

Муниципальное казённое общеобразовательное учреждение средняя общеобразовательная
школа № 8 село Тахта Ипатовский район

Тема: Исследование ферментного и клеточного состава слюны человека

Направление: Генетика и биомедицина

Выполнила: Деникаева Амина Руслановна, ученица 9 класса МКОУ СОШ №8 с. Тахта

Научный руководитель: Тарала Ю.Г., учитель химии МКОУ СОШ №8 с. Тахта,

Диденко Н.Н., куратор направления «Генетика и биомедицина»

с. Тахта, Ипатовский район, 2024 г.

Проблема.

Недостаточное уделение внимания количественному и качественному анализу слюны человека при диагностике заболеваний различного спектра.

Актуальность.

Слюна увлажняет и очищает ткани полости рта, сохраняет количественно-видовое разнообразие микрофлоры ротовой полости, образует защитный муциновый барьер (образует пленку, состоящую из слизи, на, соответственно, слизистой оболочке ротовой полости и коронках зубов). Данный механизм способствует снижению химического воздействия на физиологические структуры полости рта, антител и ферментов желез (лизоцим, лактоферрин и др.), лейкоцитов и обладает кровоостанавливающими и прокоагуляционными свойствами. Качественный и количественный состав ферментов слюны меняется при различных заболеваниях организма.(1)

Гипотеза: я предполагаю, что есть зависимость между уровнем ферментов и количеством клеток в составе слюны человека

Цель.

Целью данного исследования является изучение клеточного состава слюны и концентрации ферментов у различных групп людей и выявление связи между концентрацией ферментов и их заболеваниями или состоянием здоровья.

Задачи.

1. Проанализировать литературу по интересующей тематике.
2. Провести забор исходных материалов у четырех пациентов.
3. Проанализировать клеточный состав слюны с помощью проточной цитометрии.
4. Проанализировать ферментный состав с помощью ИФА.
5. Провести статистическую обработку.

Методы анализа.

Для измерения концентрации ферментов и уровня клеток в слюне использовались

методы спектрофотометрии и иммуно - ферментного анализа. Эти методы позволяют точно определить активность ферментов и выявить отклонения от нормы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием критерия корреляции Пирсона при помощи программного обеспечения LibreOfficeCalc.

Ход работы:

1. Собранные образцы слюны были подвергнуты экстрагированию ферментов и иммуно-ферментному анализу. Клеточный состав слюны был оценен на проточном цитометре
2. Полученные данные были статистически обработаны и проанализированы с использованием соответствующих статистических методов.
3. Были выявлены взаимосвязи между клеточным и ферментным составом слюны

Ранее уже проводились исследования , нацеленные на установление взаимосвязи между ферментным составом слюны и состоянием органов ЖКТ. Учёные СФУ провели эксперименты с участием спортсменов - лыжников с целью мониторинга тренировочного процесса по концентрации слюны.(2)

В эксперименте проведенном Московским государственным медико-стоматологическом университете А .И. Евдокимова ,определили активность аспартаминотрансферазы (АСТ), аланин-аминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Установили, что у пациентов, больных бронхиальной астмой (БА), достоверно увеличена активность АСТ, ЩФ и ЛДГ, что свидетельствует о неблагополучии в полости рта. Полученные данные подтверждают эффективность и безопасность лечебно-профилактического ополаскивателя (ЛПО), содержащего в своей основе пробиотик и борнеол, предлагаемого для гигиены полости рта пациентам с БА, находящимся на ортодонтическом лечении с помощью металлической брекет-системы.

Литературный обзор.

Известно, что человеческая слюна является уникальной биологической средой. Известно то, что в составе слюны присутствует большое разнообразие видов белков и

нуклеиновых кислот, а также электролитов, ферментов, одним словом – регуляторов, которые регулярно доставляются из местных и системных источников организма. Актуальным выбором направления для изучения заболеваний ротовой полости является выявление различных маркеров при стоматологической патологии, чему посвящено большое количество научных работ.

