

© Сарф Е.А., Бельская Л.В., 2026

Сарф Е.А., Бельская Л.В.



<https://elibrary.ru/iteumz>

СТАБИЛЬНОСТЬ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СЛЮНЫ ПРИ ХРАНЕНИИ И ЗАМОРАЖИВАНИИ

ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет», 644099, Омск, Россия

Актуальность. В настоящее время отсутствуют данные, которые бы однозначно регламентировали условия хранения образцов слюны после сбора и до проведения анализа. Цель работы – изучить стабильность анализов слюны при разных условиях хранения образцов (температура и длительность хранения).

Материал и методы. Проведено исследование биохимических параметров слюны 20 женщин (возраст $29,1 \pm 12,3$ года) по следующим показателям: содержание белка, мочевины, альбумина, мочевой кислоты, суммарное содержание α -аминокислот, имидазольных соединений, продуктов липопероксидации и оксида азота, а также активность лактатдегидрогеназы, гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы и катализы. Одну часть пробы анализировали непосредственно после сбора без хранения и замораживания, в остальных повторяли выполнение первоначального перечня анализов после хранения при температуре -20°C и -80°C в течение 3 и 6 месяцев соответственно.

Результаты. При хранении отмечена общая тенденция к снижению активности ферментов, а в ряде случаев и полного их разрушения, в частности лактатдегидрогеназы. Показатели белкового обмена сохраняют свою стабильность при заморозке и мало зависят от длительности хранения. Наблюдается снижение содержания продуктов перекисного окисления липидов.

Заключение. Температура и время хранения могут влиять на стабильность состава слюны, что необходимо учитывать при планировании эксперимента.

Ключевые слова: слюна; хранение; замораживание; биохимия; ферменты

Для цитирования: Сарф Е.А., Бельская Л.В. Стабильность биохимического состава слюны при хранении и замораживании.

Клиническая лабораторная диагностика. 2026; 71 (2): 186-190

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2026-71-2-186-190>

EDN: ITEUMZ

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук, зав. научно-исследовательской лабораторией биохимии Омского государственного педагогического университета; e-mail: belskaya@omgpu.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.11.2025

Принята к печати 12.01.2026

Опубликовано 01.02.2026

Sarf E.A., Bel'skaya L.V.

STABILITY OF THE SALIVARY BIOCHEMICAL COMPOSITION DURING STORAGE AND FREEZING

Omsk State Pedagogical University, 644099, Omsk, Russia

Background. Currently, there are no data that clearly regulate the storage conditions of saliva samples after collection and before analysis. The aim of this study was to investigate the stability of saliva analytes under different sample storage conditions (temperature and storage duration).

Material and methods. A study of the biochemical parameters of saliva from 20 women (aged 29.1 ± 12.3 years) was conducted for the following indicators: protein, urea, albumin, uric acid, total α -amino acid content, imidazole compounds, lipid peroxidation products, and nitric oxide, as well as the activity of lactate dehydrogenase, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, and catalase. One portion of the sample was analyzed immediately after collection without storage or freezing; the remaining portions underwent repeated analysis after storage at -20°C and -80°C for 3 and 6 months, respectively.

Results. During storage, a general trend toward decreased enzyme activity has been observed, and in some cases, complete destruction of enzymes, particularly lactate dehydrogenase. Protein metabolism parameters remain stable during freezing and are little affected by storage time. A decrease in the content of lipid peroxidation products has been observed.

Conclusion. Storage temperature and time can affect the stability of saliva composition, which must be taken into account when planning the experiment.

Key words: saliva; storage; freezing; biochemistry; enzymes

For citation: Sarf E.A., Bel'skaya L.V. Stability of the salivary biochemical composition during storage and freezing. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2026; 71 (2): 186-190 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2026-71-2-186-190>

EDN: ITEUMZ

For correspondence: Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Head of Laboratory, Biochemistry Research Laboratory, Omsk State Pedagogical University; e-mail: belskaya@omgpu.ru

Information about authors:

Sarf E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4918-6937>;

Bel'skaya L.V., <https://orcid.org/0000-0002-6147-4854>.

Funding. The study had no sponsor support.

