

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биохимии

А. И. ГРИЦУК, В. Т. СВЕРГУН,
А. Н. КОВАЛЬ

БИОХИМИЯ

РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ

Учебно-методическое пособие
для студентов 2 курса медицинских вузов
медико-диагностического и лечебного факультетов

2-е издание, переработанное и дополненное

Гомель
ГомГМУ
2011

УДК 577.1:616.316-008.8(072)

ББК 52.57

Г 85

Рецензенты:

кандидат медицинских наук, доцент,
заведующий кафедрой патологической физиологии
Гомельского государственного медицинского университета

Т. С. Угольник;

кандидат биологических наук,
доцент кафедры нормальной физиологии
Гомельского государственного медицинского университета

Э. М. Заико

Грицук, А. И.

Г 85 Биохимия ротовой жидкости: учеб.-метод. пособие для студентов 2 курса медицинских вузов медико-диагностического и лечебного факультетов / А. И. Грицук, В. Т. Свергун, А. Н. Коваль. — 2-е изд., перераб. и доп. — Гомель: учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2011. — 40 с.

ISBN 978-985-506-365-1

В учебно-методическом пособии отражены химический состав и особенности секретиции слюны, а также принципы лабораторной диагностики. Предназначено для студентов 2 курса медико-диагностического и лечебного факультетов.

Первое издание вышло в 2008 году. Второе издание переработано и дополнено.

Утверждено и рекомендовано к изданию Центральным учебным научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» 28 июня 2011 г., протокол № 7.

УДК 577.1:616.316-008.8(072)

ББК 52.57

ISBN 978-985-506-365-1

© Учреждение образования
«Гомельский государственный
медицинский университет», 2008
© Учреждение образования
«Гомельский государственный
медицинский университет», 2011

1. МЕХАНИЗМ СЕКРЕЦИИ СЛЮНЫ. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ФОРМИРОВАНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА СЛЮНЫ

Слюна (saliva) как предмет лабораторной диагностики является альтернативой анализу крови. Простота взятия, возможность частого забора проб слюны и, главное, полная безопасность для пациента. Последнее обстоятельство представляется важным, ввиду роста случаев наркомании, инфицирования через кровь ВИЧ и другими опасными инфекциями.

Saliva представляет интерес для изучения фармакокинетики лекарственных препаратов, наркотиков, влияния физической и умственной нагрузок на эндокринную систему.

Номенклатура слюны.

Смешанная слюна — биологическая жидкость, формирующаяся в ротовой полости в результате смешивания выделений всех слюнных желез:

- **слюны околоушных желез;**
- **слюны подчелюстных желез;**
- **слюны подъязычных желез;**
- **слюны малых слюнных желез.**

Околоушные и малые железы боковых поверхностей языка содержат большое количество серозных клеток и секретируют жидкую слюну с высокой концентрацией хлоридов натрия, калия и высокой активностью амилазы. Слюна поднижнечелюстных желез богата органическими веществами, содержит муцин, амилазу, но в меньшем количестве, чем слюна околоушных желез. Слюна подъязычной железы (смешанная) еще более богата муцином, имеет выраженную щелочную реакцию и высокую фосфатазную активность.

Секрет слизистых желез, расположенных в корне языка и неба, особенно вязкий, ввиду высокой концентрации муцина.

Из ацинусов желез секрет поступает в систему укрупняющихся протоков, собирающихся в выводной проток, выносящий несколько измененную здесь (в количестве и составе) слюну в полость рта. Вне приема пищи у человека слюна выделяется для увлажнения полости рта в среднем со скоростью 0,24 мл/мин, при жевании — со скоростью 3–3,5 мл/мин в зависимости от вида пищи.

Количество слюны, выделяющееся за сутки, зависит от особенностей питания. За сутки у взрослого человека выделяется около 1500–2000 мл слюны. Она содержит 99,0–99,5 % воды и только 0,5–1 % сухого остатка. Смешанная слюна имеет плотность 1,001–1,017, вязкость — 1,10–1,32 пуаза. Состав слюны зависит от скорости ее секреции и вида стимуляции саливации. Смешанная слюна имеет pH 5,8–7,4. pH слюны околоушных желез ниже (5,8) чем поднижнечелюстных (6,39). С увеличением скорости

секреции рН повышается до 7,8. Количество слюны, выделяющееся за сутки, зависит от особенностей пищи.

Нестимулированной слюной называется слюна, которая формируется при отсутствии внешних, активирующих ее образование, факторов. Скорость ее секреции в среднем 0,3 мл/мин, и зависит от суточных и сезонных колебаний. Пик нестимулированной секреции — середина дня, а в ночное время секреция снижается до 0,1 мл/мин.

Стимулированная слюна выделяется под действием внешних, искусственных механических и (или) химических факторов. Скорость ее секреции колеблется в пределах 0,8–7 мл/мин.

Слюнные железы человека представлены парными крупными и непарными мелкими железами. К 1-й группе относят: околоушные (*gl. arotis*), подчелюстные (*gl. submaxillares*) и подъязычные железы (*gl. sublingule*). Ко 2-й группе относят: мелкие железки, расположенные на слизистой оболочке губ, языка, десен, неба, щек, миндалин и носоглотки.

Большие слюнные железы развиваются у человеческого эмбриона с 6–8-й недели из оральной эктодермы. Затем происходит развитие малых слюнных желез. В течение этого формирования симпатическая нервная система регулирует дифференцирование, а парасимпатическая — общий рост желез (Silver).

Нервная регуляция больших слюнных желез. Большие слюнные железы иннервируются симпатическими и парасимпатическими нервами.

Парасимпатическая регуляция подчелюстных и подъязычных желез начинается от нейронов верхнего слюноотделительного ядра в стволе головного мозга и транслируется в постганглионарные волокна подчелюстных и подъязычных нервных узлов, расположенных в теле каждой из соответствующих желез. Нижнее слюноотделительное ядро продолговатого мозга передает регуляторные импульсы к околоушным железам.

Симпатическая иннервация больших слюнных желез инициируется нейронами в боковых рогах спинного мозга на уровне ThII-ThVI.

Большинство малых слюнных желез получают парасимпатическую иннервацию от язычного нерва (*Lingual nerve*), исключая железки неба, парасимпатические волокна которых исходят из небных нервов (*Palatine nerves*), питаемых узлом *Sphenopalatine g.*

Считается, что в регуляции работы слюнных желез большую роль играет парасимпатическая иннервация, так как каждая их клетка богато оплетена парасимпатическими волокнами. Предполагается, что несколько парасимпатических волокон конвергирует на одну клетку. Раздражение парасимпатических волокон ведет к образованию в синапсах ацетилхолина, который возбуждает работу железистых клеток.

