interdependence of rheological and biochemical parameters of blood in a group of patients with clinically silent multifocal vascular cerebral lesions. *Biomedicines.* 2023; 11(7): 2063. DOI: 10.3390/biomedicines11072063.
19. González-Hernández J.M., Franco L., Colomer-Poveda D., Martínez-Subiela S., Cugat R., Cerón J.J. et al. Influence of sampling conditions, salivary flow, and total protein content in uric acid measurements in saliva. *Antioxidants (Basel).* 2019; 8(9): 389. DOI: 10.3390/antiox8090389.
20. Kang J.H., Kho H.S. Blood contamination in salivary diagnostics: current methods and their limitations. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2019; 57(8): 1115-24. DOI: 10.1515/cclm-2018-0739.
21. Dawes C., Wong D.T.W. Role of saliva and salivary diagnostics in the advancement of oral health. *J. Dent. Res.* 2019; 98(2): 133-41. DOI: 10.1177/0022034518816961.
22. Kejrival S., Bhandary R., Thomas B., Kumari S. Estimation of levels of salivary mucin, amylase and total protein in gingivitis and chronic periodontitis patients. *J. Clin. Diagn. Res.* 2014; 8(10): 56-60. DOI:10.7860/JCDR/2014/8239.5042.
23. Karjalainen S., Sewón L., Söderling E., Larsson B., Johansson I., Simell O. et al. Salivary cholesterol of healthy adults in relation to serum cholesterol concentration and oral health. *J. Dent. Res.* 1997; 76(10): 1637-43. DOI: 10.1177/00220345970760100401.
24. Kensche A., Reich M., Kümmerer K., Hannig M., Hannig C. Lipids in preventive dentistry. *Clin. Oral Investig.* 2013; 17(3): 669-85. DOI:10.1007/s00784-012-0835-9.
25. Tvarijonaviciute A., Aznar-Cayuela C., Rubio C.P., Ceron J.J., López-Jornet P. Evaluation of salivary oxidate stress biomarkers, nitric oxide and C-reactive protein in patients with oral lichen planus and burning mouth syndrome. *Journal of Oral Pathology and Medicine.* 2016; 46(5): 387-92. DOI: 10.1111/jop.12522.
26. Ersin Kalkan R., Öngöz Dede F., Gökmenoğlu C., Kara C. Salivary fetuin-A, S100A12, and high-sensitivity C-reactive protein levels in periodontal diseases. *Oral Dis.* 2018; 24(8): 1554-61. DOI: 10.1111/odi.12927.
27. Plank A.C., Maschke J., Rohleder N., Fasching P.A., Beckmann M.W., Kornhuber J. et al. Comparison of C-reactive protein in dried blood spots and saliva of healthy adolescents. *Front. Immunol.* 2021; 12: 795580. DOI: 10.3389/fimmu.2021.795580.
28. Clark D., Radaic A., Kapila Y. Cellular mechanisms of inflammaging and periodontal disease. *Front Dent. Med.* 2022; 3: 844865. DOI: 10.3389/fdmed.2022.844865.
29. Jazaeri M., Malekzadeh H., Abdolsamadi H., Rezaei-Soufi L., Samami M. Relationship between salivary alkaline phosphatase enzyme activity and the concentrations of salivary calcium and phosphate ions. *Cell J.* 2015; 17(1): 159-62. DOI: 10.22074/cellj.2015.523.
30. Tsepov L.M., Tsepova E.L., Tsepov A.L. Comorbidity: inflammatory periodontal diseases, osteoporosis, vitamin D deficiency (review of the literature). *Parodontologiya.* 2016; 21(4): 4-9. (in Russian)
31. Nassar M., Hiraishi N., Islam S., Otsuki M., Tagami J. Age-related changes in salivary biomarkers. *Journal of Dental Sciences.* 2014, 9(1): 85-90. DOI: 10.1016/j.jds.2013.11.002.
32. Nagler R.M., Hershkovich O. Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile. *Archives of Oral Biology.* 2005; 50(1): 7-16. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2004.07.
33. Bilancio G., Cavallo P., Lombardi C., Guarino E., Cozza V., Giordano F. et al. Saliva for assessing creatinine, uric acid, and potassium in nephropathic patients. *BMC Nephrol.* 2019; 20(1): 242. DOI: 10.1186/s12882-019-1437-4.
34. Yajamanam N., Vinapamula K.S., Sivakumar V., Bitla A.R., Rao P.V. Utility of saliva as a sample to assess renal function and estimated glomerular filtration rate. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 2016; 27(2): 312-9. DOI:10.4103/1319-2442.178549.
35. Gaál Kovalčíková A., Pančíková A., Konečná B., Klamárová T., Novák B., Kovařová E. et al. Urea and creatinine levels in saliva of patients with and without periodontitis. *Eur. J. Oral Sci.* 2019; 127(5): 417-24. DOI: 10.1111/eos.12642.
36. Hartmann A., Hartmann C., Secci R., Hermann A., Fuellen G., Walter M. Ranking biomarkers of aging by citation profiling and effort scoring. *Front Genet.* 2021; 12: 686320. DOI: 10.3389/fgene.2021.686320.
37. Boeniger M.F., Lowry L.K., Rosenberg J. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *American Industrial Hygiene Association Journal.* 1993; 54(10): 615-27. DOI: 10.1080/15298669391355134.
38. Walsh N.P., Montague J.C., Callow N., Rowlands A.V. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch. Oral Biol.* 2004; 49(2): 149-54. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2003.08.001.
39. Martínez-Subiela S., Franco-Martínez L., Rubio C.P., Muñoz-Prieto A., Torres-Cantero A., Tecles F. et al. Measurement of anti SARS-CoV-2 RBD IgG in saliva: validation of a highly sensitive assay and effects of the sampling collection method and correction by protein. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2022; 60(10): 1683-9. DOI: 10.1515/cclm-2022-0418.