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

Received 24.11.2025
Accepted 12.01.2026
Published 01.02.2026

ВВЕДЕНИЕ

Слюна – это многофункциональная биологическая жидкость, содержащая широкий спектр биомаркеров, отражающих как физиологические, так и патофизиологические состояния [1, 2]. Сбор слюны является неинвазивным, недорогим и легкодоступным методом и используется в диагностических целях [3, 4]. В последние годы отмечен значительный рост интереса к разработке методов диагностики различных заболеваний путем анализа слюны [5, 6]. Слюна является экзокринным секретом слюнных желез, в основном состоящим из воды (99 %), но также содержащим электролиты, белки, липиды и ферменты [7]. Загрязнители, такие как бактерии, эпителиальные клетки, жидкость десневой борозды и остатки пищи, также обнаруживаются в слюне [2, 8]. Белки и другие вещества попадают в слюну через кровоток, и в некоторых случаях существует тесная связь между их концентрацией в слюне и сыворотке [9]. Действительно, слюнные железы сильно васкуляризированы, и происходит обмен соединениями, которые переходят путем пассивной диффузии или активного транспорта из крови в слюну и наоборот [9]. Липиды слюны в основном секретируются главными слюнными железами, но некоторые липиды, такие как холестерин и некоторые жирные кислоты, диффундируют непосредственно из сыворотки в слюну [10].

Слюна человека, как и любая другая биологическая жидкость, используемая в диагностических целях, требует надлежащих методов и устройств для сбора/отбора проб, точного времени отбора проб, соответствующих условий обращения и транспортировки и, в конечном счёте, соблюдения правил хранения до проведения дальнейшего анализа образцов [11]. Многие авторы пришли к выводу, что, хотя во многих случаях отбор проб слюны может быть привлекательной альтернативой анализу сыворотки, необходимо всесторонне изучить и рассмотреть вопросы стандартизации методов отбора проб слюны, поддержания результатов и методов обнаружения [12, 13]. Несмотря на то, что были апробированы различные методы обработки, транспортировки и хранения, до сих пор нет руководств для преаналитического этапа работы со слюной (методов с оптимальными результатами) [3, 14]. Многие исследования указывают на существенное влияние процедур пробоотбора и пробоподготовки слюны и внешних факторов на результаты анализа [3, 15]. Кроме того, известно, что состав слюны может меняться в соответствии с циркадными ритмами [16, 17]. Поэтому время отбора проб варьируется в зависимости от цели исследования [18–21]. Ранее нами было показано, какие факторы влияют на состав слюны, и выявлено оптимальное время условия сбора проб слюны [22, 23]. Однако условия хранения образцов слюны не были установлены, а для проведения ретроспективных исследований или исследований, включающих несколько экспериментальных точек отбора проб, необходимо длительное хранение образцов. Правильная процедура хранения биоматериала до начала исследования является важным фактором для получения достоверных результатов. Имеющиеся данные свидетельствуют о том,

что различные аналиты слюны оставались стабильными при хранении, однако существует ряд показателей, концентрация которых меняется, что необходимо учитывать при проведении анализов [24, 25].

ЦЕЛЬЮ работы являлось изучить стабильность анализов слюны при разных условиях хранения образцов (температура и длительность хранения).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие здоровые добровольцы (20 женщин, возраст $29,1 \pm 12,3$ года). Образцы слюны собирали утром натощак путем сплевывания в стерильные полипропиленовые пробирки после предварительного полоскания полости рта кипяченой водой. Образцы слюны центрифугировали при 10 000 г в течение 10 минут при комнатной температуре (ЦЛн-16, Россия), отбирали надосадочную жидкость и делили на 5 равных частей. Одну часть анализировали непосредственно после сбора без хранения и замораживания. Остальные части переносили в пробирки типа Эппendorф и хранили при температуре -20°C и -80°C в течение 3 и 6 месяцев соответственно, после чего повторяли выполнение первоначального перечня анализов.