Учеными НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова были обнаружены особенности ферментативной активности в зависимости от гистологического типа опухоли - рака легких. При аденокарциноме выявлено повышение активности α -амилазы в слюне ($p = 0,009$). Стало понятно, что вне зависимости от гистологического типа рака легкого наблюдается снижение активности целевых ферментов на фоне отдаленного и регионарного метастазирования.(3)

Исходя из многообразия ферментного и клеточного состава слюны, было принято решение оценивать эти параметры с помощью проточной цитометрии и иммуноферментного анализа (ИФА).

Проточная цитометрия - относительно новая, но уже популярная технология, применяется в различных областях, таких как клинические: иммунология, онкология, онкогематология, трансплантология, общая гематология, диагностическое типирование клеток и др.; общебиологические: микробиология, морская биология, промышленная биотехнология; исследовательские: клеточная кинетика, клеточная энзимология, клеточная физиология, генетика и др. Возможности анализа целевых параметров клеток, их морфологии, функционал автоматизации и ускорения анализа постоянно расширяются. Этому способствует улучшение технических возможностей новейшего оборудования и его популяризация, а также постоянно улучшающаяся база реагентов. Принцип проточной цитометрии заключается в оптическом анализе клеток или их частей в гидродинамически узком потоке, пересекающем сфокусированный лазерный луч. В этом случае возможен одновременный многопараметрический анализ физических и/или химических свойств до тысяч частиц в секунду. Оптические сигналы улавливаются системой фотоумножителей и зеркал.(4)

Для более точной идентификации клеток могут быть использованы методы их прижизненной окраски. Например, с этой целью используется краситель - Hoechst. (6) Hoechst 33258 (НТ) является синтетическим препаратом, состоящим из двух

бензимидазольных, а также фенольного и N-метилпиперазинового колец, в свободном состоянии молекулы лежащими почти в одной плоскости. Молекула НТ, как и другие «желобочники», имеет изогнутую «изоспиральную» (isohelical) форму, позволяющую ей укладываться в малый желобок ДНК без существенных конформационных изменений ее самой и дуплекса ДНК с образованием специфических к АТ-трактам водородных связей. НТ используется в лабораторной практике в качестве флуоресцентного маркера ДНК, при связывании с которой его светимость увеличивается и смещается в коротковолновую область: от $\lambda=510$ нм в свободном состоянии до $\lambda=450$ нм в комплексе .

Для выделения из гетерогенной клеточной популяции слюны нейтрофилов при помощи проточной цитометрии использовалось окрашивание целестиновым синим, эпителиоцитов десны – антитела к их специфическому рецептору TLR-2, меченные флуорохромом APC.

Ещё одним эффективным методом биохимической диагностики является Иммуноферментный анализ — ИФА — метод выявления антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом. После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат, который расщепляется ферментом с окрашиванием раствора в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфатаза) цвет.(5)

Перспективы исследований

Дальнейшие исследования в области концентрации ферментов в слюне могут привести к разработке новых методов диагностики и терапии многих заболеваний .Это открывает новые возможности для улучшения здоровья и качества жизни.

Анализ и результаты:

Концентрация ферментов в начале проекта.

Концентрация амилазы:

- У четырех пациентов она составила от 395 Ед/мл. до 623 Ед/мл.
- Корреляция между количеством амилазы с количеством супер оксида дисмутаза(СОД)-достоверна (весьма высокая, обратная).

Концентрация щелочной фосфатазы:

- У 4 пациентов она составила от 0.9 нкат/л. до 2.2 нкат/л.
- Корреляция между количеством щелочной фосфазы(ЩФ) с количеством супер оксида дисмутаза(СОД)-достоверна (весьма высокая, обратная).

Концентрация кислой **фосфатазы:**

- У 4 пациентов она составила от 0.7 Ед/100мл. до 13.5 Ед/100мл.
- Корреляция между количеством кислой фосфазы(КФ) с количеством липазы — достоверна(весьма высокая, обратная).

Концентрация **липазы:**

- У 4 пациентов она составила от 0.2 Ед/100мл. до 4.3Ед/100мл.
- Корреляция между количеством липазы с количеством кислой фосфазы(КФ) — достоверна(весьма высокая, обратная).