Симпатические волокна стимулируют образование адренергических нейрорегуляторов — адреналина и норадреналина. При симпатической секреции количество выделяемой слюны значительно меньше, чем при раздражении па-

расимпатических нервов. Заключительным этапом в нервной регуляции формирования слюны является ассоциация нейротрансмиттерных молекул — ацетилхолина и норадреналина из симпатических окончаний нервных волокон с белками (мускариновым, холинергическим и альфа- и бета-адренергическими рецепторами) плазматической мембраны секреторных клеток. Последние содержат GTP (гуанидинтрифосфат), связывающие мессенджеры, которые передают регуляторные сигналы на определенные ферментативные системы. Ферменты контролируют протекание реакций синтеза и секреции различных веществ в секреторных клетках слюнных желез. Отдельные звенья этих внутриклеточных сигнальных путей изучены недостаточно.

Стимуляция симпатического ствола на шее, не оказывая влияния на околоушную железу, вызывает секрецию в подчелюстной железе.

Гуморальная регуляция. Функциональная взаимосвязь слюнных желез с основными эндокринными железами установлена в экспериментальных и клинических исследованиях. Это показано в отношении гормонов гипофиза, поджелудочной железы, надпочечников, половых желез, гастроинтестинальных гормонов. Одной из причин такой связи является наличие в слюне многих гормонов. Синтез и секреция многих белковых компонентов слюны находится под контролем различных веществ крови.

Литературные данные указывают не только на содержание в слюне половых гормонов и гормонов щитовидной железы, но и на присутствие факторов роста нервов, эпидермиса, ренина, танина. До сих пор остается малоизученным вопрос о регуляции функций слюнных желез через гематосаливарный барьер.

2. БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ

Концентрация белков в слюне на момент исследования в значительной степени зависит от:

- 1) выбора метода анализа (железы как источника слюны, характера стимуляции);
- 2) циркадных ритмов, стресса, воспаления, инфекции, месячных, беременности, при которых возникают кратковременные изменения;
- 3) временных факторов (старение, системные болезни, последствия медикаментозного лечения);
- 4) популяционных особенностей (наследственность, специфика белок-микробных взаимодействий, наконец, белковый полиморфизм, а также синергично-антагонистические взаимоотношения белков).

Относительная концентрация основных белков в слюне околоушных желез сильно варьирует у различных людей, но остается постоянной для конкретного индивидуума, что указывает на физиологическую стабильность этой биологической жидкости. Состав белков почти не зависит от

пищевых эффектов и циркадных ритмов. Известно, что содержание субстанции Р и бета-эндорфинов значительно выше в утренние часы, чем вечером, при однонаправленной корреляции обоих нейропептидов.

Среднесуточный объем выделяемой у человека слюны составляет 1–1,5 литра слюны, основная часть которой секретируется во время приема пищи. Выделения малых слюнных желез составляют 7–8 % от всего производимого объема слюны.

Свыше 90 % всей массы слюнного секрета приходится на воду. Большую часть органических соединений смешанной слюны продуцируют железистые клетки, меньшую часть синтезируют клетки протоков слюнных желез, некоторые вещества переносятся в слюну из крови.

В формировании биохимического состава смешанной слюны участвуют белки, липиды — ХС (холестерин), эфиры ХС, СЖК (свободные жирные кислоты), глицерофосфолипиды, стероидные соединения (гормоны), углеводы (олигосахаридные компоненты муцинов, ГАГ (гликозаминогликаны), ди- и моносахариды), небелковые азотсодержащие вещества (мочевина, мочевая кислота, креатин, аммиак, свободные аминокислоты), витамины, циклические нуклеотиды и другие соединения.

Секреция многих белков слюны (факторы роста, гистатины, статерины, ренин и др.) регулируется нервной системой.

Из ацинусов желез секрет поступает в систему укрупняющихся протоков, собирающихся в выводной проток, выносящий несколько измененную здесь (в количестве и составе) слюну в полость рта. Вне приема пищи у человека слюна выделяется для увлажнения полости рта в среднем со скоростью 0,24 мл/мин, при жевании — со скоростью 3–3,5 мл/мин в зависимости от вида пищи.

Количество слюны, выделяющееся за сутки, зависит от особенностей пищи. За сутки у взрослого человека выделяется около 1500–2000 мл слюны. Она содержит 99,0–99,5 % воды и только 0,5–1 % сухого остатка. рН слюны близок к нейтральному (6,8–7,4). Слюна, находящаяся в полости рта (*смешанная или ротовая жидкость*), содержит секрет больших и малых слюнных желез, слущенный эпителий, лейкоциты, бактерии и продукты их обмена. Смешанная слюна очень отличается по биохимическим параметрам от слюны из протоков слюнных желез (собственно слюна).

В полости рта смешанная слюна выполняет несколько *функций*:

1. *Защитная* — слюна увлажняет и очищает ткани ротовой полости, поддерживает видовой состав микрофлоры полости рта, формирует пелликулу зубов, предотвращает осаждение из слюны перенасыщенного раствора фосфата кальция.

2. *Пищеварительная* — слюна смачивает пищу, обволакивает пищевые частицы муцином, облегчает проглатывание, вызывает растворение солей, сахаров, расщепление поли и олигосахаридов.

3. *Регуляторная* — регулирует образование пищеварительных соков и ЖКТ, выделение гормоноидов и гормонов, регулирующих процессы мине-

рализации эмали зуба и поддержание гомеостаза полости рта (содержит паротин, эритропоэтин, фактор роста нервов, фактор роста эпителия и др).

4. *Минерализационная* — участвует в формировании аппатитов эмали.

5. *Выделительная*. Со слюной выделяются низкомолекулярные азотсодержащие соединения (мочевина и др.), катионы и анионы, метаболиты гормонов и лекарств и др.

6. *Иммунная функция слюны*.

7. *Гормональная функция*.

8. *Очищающая функция*.

Смешанная слюна содержит органические и неорганические компоненты (таблица 1).

Таблица 1 — Биохимический состав ротовой жидкости

Компонент	Единицы измерения
Плотные вещества	1,4–1,5 %
Органические вещества	1 %
Осадок	70 мг/л
Секреция	0,4 мл/мин
Хлориды	2,5–3,0 г/л
Ионы кальция	40–50 мг/л
Фосфаты	190–200 мг/л
Фтор	0,06–1,8 мг/л
Остаточный азот	100–200 мг/л
pH	6,4–7,3
Белок	2–3 г/л
Фракции белков (электрофорез) в %:	
— альбумины;	7–8
— α-глобулины;	11–12
— β-глобулины;	45
— γ-глобулины;	18
— лизоцим	18–20
Молочная кислота	33 мг/л
Пировиноградная кислота	9 мг/л
Муцин	3 г/л
Углеводы гликопротеинов:	
— гексозамины;	100 мг/л
— фукоза;	90 мг/л
— нейраминовая кислота;	12 мг/л
— общие гексозы	195 мг/л
Глюкоза	10–100 мг/л
Амилаза	380 мг/л
Имуноглобулин А	190 мг/л
Имуноглобулин G	14 мг/л
Имуноглобулин М	2 мг/л
Мочевина	200 мг/л
Холестерол	80 мг/л

В ней присутствуют многие макро- и микроэлементы. Главной особенностью этой жидкости является высокое содержание неорганического фосфата и кальция, что связано с ее минерализующей функцией. Как видно из таблицы 1, ротовая жидкость содержит большое число молекул разной природы. Общее количество плотных веществ в смешанной слюне составляет 3–8 г/л, в среднем 6 г/л. Из этого количества на долю растворенных веществ приходится 80 %, а на долю суспендированных веществ — около 20 %. Функции большинства молекул достаточно хорошо известны. Белки составляют значительную часть сухого остатка ротовой жидкости и выполняют важные функции, связанные с защитой, процессами минерализации и участием в пищеварении.