Для всех образцов определяли содержание общего белка по реакции с пирогалловым красным (Кат.№ В-8084, г/л), мочевины уреазно-салицилатным методом по Берглюту (Кат.№ В-8074, ммоль/л), альбумина по реакции с бромкрезоловым зеленым (Кат.№ В-8025, г/л), мочевой кислоты уриказным методом (Кат.№ В-8098, мкмоль/л), а также активность гамма-глутамилтрансферазы кинетическим методом с использованием L-гамма-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида в качестве субстрата по Зейцу-Персину (Кат.№ В-8030, ГГТ, Е/л), лактатдегидрогеназы кинетическим УФ-методом по скорости окисления НАДН (Кат.№ В-8321, ЛДГ, Е/л) и щелочной фосфатазы методом конечной точки по реакции гидролиза п-нитрофенилфосфата (Кат.№ В-8329, ЩФ, Е/л) с использованием коммерческих наборов ООО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Дополнительно определяли суммарное содержание α -аминокислот по реакции с нингидрином (α -АМК, ммоль/л), имидазольных соединений по реакции диазотирования в присутствии сульфаниловой кислоты (ИС, ммоль/л), оксида азота по содержанию стабильных продуктов его окисления – нитрат-ионов (NO, мкмоль/л) методом капиллярного электрофореза (КАПЕЛЬ-105М, Люмэкс, Санкт-Петербург, Россия), продуктов липопероксидации спектрофотометрически по методу И.А. Волчегорского (диеновые конъюгаты ДК, у.е.; триеновые конъюгаты, ТК, у.е.; основания Шиффа, ОШ, у.е.) и активность каталазы по Королюку и соавт. (Кат. нкат/л).

Процедура валидации каждой тест-системы включала пять аналитических серий (исходные образцы, хранение 3 месяца при -20°C и -80°C , хранение 6 месяцев при -20°C и -80°C). В составе каждой аналитической серии были проанализированы калибровочные стандарты для построения градуировочной зависимо-

сти, а также необходимое количество образцов для контроля качества с определенной концентрацией соответствующего показателя. Каждый образец анализировали в двух повторах.

Обработка результатов выполнена непараметрическим методом с использованием программы Statistica 13.3 EN software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) после предварительной проверки характера распределения данных. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что активность ферментов слюны при хранении снижается (рис. 1, А-Д). Так, для ГГТ наблюдалось одинаковое уменьшение активности при хранении как при -20°C (-26,6 %, $p = 0,0005$ и -30,2 %, $p = 0,0039$), так и -80°C (-23,4 %, $p = 0,0009$ и -27,7 %, $p = 0,0045$ в течение 3 и 6 месяцев соответственно) (рис. 1, А). Для ЛДГ при -20°C активность резко снижается практически в 30 раз ($p < 0,0001$), тогда как при -80°C уменьшение активности ЛДГ не имело статистической значимости (-28,3 % и -31,6 %) (рис. 1, Б). Аналогично для ЩФ, однако в данном случае уменьшения активности при -80°C не наблюдалось (рис. 1, Г). Активность каталазы не менялась независимо от условий хранения образцов слюны (рис. 1, В).

Не было показано статистически значимых изменений ряда биохимических показателей слюны при хранении (рис. 2). Так, концентрация общего белка незначительно снижалась при хранении при -20°C (рис. 2, А), мочевины не менялась (рис. 2, Б), для альбумина было отмечено незначительное уменьшение концентрации (рис. 2, В), также как и для α -АМК (рис. 2, Д). Увеличение концентрации показано для мочевой кислоты (рис. 2, Г) и имидазольных соединений (рис. 2, Е), однако и оно находилось в пределах статистической погрешности.

Дополнительно проанализирована динамика уровня продуктов липопероксидации при хранении (рис. 3, А-Г). Показано, что независимо от температуры хранения наблюдалось уменьшение уровня гидроперекисей липидов в слюне, статистически значимое при времени хранения 6 месяцев и температуре -20°C : для ДК -10,8 %, $p = 0,0126$ (рис. 3, А), для ТК -23,3 %, $p = 0,0180$ (рис. 3, Б) и для ОШ -17,3 %, $p = 0,0335$ (рис. 3, В). Для НО было показано увеличение концентрации как при -20°C (+ 13,9 %, $p = 0,0006$ и + 38,0 %,