Концентрация супер оксида **дисмутаза:**

- У 4 пациентов она составила от 1.5 Ед/сек*л. до 4.3Ед/сек*л.
- Корреляция между количеством супер оксида дисмутаза с количеством амилазы и щелочной фосфатазы — достоверна(весьма высокая, обратная)

Концентрация **эпителиоцитов:**

- У 4 пациентов она составила от 37 шт/мл. до 53 шт/мл.
- Корреляция между количеством эпителиоцитов с количеством липазы — достоверна(весьма высокая, прямая).

Концентрация **нейтрофилов:**

- У 4 пациентов она составила от 9 шт/мл. до 13 шт/мл.
- Корреляция между количеством нейтрофилов с количеством амилазы — не достоверна(слабая, обратная).

Заключение.

В ходе исследования литературы мы выявили , что в состав слюны входят различные ферменты, например, а-амилаза, липаза, щелочная фосфатаза (ЩФ), кислая

фосфатаза(КФ), супер оксид дисмутаза(СОД), а также клетки (эпителиоциты, нейтрофилы и др.). И мы узнали , что такие исследования действительно являются актуальными в вопросе диагностики различных состояний здоровья человека. После того, как мы взяли исходный биоматериал у 4 людей и проанализировали их на состав ,мы выявили что концентрация их ферментов в слюне отличается друг от друга. Мы проанализировали клеточный состав слюны с помощью проточной цитометрии, также проанализировали ферментный состав с помощью ИФА. Обработали статистические данные и обнаружили,что при повышении амилазы слюны понижается уровень СОД ,при понижении ЩФ повышается СОД ,при повышении КФ снижается уровень липазы, а уровни эпителиоцитов и липазы прямо пропорциональны друг другу.

Исследование клеточного состава и концентрации ферментов в слюне представляет собой важный аспект в диагностике заболеваний многих органов и систем органов человека: например, пищеварительной системы ,органов зубо-челюстного аппарата и др. Полученные результаты могут быть использованы для разработки индивидуальных подходов к питанию и лечению,что способствует улучшению качества жизни.

Используемая литература.

1. Тадевосян, А. К. ферменты слюны, выполняющие защитные функции / А. К. Тадевосян // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2022. – № 2(48). – С. 175-177. – EDN YGQLDR.
2. Чантурия, Н. З. Влияние лечебно-профилактического ополаскивателя на показатели ферментов слюны у ортодонтических пациентов с бронхиальной астмой / Н. З. Чантурия, Е. А. Картон, И. Г. Островская // Ортодонтия. – 2023. – № 1(101). – С. 22-28. – EDN LNCYTE.
3. Бельская, Л. В. Активность метаболических ферментов слюны при немелкоклеточном раке легкого / Л. В. Бельская, В. К. Косенок, Ж. Массард // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63, № 6. – С. 926-932. – EDN ZXWFJP.
4. Л. Л. Ахмалудинова Клинические приложения проточной цитометрии // Медицина и экология. 2015. №3 (76). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-prilozheniya-protchnoy-tsitometrii> (дата обращения: 30.01.2024).
5. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М.В 75 Микробиология: Учебник. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.:Медицина, 2003. — 336 с: ил. — (Учеб. лит. Для студ. фарм.вузов). - ISBN 5-225-04411-5
6. Костюков В. В. Термодинамика комплексообразования препарата Hoechst 33258 с двуспиральной ДНК // Физика живой. 2010. №1. URL:
7. <https://cyberleninka.ru/article/n/termodinamika-kompleksoobrazovaniya-preparata-hoechst-33258-c-dvuspiralnoy-dnk> (дата обращения: 30.01.2024).
8. <https://school-herald.ru/ru/article/view?id=1141>
9. <https://eduherald.ru/ru/article/view?id=19583>
10. <https://studfile.net/preview/8906093/page:32/>
11. <https://www.kp.ru/edu/shkola/proekt-ili-proehkt-kak-pishetsya/>
12. <https://abstract.science-review.ru/ru/article/view?id=1861>