Исследование белкового спектра слюны в диапазоне молекулярных сит от 20 до 200 кДа обнаруживает 30–40 различных белковых фракций. Индивидуальные особенности выражаются в разном уровне концентраций отдельных белков, а не в их количестве. В смешанной слюне определяется активность более ста ферментов, различных по происхождению и выполнению биологических функций (таблица 2).

Таблица 2 — Некоторые ферменты слюны

Фермент	Железы — источник фермента	Микроорганизмы — источник фермента	Лейкоциты — источник фермента	Биологическое действие
Альфа-амилаза	+	0	0	Пищеварительное Защитное
Мальтаза	0	+	+	Пищеварительное
Сахараза	0	+	+	Пищеварительное
Гиалуронидаза	0	+	0	Повреждающее
Лизоцим	+	0	+	Защитное
Кислая фосфатаза	+	+	+	Деминерализующее
Щелочная фосфатаза	+	+	+	Минерализующее
Липаза	+	+	+	Пищеварительное
Протеиназы	0	+	+	Повреждающее
Пептидазы	0	+	+	Повреждающее
Уреаза	0	+	0	Защелачивающее
Каталаза	0	+	0	Защитное
Лактопероксидаза	+	0	+	Защитное
Миелопероксидаза	0	0	+	Защитное
Гексокиназа	0	+	0	Утилизация микроорганизменных сахаров с образованием органических кислот
Альдолаза	+	+	+	
Лактатдегидрогеназа	0	+	+	

Ведущую роль среди защитных факторов слюны играют ферменты различного происхождения: лизоцим, нуклеазы, пероксидаза. В меньшей мере это относится к амилазе — основному ферменту слюны и ротовой жидкости, участвующему в процессах пищеварения.

Бактерицидное действие лизоцима основано на том, что он катализирует гидролиз β -гликозидной связи (1 \rightarrow 4) между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой в полисахаридах клеточной оболочки микроорганизмов. Поэтому наиболее чувствительны к нему грамположительные микроорганизмы и некоторые вирусы. У «безмикробных» животных количество лизоцима значительно меньше, чем у обычных, что показывает роль микрофлоры в стимуляции синтеза лизоцима. Образование лизоцима снижается при некоторых заболеваниях полости рта (стоматиты, гингивиты, парадонтоз).

Содержание воды в слюне составляет 98–99 % от всего состава компонентов.

Важную роль в осуществлении защитной функции ротовой жидкости имеют нуклеазы. В смешанной слюне обнаружены РНК-азы и ДНК-азы, отличающиеся разными свойствами. В зависимости от требований к рН среде выделяют кислую и щелочную РНК-азу. За сутки в полость рта секретруется примерно 60 мкг кислой и 45 мкг щелочной РНК-азы.

ДНК-аза слюны представлена также 2 изоферментами. За сутки секретруется примерно 3–4 мкг фермента. При некоторых воспалительных заболеваниях ротовой полости секреция его увеличивается. Основным источником нуклеаз в слюне являются клетки белой крови. В экспериментах показано, что эти ферменты резко замедляют рост и размножение многих микроорганизмов в ротовой полости.

Еще одним ферментом, участвующим в защитной функции ротовой жидкости, является пероксидаза. Различают собственно пероксидазу и йодидпероксидазу. Первый фермент синтезируется полиморфноядерными лейкоцитами (миелопероксидаза), паренхиматозными клетками молочных желез (лактопероксидаза) и слюнных желез. Второй фермент обнаружен в щитовидной железе и слюнных железах. По механизму действия они схожи и отличаются лишь субстратной специфичностью. В секрете околоушной железы активность фермента в 3 раза выше, чем в подчелюстной.

Обязательным условием действия фермента является присутствие перекиси водорода, поэтому продуцирующие ее микроорганизмы более чувствительны к действию пероксидазы слюны. Повреждающее действие системы «пероксидаза — перекись водорода» на микроорганизмы опосредуется образованием промежуточных окислителей органической и неорганической природы. Прежде всего, необходимо участие одного из анионов: CNS^- , Cl^- , I^- , Br^- . Эти анионы взаимозаменяемы, но для пероксидазы слюны более специфичен CNS^- , а для лейкоцитарной — Cl^- . Результатом взаимодействия системы пероксидаза - H_2O_2 - Cl^- (пероксидаза-перекись водорода-анион хлора) является образование HOCl . Объектом действия последнего являются аминокислоты белков микроорганизмов. Они превращаются в активные альдегиды или другие токсические продукты.

Поэтому способность слюнных желез секретировать в значительных количествах ионы тиоцианата, йодиды, бромиды, хлориды следует также

отнести к антимикробной функции. При совместном действии всех указанных ферментов возникает взаимоусиливающий эффект.

Активность ряда ферментов в слюне крайне низка (протеинкиназы, гликозидаза и др.). Это объясняется тем, что они находятся в комплексе с белками — ингибиторами. Так, в слюне определяется альфа-1 ингибитор протеиназ (альфа-1-антитрипсин), альфа-2-макроглобулин, низкомолекулярные кислотостабильные ингибиторы трипсиноподобных протеиназ (цистатины, S, SA, SN), антилейкопротеиназа и, возможно, другие. Повышение активности протеиназ, освобождение их из комплексов с ингибиторами способствует развитию воспаления пародонта.

Слюна содержит также витамины, гормоны, нитраты, нитриты, роданиды (тиоционаты) и другие соединения. В осадке слюны содержится в 2–4 раза больше лактата, чем в жидкой ее части, а пируват больше определяется в жидкой ее части. Увеличение содержания органических кислот, в частности лактата в слюне, зубном налете способствует очаговой деминерализации и развитию кариеса. С пищей, табачным дымом, водой в слюну поступают нитраты и нитриты. Нитриты при участии нитратредуктазы бактерий превращаются в нитриты, которые, в свою очередь, способны вступать в реакцию со вторичными аминами (аминокислоты, лекарства) с образованием канцерогенных нитрозосоединений, или превращаются в аммиак.