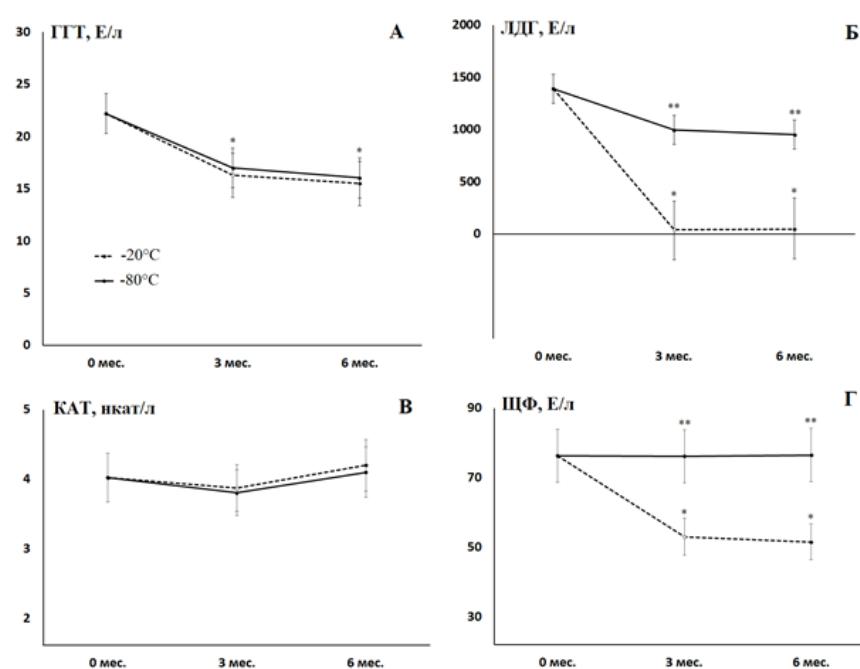


Рис. 1. Изменение активности ферментов слюны при хранении в различных условиях (-20°C и -80°C): А – гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), Б – лактатдегидрогеназа (ЛДГ), В – каталаза (КАТ), Г – щелочная фосфатаза (ЩФ). * - различия с исходным значением (0 мес.) статистически значимо, ** - различие с соответствующим значением при -20°C статистически значимо, $p < 0,05$.

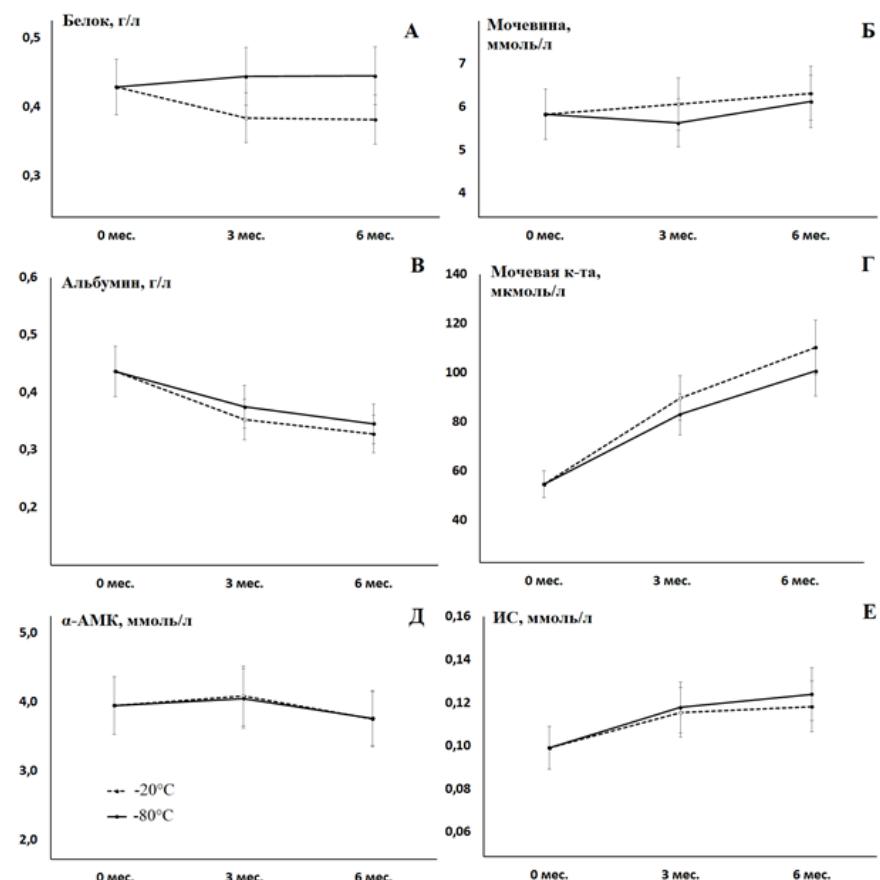


Рис. 2. Изменение состава слюны при хранении в различных условиях (-20°C и -80°C): А – общий белок, Б – мочевина, В – альбумин, Г – мочевая кислота, Д – суммарное содержание α -аминокислот (α -АМК), Е – имидазольные соединения (ИС).