Тиоционаты (SCN-, роданиды) поступают в слюну из сыворотки крови и образуются при участии роданезы из синильной кислоты. В слюне они окисляются до гипотиоционатов и других производных, которые совместно с лактопероксидазой участвуют в защитных реакциях слюны. К факторам местной защиты относят также иммуноглобулины: IgA, IgG, IgM, муцин, ингибиторы протеиназ и бета-глюкуронидаза, лизоцим, РНК-аза, ДНК-аза, амилаза, а также мигрирующие через слизистую оболочку полости рта лейкоциты. В течение суток состав слюны может колебаться, и зависит от приема пищи, состояния организма, в частности, от зубочелюстной системы. Во время сна слюноотделение снижается в десятки раз.

3. ФУНКЦИИ БЕЛКОВ СЛЮНЫ

Белки ротовой жидкости по их функциональным свойствам делят на белки, участвующие в пищеварении, белки, выполняющие антибактериальные, антигрибковые, противовирусные свойства, белки, проявляющие буферные свойства, выполняющие регуляторные функции, белки, оказывающие минерализующее действие (рисунок 1).



Рисунок 1 — Функции белков ротовой жидкости*

* Олецкий, Э. И. Биохимия соединительной ткани и органов полости рта / Э. И. Олецкий, А. Д. Таганович, В. К. Кухта. — Мн.: БГМУ, 2002. — С. 45–53.

Белки, участвующие в пищеварительных реакциях

Это семейство представлено гидролитическими ферментами, основными из которых являются амилаза, мальтаза, гиалуронидаза, трипсиноподобные ферменты, пепсиноген, пептидазы, эстеразы, липазы, нуклеазы, пероксидазы, кислая и щелочная фосфатазы, лактопероксидаза и т. д. Часть этих ферментов секретируется слюнными железами (амилаза, лактопероксидаза), ряд других, поступающих из крови (пепсиноген) имеет «смешанное» происхождение (кислая и щелочная фосфатазы), а некоторые являются продуктами метаболизма лейкоцитов или микробов (мальтаза, альдолаза).

Белковые факторы местного иммунитета

Секреторные иммуноглобулины представлены в основном иммуноглобулином А и в меньшей степени IgG, IgM и IgE.

Свойства иммуноглобулинов: нарушают бактериальную адгезию, поддерживают *специфический* иммунитет против патогенных бактерий полости рта.

Структура: **IgA** — 170–720 тыс. Да (содержание углеводов 7–12 %), **IgG** — 150 тыс. (содержание углеводов — 2–3 %), **IgE** — 190 тыс. Да (содержание углеводов — 10–12 %), **IgM** — 950 тыс. (содержание углеводов — 1–12 %).

В организме человека обнаружены в разных жидкостях.

Амилаза. Локализация гена: 1p21.

Свойства: металлоэнзим из группы гидролаз, расщепляет альфа-1-4 гликозидные связи гомополисахаридов до мальтозы и небольших олигосахаридов. Удаляет осадки пищи с поверхности зубов. Подавляет активность некоторых микроорганизмов. Составляет до 10 % всех белков слюны. 70 % фермента выделяется в ротовую полость околоушными железами.

Лизоцим Локализация гена: Chr.12.

Свойства: фермент гидролизует 1,4 бета связи между N-ацетил-D-глюкозамин и N-ацетилмурамовой кислотой в пептидгликановых гетерополимерах прокариотических клеток (полисахариды микробной оболочки). Кроме антибактериальных свойств фермент стимулирует неспецифическую реактивность организма, оказывая противовоспалительное действие. Самую высокую чувствительность проявляют к лизоциму некоторые вирусы и грамположительные микроорганизмы. При стоматитах, гингивитах и пародонтозе синтез лизоцима снижен. В организме человека обнаружен в разных тканях (легких, печени, селезенке).

Лактоферрин: Локализация гена: 3q21-q23.

Источником лактоферрина в ротовой жидкости являются слюнные железы. Лактоферрин синтезируется эпителиальными клетками протоков слюнных желез. Со смешанной слюной в ротовую полость поступает примерно 5,2 мкг лактоферрина в мин. Еще одним источником лизоцима являются нейтрофилы. Они поступают в ротовую полость со скоростью, примерно, 200 тыс. клеток в мин. Исходя из содержания лизоцима в нейтрофилах, можно подсчитать и скорость поступления его в ротовую полость с этими клетками. Она составляет около 1 мкг в мин.

Свойства: гликопротеин, переносящий ионы железа, которое используется в делящихся клетках для синтеза рибонуклеотидредуктазы. Этот фермент катализирует 1-й шаг, приводящий к синтезу ДНК.

Лактоферрин наряду с трансферрином относится к семейству железосвязывающих белков, модулирующих метаболизм железа, гемопоэз и иммунологические реакции. Оказывает мощное бактерицидное и бактериостатическое действие на целый ряд микроорганизмов, выступает как хелатор металла и связывает железо, необходимое для размножения бактерий. Надо отметить, что некоторые бактерии усваивают и такое, связанное с лактоферрином, железо.

Лактоферрин способствует удержанию нейтрофилов в воспалительном очаге. Защищает нейтрофилы от ПОЛ. Регулирует поглощение железа в кишечнике.

В организме человека продуцируется клетками железистого эпителия и костного мозга.

Гистатин. Локализация гена: 4q13.

Свойства: Участвует в формировании специальной белковой пленки на зубах, которая защищает от агрессивных факторов. Представляет собой обогащенный гистидином фосфобелок. Проявляет антибактериальную активность в отношении *Candida albicans* и *Streptococcus mutans*.

В организме человека обнаружен в секретах подчелюстных и околоушных желез. Обнаружены типы гистатинов — 1, 3, и 5.

Статерин. Локализация гена: 4q11-q13.

Свойства: связывает кальций и препятствует росту кристаллов в ротовой полости. В организме человека обнаружен в слюне.

Цистатины: D, S, SN, SA, A, B. Локализация гена: 20p.11.2.

Свойства: подавляют активность цистеиновых протеаз бактерий, могут играть защитную роль при воспалительных процессах в ротовой полости. Существует 3 семейства цистатинов, различных по строению.

Муцины. Локализация гена 4q13-q21.

Свойства: гликопротеины, содержащие, преимущественно, O-связанные гликаны. Вязкий слизистый гель, главной составной частью которого являются муцины, покрывает большинство эпителиальных поверхностей и служит селективным барьером между плазматической мембраной и окружением клетки. Могут выводиться из организма вместе с чужеродными веществами, очищая таким образом слизистые.

Муцины переводят воду в вязкую субстанцию, которая защищает от бактериального загрязнения и растворения фосфата кальция. Муцины запускают специфическое взаимодействие между стенкой бактериальных клеток и комплементарными галактозидными рецепторами на мембране эпителиальных клеток. Муцинам присущ генетический полиморфизм, который типичен для генов, содержащих повторяющиеся элементы.

Фибронектин. Локализация гена: 2q34.

Свойства: гликопротеин, принимает участие в свзывании бактериальных клеток, блокируя их активность. Вовлечен в процессы взаимодействия гемопозитических клеток.

В организме человека обнаружен в разных тканях и жидкостях.

Микроглобулин. Локализация гена: 15q21-q22.

Свойства: функция не известна, предполагается его участие в связывании бактериальных клеток и блокада их активности. В организме человека обнаружен в разных жидкостях.

Биологически активные вещества

Регулируют функции кровеносной, кроветворной, нервной и других систем организма. Среди них:

Калликреины. Локализация гена: 19q13.q.13.4.

Свойства: кислые гликопротеины, вовлечены в поддержание АД, развитие гипертонии, репродуктивную функцию, воспалительные реакции и многие другие процессы адаптации и защиты. Калликреинкининовая система (ККС) является ключевой протеолитической системой, участвующей в регуляции широкого спектра физиологических функций организма и развития многих патологических состояний.

Роль ККС не ограничивается участием вместе с ренин-ангиотензиновой системой в регуляции АД, но проявляется в морфогенезе клеток, тонусе гладкой мускулатуры некоторых органов, увеличении проницаемости сосудистой стенки, в т. ч. гематоэнцефалического барьера, развитии воспаления, трансформации клеток и других физиологических и патологических процессов.

Хорошо изучена центральная роль ККС в регуляции активности каскадных протеолитических систем крови: кининогенеза, гемокоагуляции, фибринолиза, комплемента и ренин-ангиотензиновой системы, обеспечивающих процессы адаптации и защиты организма. ККС тканей контролирует различные стадии морфогенеза клеток некоторых тканей, реакции иммунного ответа, развитие воспаления, шока различной этиологии, тромбозов, геморрагий, злокачественных новообразований и других патологических состояний.

Калликреин в организме человека обнаружен в тканях с экзокринной функцией и их секретах, а также в эндотелии, миокардиоцитах, ЦНС и периферических нервах. Молекулы всех калликреинов имеют домены, представляющие собой фрагменты факторов роста. Поэтому особое внимание уделяется участию К в регуляции пролиферации клеток и развитию опухолевых процессов.

Ренин. Локализация гена: 01q32.

Свойства: гликопротеин, карбоксипептидаза из семейства аспартил-протеиназ (пепсин, химозин, лизосомальные катепсины), обладающий мощным сосудосуживающим действием и стимулирующий выделение альдостерона. В отличие от своих «родственников» очень специфичен к субстрату и активен при нейтральных рН. рI (точка ионизации) ренина 5,5, а оптимум рН для реакции с ангиотензином 5,0. Продуцируется юктагломерулярными клетками почек и относится к гормонам, поскольку секретруется этими клетками в кровь.

Пептиды группы ангиотензина участвуют в регуляции не только уровня АД и сопряженных процессов почечной фильтрации и водно-солевого обмена, но также и в репродуктивной функции, многих процессах генерализованного характера (стресс, алкогольная мотивация, агрессивное

поведение), процессах ноотропного ряда. Предполагается, что ренин является главным прессорным веществом слюны.

В организме человека обнаружен в разных жидкостях.

Тонин.

Свойства: принадлежит к тому же семейству сериновых протеиназ, что и тканевые калликреины и гамма субъединица фактора роста нервной ткани. Гидролизует большинство субстратов, расщепляемых трипсином.

В организме человека обнаружен в различных жидкостях.

Фактор роста нервов. Локализация гена бета-субъединицы: 1p13.1.

Свойства: полипептид, регулирующий рост и дифференцировку симпатических и определенных сенсорных нейронов. *В организме человека обнаружен* в разных тканях и жидкостях.

Нейролекин способствует выживанию двигательных и чувствительных спинальных нейронов, а также нейронов головного мозга (но не вегетативных нейронов).

Фактор роста эпидермиса (ФРЭ) является биорегулятором с широким спектром действия. ФРЭ стимулирует пролиферацию и кератинизацию эпителия, угнетение желудочной секреции. ФРЭ проявляет цитопротективное действие на слизистую оболочку желудка, препятствует образованию стрессовых язв. Его протективное действие связано с регулирующим влиянием на гипоталамус, надпочечники и половые железы.

Фактор роста мезодермы. Активно стимулирует рост клеток соединительной ткани.

Паротин способствует росту и развитию мезенхимы тканей (особенно костной и дентина зубов). Паротин способствует поступлению ионов кальция в эти ткани, активизирует обмен фосфора и натрия. Наряду с этим происходит улучшение белкового обмена в слюнных железах.

Эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor — EGF) — урогастрон. Локализация гена: 4q25.

Свойства: сильный митоген на культурах разных фибробластов. Участвует в поддержании гастроинтестинальной функции; обладает ранозаживляющей активностью. Физиологическая роль секретируемого и циркулирующего EGF до конца не ясна. Рецепторы к EGF найдены во многих тканях.

В организме человека обнаружен в крови, моче, цереброспинальной жидкости, молоке, слюне, желудочном и панкреатическом соке, пилорических железах желудка, железах 12-перстной кишки, почечных канальцах, передней доле гипофиза, поджелудочной железе.

Эритропоэтин. Локализация гена: 7q21.

Свойства: кислый гликопротеидный гормон, который обеспечивает контроль созревания эритроцитов. Выделение *эритропоэтина* в слюну контролируется адренергическими механизмами. *В организме человека обнаружен* в слюне и плазме.

Белковые факторы слюны, влияющие на гемопоэз. Тимоцит-трансформирующие и колониестимулирующие факторы

Тимоциттрансформирующий фактор ингибирует вилочковую железу, вызывает лизис и агглютинацию малых лимфоцитов.

Колониестимулирующий фактор активирует образование колоний клетками костного мозга *in vitro*.

Фактор гранулоцитоза повышает содержание циркулирующих лейкоцитов.

Литературные данные указывают на то, что в слюне человека обнаружен и фактор летальности, синтез и активность которого находятся в прямой зависимости от содержания тестостерона.

В слюне содержатся **нейрогормоны**: *метеонинэнкефалин*, *субстанция Р*, *бета-эндорфины*. Уровень субстанции **Р** в слюне в 100 раз выше, чем в плазме. Эти данные были получены с помощью иммуноферментного анализа. Метеонин — энкефалин находится в концентрации 6,6–11,7 фмоль/мл, субстанция **Р** от 6,1 до 12,6 фмоль/мл, бета-эндорфин от 1,2–3,6 фмоль/л. *Метеонин-энкефалин* и субстанция **Р** обнаружены в паротидной слюне, тогда как *эндорфин* в любой.