$p < 0,0001$), так и -80°C ($+17,7\%, p < 0,0001$ и $+19,7\%, p < 0,0001$) (рис. 3, Г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность биохимических анализов слюны является важным фактором, влияющим на эффективность их использования в качестве клинических биомаркеров. Многими авторами показано воздействие хранения и заморозки на различные биохимические параметры, такие как: фосфатаза, трансаминаза и дегидрогеназа [26], антиоксидантный статус [27], α -амилаза, холинэстераза, липаза, общая эстераза, креатинкиназа, аспартатамино-трансфераза, лактатдегидрогеназа, лактат, аденоzin-дезаминаза, мочевая кислота, каталаза, продукты окисления белков и перекись водорода [25], иммуноглобулин G [24], внеклеточная ДНК [28], профили микробиома [29, 30], а также макро- и микроэлементы [15]. Можно отметить, что показатели могут оставаться стабильными или напротив полностью разрушаться, а также для определенных параметров нужны соответствующие условия заморозки и длительность хранения. В частности, активность ферментов может изменяться при хранении. В случае ГГТ и КАТ активность остается практически стабильной как при -20°C , так и при -80°C . Для ГГТ эта информация была уже получена при хранении образцов крови [31]. Для КАТ стабильность при хранении ранее не была показана, однако известно, что антиоксидантные ферменты слюны стабильны при заморозке и хранении [27]. Для ферментов ЛДГ и ЩФ отмечено понижение активности. Активность ЛДГ значительно понижается после хранения при -20°C независимо от времени. Это может быть обусловлено нестабильностью изоферментов ЛД-4 и ЛД-5 при -20°C [25, 32]. Активность ЩФ стабильна при -80°C и не зависит от времени хранения, что согласуется с литературными данными [26, 33]. Ряд биохимических показателей, такие как общий белок, мочевина, альбумин, мочевая кислота, α -АМК и имидазольные соединения сохраняют свою стабильность при заморозке и мало зависят от длительности хранения. Это может быть связано с процедурой преаналитического этапа слюны, а именно с центрифугированием, с целью удаления клеток эпителия, муцина

и других крупных молекул и частиц [15, 25]. Поэтому, можно предположить, что аминокислотный состав слюны, также будет стабилен при хранении, в том числе и при -20°C [34]. Для продуктов перекисного окисления липидов характерно понижение концентрации при длительном хранении. Известно, что при хранении содержание конечного продукта липопероксидации малонового диальдегида может искусственно повышаться в среде биологического образца, богатого липидами [35], что влечет за собой понижение содержания ДК, ТК и ОШ. Содержание оксида азота растет при хранении и замораживании, что может быть связано с содержанием в микробиоме слюны бактерий, восстанавливающих нитраты (*Prevotella melaninogenica*, *Neisseria subflava*, *Rothia mucilaginosa*, *Veillonella dispa* и *Veillonella parvula*) [36].

К ограничениям исследования можно отнести небольшой перечень исследуемых параметров и достаточно большие интервалы хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проверена стабильность биохимических параметров слюны при длительном хранении и разных температурных режимах. Отмечена общая тенденция к снижению активности ферментов, а в ряде случаев и полного их разрушения, в частности ЛДГ. Кроме того при хранении наблюдается снижение содержание продуктов перекисного окисления липидов в слюне. Показатели белкового обмена сохраняют свою стабильность при заморозке и мало зависят от длительности хранения. Интерпретация экспериментальных результатов подтверждает предположение о том, что температура и время хранения могут влиять на состав слюны. Замороженные образцы следует хранить при -80°C для сохранения ферментативной активности, так как хранение при -20°C может привести к значительной погрешности в измеренных значениях активности. Данные факты необходимо принимать во внимание при планировании эксперимента, сопоставлении результатов, полученных различными исследователями.



ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-4, 7-14, 16, 17, 19-22, 24-31, 33-36 СМ. REFERENCES)

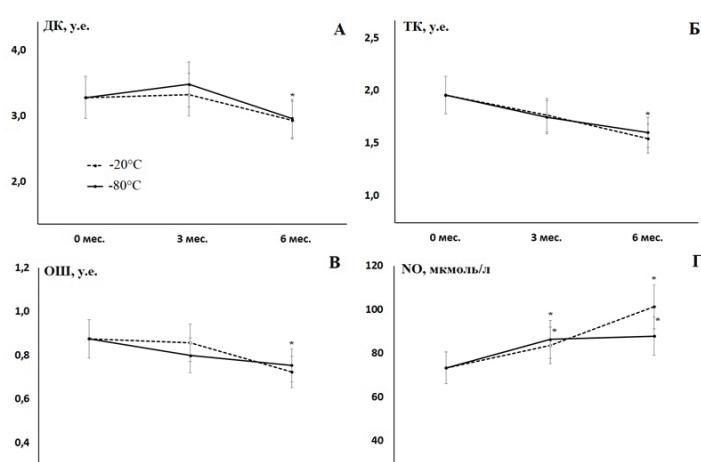


Рис. 3. Изменение состава слюны при хранении в различных условиях (-20°C и -80°C): А – диеновые конъюгаты (ДК), Б – триеновые конъюгаты (ТК), В – основания Шиффа (ОШ), Г – оксид азота (NO). * - различия с исходным значением (0 мес) статистически значимо, $p < 0,05$.

5. Борисова О.В., Маковецкая Г.А., Гильмиярова Ф.Н., Селезнева И.А., Мазур Л.И., Жирнов В.А., Решетова С.Н. Современный взгляд на клиническую ценность исследования ротовой жидкости в практике врача-педиатра. *Медицинский Совет*. 2022; 19: 138-45. DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-19-139-145.
6. Раимкулова Ч.А., Аронбаев С.Д., Аронбаев Д.М. Саливodiагностика: прошлое, настоящее, будущее. *Universum: химия и биология*. Электронный научный журнал. 2023; 1-2: 103. DOI: 10.32743/UniChem.2023.103.1.1484.
15. Савинов С.С., Анисимов А.А. Влияние условий отбора образцов слюны человека на результаты определения макро- и микроэлементов. *Журнал аналитической химии*. 2020; 75(4): 327-32. DOI: 10.31857/S0044450220040143.
18. Проходная В.А., Чибичян Е.Х., Ломова А.С., Косых А.Ю. Методические подходы к сбору и исследованию биологических жидкостей ротовой полости в рамках преподавания пропедевтики стоматологических болезней. *Главврач Юга России*. 2018; 1 (59): 43-6. https://elibrary.ru/item.asp?id=32322152.
23. Сарф Е.А., Бельская Л.В. Факторы вариабельности состава смешанной слюны (обзор литературы). *Био-*

- медицинская химия. 2025; 71 (5): 319-32. DOI: 10.18097/PBMCR1574.
32. Епринцев А.Т., Комарова Н.Р., Фалалеева М.И. Физико-химические и регуляторные свойства лактатдегидрогеназы из листьев гороха (*Pisum sativum L.*) в условиях дефицита кислорода. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019; 55(2): 166-71. DOI: 10.1134/S0555109919020077.



REFERENCES

1. Zhou Y., Liu Z. Saliva biomarkers in oral disease. *Clin. Chim. Acta*. 2023; 1(548): 117503. DOI: 10.1016/j.cca.2023.117503.
2. Melguizo-Rodríguez L., Costela-Ruiz V.J., Manzano-Moreno F.J., Ruiz C., Illescas-Montes R. Salivary biomarkers and their application in the diagnosis and monitoring of the most common oral pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 1-17. DOI: 10.3390/ijms21145173.
3. Mortazavi H., Yousefi-Koma A.A., Yousefi-Koma H. Extensive comparison of salivary collection, transportation, preparation, and storage methods: a systematic review. *BMC Oral. Health.* 2024; 24(1): 168. DOI: 10.1186/s12903-024-03902-w.
4. Dongiovanni P., Meroni M., Casati S., Goldoni R., Thomaz D.V., Kehr N.S., Galimberti D., Del Fabbro M., Tartaglia G.M. Salivary biomarkers: novel noninvasive tools to diagnose chronic inflammation. *Int. J. Oral. Sci.* 2023; 15(1): 27. DOI: 10.1038/s41368-023-00231-6.
5. Borisova O.V., Makovetskaya G.A., Gil'miyarova F.N., Selezneva I.A., Mazur L.I., Zhirnov V.A., Reshetova S.N. A modern view on the clinical value of the study of oral fluid in the practice of a pediatrician. *Meditinskij Sovet*. 2022; 16(19): 139-45. DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-19-139-145. (in Russian)
6. Raimkulova Ch.A., Aronbaev S.D., Aronbaev D.M. Salivodiagnostics: past, present, future. *Universum: khimiya i biologiya : elektronnyj nauchnyj zhurnal*. 2022; 1-2: 103. DOI: 10.32743/UniChem.2023.103.1.1484. (in Russian)
7. Buchan E., Kelleher L., Clancy M., Stanley Rickard, J.J., Oppenheimer P.G. Spectroscopic molecular-fingerprint profiling of saliva. *Anal. Chim. Acta*. 2021; 15(1185): 339074. DOI: 10.1016/j.aca.2021.339074.
8. Prasad S., Tyagi A.K., Aggarwal B.B. Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 2016; 241: 783-99. DOI: 10.1177/1535370216638770.
9. Tóthová L., Kamodyová N., Červenka T., Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015; 20(5): 73. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00073.
10. Karjalainen S., Sewón L., Söderling E., Larsson B., Johansson I., Simell O., Lapinleimu H., Seppänen R. 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.
11. Amado F., Calheiros-Lobo M.J., Ferreira R., Vitorino R. Sample treatment for saliva proteomics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1073:23-56. DOI: 10.1007/978-3-030-12298-0_2.
12. Slavish D.C., Szabo Y.Z. The effect of acute stress on salivary markers of inflammation: a systematic review protocol. *Syst. Rev.* 2019; 8(1): 1-8. DOI: 10.1186/s13643-019-1026-4.
13. Szabo Y.Z., Fernandez-Botran R., Newton T.L. Cumulative trauma, emotion reactivity and salivary cytokine levels following acute stress in healthy women. *Anxiety Stress Coping.* 2019; 32(1): 82-94. DOI: 10.1080/10615806.2018.1524377.
14. Vincent F.B., Nim H.T., Lee J.P.W., Morand E.F., Harris J. Effect of storage duration on cytokine stability in human serum and plasma. *Cytokine*. 2019; 113: 453-7. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.06.009.
15. Savinov S. S., Anisimov A. A. Influence of human saliva sampling conditions on the results of macro- and microelement determination. *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2020; 75(4): 327-32. DOI: 10.31857/S0044450220040143. (in Russian)
16. Aydin S., Ozercan H. I., Aydin S., Ozkan Y., Dagli F., Oguzoncul F., Geckil H. Biological rhythm of saliva ghrelin in humans. *Biological Rhythm. Research.* 2006; 37(2): 169-77. DOI: 10.1080/09291010600576860.
17. Ekström J., Khosravani N., Castagnola M., Messana I. Saliva and the control of its secretion. *Dysphag: Diagnos. Treat.* 2019; 21-57. DOI: 10.1007/174_2017_143.
18. Prokhodnaya V.A., Chibichyan E.H., Lomova A.S., Kosykh A.Y. Methodological approaches of collection and research of biological liquids of the mouth cavity within the framework of teaching disorders of dentistry diseases. *Glavvrach Yuga Rossii*. 2018; 1(59): 43-6. <https://elibrary.ru/item.asp?id=32322152>. (in Russian)
19. Jasim H., Carlsson A., Hedenberg-Magnusson B., Ghafouri B., Ermberg M. Saliva as a medium to detect and measure biomarkers related to pain. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3220. DOI: 10.1038/s41598-018-21131-4.