Относительная концентрация основных белков в паротидной слюне сильно варьирует у обследуемых людей, но при этом в значительной степени остается постоянной для конкретного индивидуума. Это указывает на физиологическую стабильность слюны. Состав белков слюны фактически не зависит от пищевых эффектов и циркадных ритмов. Содержание низкомолекулярных компонентов, таких как субстанция **Р** и бета-эндорфина значительно выше утром, чем вечером. Изменения концентрации обоих нейропептидов коррелирует друг с другом, что указывает на общий механизм регуляции.

Ротовая жидкость содержит также белки с мало изученной функцией, *белки, богатые пролином* (рисунок 2). Эта группа тормозит рост кристаллов в слюне, пересыщенной солями фосфата кальция. Пролин составляет от 16 до 33 % от всех аминокислот, входящих в состав белков слюны. Выделены 2 группы белков этого типа. В 1-ю группу входят кислые белки (концентрация — 80 мг/л) с одинаковой последовательностью на N-конце. Их объединяет также высокое содержание фосфорной кислоты. Имея большой заряд и некоторую асимметрию в распределении зарядов, эти белки могут тормозить рост кристаллов в слюне, пересыщенной фосфатами кальция. Если удалить фосфатные группы, связанные с серином, то способность ингибировать рост кристаллов исчезает. Из этих белков был выделен небольшой пептид (30 аминокислот), который тормозил рост кристаллов апатита, что дает надежду на возможное использование подобных молекул с лечебной целью. Кислые пролин-обогащенные белки имеют высокое сродство к гидроксиапатитам, ингибируют кристаллизацию кальций-фосфатных солей из растворов, перенасыщенных гидроксиапатитом, связывают ионы кальция и взаимодействуют с некоторыми бактериями при их адсорбции к гидроксиапатитам.

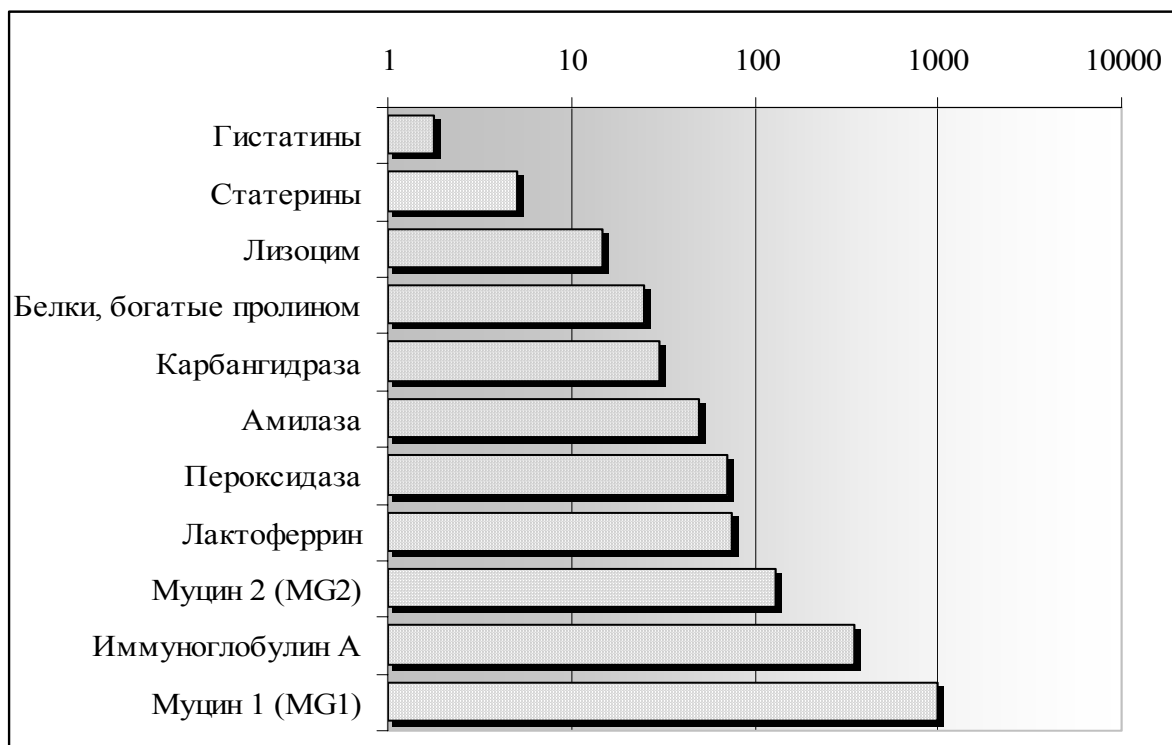


Рисунок 2 — Белки и ферменты ротовой жидкости*

* Олецкий, Э. И. Биохимия соединительной ткани и органов полости рта / Э. И. Олецкий, А. Д. Таганович, В. К. Кухта. — Мн.: БГМУ, 2002. — С. 46.

Статерины, гистатины и цистатины также проявляют средство к минеральным поверхностям, ингибируют выпадение в осадок кальций-фосфатных солей и играют роль в поддержании целостности зубов. Рост кристаллов ингибируется статеринами, которые проявляют свое действие, начиная с фазы нуклеации кристалла.

Это белки с молекулярной массой порядка 5 380 Да. Они содержат до 15 % пролина и 25 % кислых аминокислот, ассиметрично расположенных в пределах цепи.

Антимикробное действие в слюне проявляют гистатины и малые фосфопротеины. Цистатины ингибируют цистеиновые протеиназы и играют защитную роль при воспалительных реакциях в ротовой полости.

Ферменты слюны (таблица 2) имеют различное происхождение. Бактерицидное действие лизоцима определяется степенью гидролиза бета-гликозидной связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой в полисахаридах клеточной оболочки микроорганизмов. Самую высокую чувствительность проявляют к лизоциму некоторые вирусы и грамположительные микроорганизмы. При стоматитах, гингивитах и пародонтозе синтез лизоцима снижен. РНК-азы слюны высоко чувствительны к рН среде. Ежедневно в ротовую полость секретруется около 60 мкг кислой и 45 мкг щелочной РНК-азы. Секреция ДНК-азы в ротовую полость

увеличивается при некоторых воспалительных заболеваниях. Источником нуклеаз в слюне являются лейкоциты. Миелопероксидаза и лактопероксидаза имеют сходный механизм действия, но отличаются субстратной специфичностью (лактоферрин участвует в различных реакциях защиты организма и регуляции иммунитета). При повреждающем действии системы «пероксидаза-перекись водорода» необходимо участие какого-либо из анионов: CNS, Cl, I, Br. Для пероксидазы слюны более специфичен CNS анион, для лейкоцитарной — анион хлора. Образующаяся хлорноватистая кислота разрушает аминокислоты белков микроорганизмов, превращая их в активные формы альдегидов и других токсических веществ. Способность слюнных желез секретировать значительные количества ионов тиоционата, йодидов, бромидов, хлоридов оценивается как средство антимикробной защиты.