20. Ishikawa S., Sugimoto M., Kitabatake K., Tu M., Sugano A., Yamamori I., Iba A., Yusa K., Kaneko M., Ota S., Hiwatari K., Enomoto A., Masaru T., Iino M. Effect of timing of collection of salivary metabolomic biomarkers on oral cancer detection. *Amino Acids*. 2017; 49(4): 761-70. DOI: 10.1007/s00726-017-2378-5.
21. Cohier C., Mégarbane B., Roussel O. Illicit drugs in oral fluid: Evaluation of two collection devices. *J. Analytical Toxicol.* 2017; 41(1): 71-6. DOI: 10.1093/jat/bkw100.
22. Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Sarf E.A. Chronophysiological features of the normal mineral composition of human saliva. *Archives of Oral Biology*. 2017; 82: 286-92. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.024.
23. Sarf E.A., Bel'skaya L.V. Factors of variability in the composition of mixed saliva (a review). *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2025; 71(5): 319-32. DOI: 10.18097/PBMCR1574. (in Russian)
24. Radovani B., Lauc G., Gudelj I. Storage stability and HILIC-UHPLC-FLR analysis of immunoglobulin G N-glycome from saliva. *Anal. Bioanal. Chem.* 2023; 415(28): 6985-93. DOI: 10.1007/s00216-023-04682-y.
25. Barranco T., Rubio C.P., Tvarijonaviciute A., Rubio M., Damia E., Lamy E. et al. Changes of salivary biomarkers under different storage conditions: effects of temperature and length of storage. *Biochem. Med. (Zagreb)*. 2019; 29. DOI: 10.11613/BM.2019.010706.
26. Dos Santos D.R., Souza R.O., Dias L.B., Ribas T.B., de Oliveira L.C.F., Sumida D.H., Dornelles R.C.M., Nakamune A.C.M.S., Chaves-Neto A.H. The effects of storage time and temperature on the stability of salivary phosphatases, transaminases and dehydrogenase. *Arch. Oral. Biol.* 2018; 85: 160-5. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.10.016.
27. Amadeu J.K., Lemes A.L., Schussel J.L., Amenábar J.M. Effect of storage time and temperature on salivary total antioxidant capacity, total oxidant status, and oxidant stress index. *Acta Stomatol. Croat.* 2019; 53(2): 119-24. DOI: 10.15644/asc53/2/3.
28. Janovičová L., Holáňová D., Vlková B., Celec P. Pre-analytical factors affecting extracellular DNA in saliva. *Diagnostics (Basel)*. 2024; 14(3): 249. DOI: 10.3390/diagnostics14030249.
29. Furuhashi H., Takayasu L., Isshi K., Hara Y., Ono S., Kato M., Sumiyama K., Suda W. Effect of storage temperature and flash-freezing on salivary microbiota profiles based on 16S rRNA-targeted sequencing. *Eur. J. Oral. Sci.* 2022; 130(2): e12852. DOI: 10.1111/eos.12852.
30. Kim H.J., Park D.H., Han S.H., Kim S.Y. Optimal storage time and temperature of human oral samples to minimize microbiome changes: A scoping review. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 2024; 60: 220-31. DOI: 10.1016/j.jdsr.2024.05.001.
31. Alegre E., Varo N., Fernández-Calle P., Calleja S., González Á. Impact of ultra-low temperature long-term storage on the preanalytical variability of twenty-one common biochemical analytes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2022; 60(7): 1003-10. DOI: 10.1515/cclm-2022-0063.
32. Eprintseva A.T., Komarova N.R., Falaleeva M.I. Physicochemical and regulatory properties of Lactatdehydrogenase from pea leaves (*Pisum sativum L.*) in the conditions of oxygen deficiency. *Prikladnaya biokhimija i mikrobiologiya*. 2019; 55(2): 166-71. DOI: 10.1134/S0555109919020077. (in Russian)
33. Cheng N., Johnson L., Dufresne J., Mazinani S., Marshall J.G. Alkaline phosphatase-streptavidin conjugate (APSA) enzyme and binding activity over time and storage conditions. *Biochem. Biophys. Rep.* 2025; 43: 102160. DOI: 10.1016/j.bbrep.2025.102160.
34. Nam M., Jo S.R., Park J.H., Kim M.S. Evaluation of critical factors in the preparation of saliva sample from healthy subjects for metabolomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2023; 223: 115145. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115145.
35. Tsikas D. GC-MS and GC-MS/MS measurement of malondialdehyde (MDA) in clinical studies: Pre-analytical and clinical considerations. *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab.* 2023; 30: 10-24. DOI: 10.1016/j.jmsacl.2023.08.001.
36. Yang Z., Du C., Chang Z., Yang Y., Hu L. Role of oral and gut microbiomes in enterosalivary nitrate metabolism and their effects on systemic disease. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2025; 15: 1612223. DOI: 10.3389/fcimb.2025.1612223.