Минерализующая функция слюны. Эта функция слюны включает механизмы, способствующие поступлению минеральных веществ в эмаль и механизмы, препятствующие обратному их выходу. В нормальных условиях устанавливается подвижное равновесие между процессом растворения эмали и ее минерализацией. В физиологических условиях константа растворимости апатитов сдвинута в сторону образования кристаллов. Растворимость их зависит от концентрации ионов, рН слюны и ионной силы. Защита твердых тканей от растворения достигается благодаря поддержанию состояния пересыщенности ионами. Этому способствует определенная рН слюны. Буферные системы слюны поддерживают рН в пределах от 5,7 до 6,2. Однако при стимуляции секреции слюны ее рН может достигать 8,0. Снижение буферной емкости слюны может быть причиной развития кариеса.

Ведущую роль среди защитных факторов слюны играют ферменты различного происхождения — лизоцим, нуклеазы, пероксидаза. В меньшей мере это относится к амилазе — основному ферменту слюны и ротовой жидкости, участвующему в процессах пищеварения.

Важную роль в осуществлении защитной функции ротовой жидкости имеют нуклеазы. В смешанной слюне обнаружены РНК-азы и ДНК-азы, отличающиеся разными свойствами. В зависимости от требований к рН среде выделяют кислую и щелочную РНК-азу. За сутки в полость рта секретруется примерно 60 мкг кислой и 45 мкг щелочной РНК-азы.

В экспериментах установлено, что изоферменты ДНК-азы слюны резко замедляют рост и размножение многих микроорганизмов в ротовой полости.

Из слюны выделены видоспецифические антитела и антигены, соответствующие группам крови человека, причем концентрация групповых антигенов в слюне выше, чем в других биологических жидкостях. Вместе с тем, у каждого 5-го человека уровень этих антигенов в ротовой жидкости очень низок или они могут вовсе отсутствовать.

Среди белков слюны, причастных к выполнению защитной функции, следует назвать и иммуноглобулины. Они представлены, в основном, иммуноглобулином А, выполняющим важную роль в защите слизистых оболочек.

Несмотря на то, что при рассмотрении белков ротовой жидкости мы уже затрагивали участие некоторых из них в процессах кристаллизации, рассмотрим минерализующую функцию более подробно.

4. МИНЕРАЛИЗУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ СЛЮНЫ (РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ)

Эта функция слюны включает механизмы, способствующие поступлению минеральных веществ в эмаль и механизмы, препятствующие обратному их выходу. В зрелых зубах поддерживается подвижное равновесие 2-х процессов: растворение эмали и ее минерализация. Константа растворимости апатитов эмали в физиологически условиях сдвинута в сторону образования кристаллов. Растворимость их зависит от концентрации ионов, рН среды, ионной силы слюны.

Распределение кальция в слюне имеет свои особенности. Примерно 15 % всего кальция связано с белками, около 30 % — связано с цитратом, фосфатом, карбонатом (рисунок 3). Остальное количество — это свободный кальций, уровень которого и определяет, в первую очередь, направление процесса минерализация–растворение. Фосфаты слюны представлены пирофосфатами и солями ортофосфорной кислоты в разной степени замещения. Всего в слюне около 200 мг/л фосфатов. Из этого количества 146 мг — однозамещенный и 47 мг — двузамещенный фосфаты. Количество указанных солей зависит, главным образом, от секреции их слюнными железами, причем последние обладают избирательностью в секреции той или иной соли.

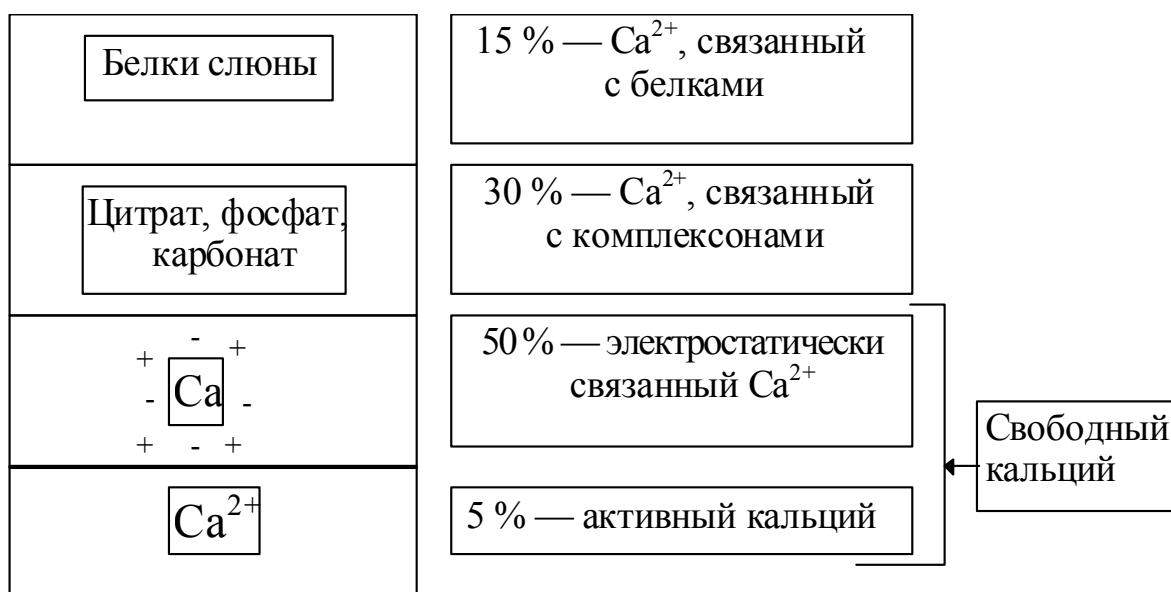


Рисунок 3 — Распределение кальция в ротовой жидкости*

* Олецкий, Э. И. Биохимия соединительной ткани и органов полости рта / Э. И. Олецкий, А. Д. Таганович, В. К. Кухта. — Мн.: БГМУ, 2002. — С. 50.

Вторым показателем, от которого зависит растворимость солей фосфата кальция, является рН слюны. Она колеблется от 6,5 до 7,5. Значительные изменения рН в слюне встречаются редко, даже у людей, склонных к кариесу. Однако в случае, если они происходят, резко изменяется состояние пересыщенности фосфатом кальция.

Следует заметить, что пересыщенность в слюне намного превышает таковую для фосфатов кальция в крови. В то же время, в крови, в отличие от слюны, концентрация водородных ионов высоко стабильна благодаря физиологическим и химическим системам регуляции кислотно-щелочного равновесия. В слюне емкость буферных систем небольшая.

Поэтому колебания рН слюны могут приводить или к значительному снижению ее минерализующей способности (закисление), или к усилению ее и образованию зубных камней.

Исследования других биологических жидкостей также показывают, что везде, где имеет место пересыщенность солями фосфата кальция (а она характерна для большинства биологических жидкостей) и значительные колебания рН (моча, желчь, слюна) возникает угроза локальной минерализации (камни).

На минерализующую функцию оказывает влияние и количество секретуемой слюны. Скорость слюноотделения колеблется в широких пределах: от 0,03 до 2,4 мл/мин и зависит от большого числа факторов. Например, в ночное время количество слюны уменьшается, что способствует проявлению действия так называемых кариесогенных факторов.

У людей с низкой секреторной активностью значительно чаще развивается кариес. Необходимо указать, что количество выделяемой слюны определяет очищающую способность в ротовой полости и, тем самым, вносит определенный вклад в проявление защитной функции. Поэтому снижение секреции всегда оказывает выраженный неблагоприятный эффект на состояние зубов и слизистой ротовой полости.

Десневая жидкость

Десневая жидкость — это жидкое содержимое десневого желобка. Представляет собой физиологическую среду сложного состава. В ней содержатся лейкоциты, эпителий, микроорганизмы, электролиты, белки, ферменты и т. д. За сутки в ротовую полость поступает 0,5–2,5 мл десневой жидкости.

В механизме образования десневой жидкости большое значение принадлежит морфологическим особенностям строения сосудов и эпителия десневого канала. Собственный слой слизистой желобка не имеет сосочков, и граница между эпителием и подлежащими тканями представлена ровной линией. Концевые сосуды в этой области расположены под эпителием и параллельно ему. Это создает удобные условия для трансудации содержимого капилляров в ротовую полость, включая даже некоторые белки крови. Показана возможность и обратного тока некоторых молекул из ротовой полости.

Таким образом, у людей со здоровым парадонтом десневая жидкость представляет собой транссудат сыворотки крови. Поэтому содержание минеральных веществ в десневой жидкости такое же, как и в плазме крови. Микробный состав десневой жидкости подобен таковому у зубного налета. Из десневой жидкости выделены многие ферменты, характерные для крови, эпителия слизистой. Важной особенностью является то, что через десневой желобок в ротовую полость поступают лейкоциты. Это основное место проникновения лейкоцитов в полость рта. Поэтому десневую жидкость следует рассматривать как важную часть антимикробной защиты. Механическое удаление частиц из десневого канала с помощью десневой жидкости предотвращает возможность образования камней в этой области.

При поражении парадонта десневая жидкость формируется за счет осмотической экссудации. В результате накопления продуктов метаболизма бактерий и компонентов зубного налета возникают воспалительные изменения, которые вызывают серьезные нарушения в ротовой полости. Кроме того, они могут служить причиной развития аутоиммунных процессов с последующим нарушением связочного аппарата зубов. Такие состояния обычно плохо поддаются лечению.

Зубной ликвор

С биологическими жидкостями ротовой полости тесно связан так называемый *зубной ликвор*. Это жидкость, заполняющая свободные пространства всех зубных тканей. Именно через нее в ткани зуба поступают необходимые питательные вещества. Состав зубного ликвора наиболее хорошо изучен на примере жидкости дентиновых канальцев, где она составляет до 12 % массы.

Установлено, что одонтобласты не причастны к происхождению этой жидкости. Она образуется экстрацеллюлярно и содержит до 92 мг/л кальция, 42 мг/л фосфатов, 28 мг/л хлоридов. Белковый состав ее подобен белкам плазмы крови. В ее состав входят и другие органические и неорганические молекулы. Продвигаясь со скоростью 4 мм/ч в сторону эмали, эта жидкость выполняет трофическую функцию. Изменение скорости и направления тока делает эту жидкость элементом сенсорной функции. Ощущение боли, чувство «оскомины» связаны с изменениями перемещения этой жидкости.

Менее изучен эмалевый ликвор. Кристаллы гидроксипатита создают в эмали эффект молекулярного сита, через которое в эмалевую жидкость проникают небольшие органические молекулы и ионы минеральных соединений. В поверхностных участках эмали жидкости меньше. С возрастом ее количество уменьшается. В отличие от воды гидратных оболочек кристаллов, эмалевая жидкость подвижна, и ее можно удалить, прогревая зубные ткани при относительно невысоких температурах.

Пелликула зуба. Если с поверхности эмали тщательно снять зубной налет, то останется тонкий слой органического материала, содержащего не-

большое количество бактерий. Этот слой называют пелликулой. Его можно выделить, если зубы быстро обработать соляной кислотой. Аминокислотный анализ позволил обнаружить в полученном материале низкое содержание цистеина и метионина. Это привело к заключению, что белки пелликулы не относятся к кератинам, продуцируемым эпителиальными клетками (в составе кератинов мало серы и большое количество серина). Следует заметить, что пересыщенность в слюне намного превышает таковую для фосфатов кальция в крови. В то же время, в крови, в отличие от слюны, концентрация водородных ионов высоко стабильна благодаря физиологическим и химическим системам регуляции кислотно-щелочного равновесия. В слюне емкость буферных систем небольшая, что отличает эти белки от коллагена.

Белки пелликулы скорее напоминают гликопротеины слюны, модифицированные бактериями ротовой полости путем отщепления нейраминной кислоты от олигосахаридных цепей.

Кислые фосфопротеины слюны, содержащие пролин, также входят в состав пелликулы. Возможность участия микроорганизмов в формировании пелликулы вытекает из того обстоятельства, что на срезе ее под электронным микроскопом, наряду с бесструктурным белком, выявляются фрагменты стенок бактерий. Это подтверждается и анализом аминокислотного состава пелликулы.

Зубной налет — это слой бактериальных клеток и органической матрицы, который откладывается на эмали поверх кутикулы. В отличие от пелликулы зубной налет обычно удаляется при чистке зубов. Матрикс зубного налета содержит денатурированные гликопротеины слюны и продукты жизнедеятельности бактерий. Последние представлены небольшими молекулами — конечными продуктами обмена. Такие соединения могут образовываться в больших количествах, но они легко растворяются и поэтому вымываются слюной, составляя небольшую часть налета. Зубной налет включает полимерные молекулы бактериальной природы. Это ферменты, полисахариды. Известны 3 типа таких полисахаридов: глюканы, леваны и гетерополисахариды. Их образование зависит от продуктов питания. Если исключить углеводы из рациона питания на одну неделю, то в матриксе налета полисахаридов не будет. Предшественником для синтеза этих полисахаридов является сахароза. Она же стимулирует образование ферментов, катализирующих синтез бактериальных полисахаридов. Таким образом, химический состав зубного налета зависит как от свойств бактерий, так и от состава пищи.

Зубной камень

Камни — это твердое образование на поверхности зубов. Они чаще возникают на поверхности зубного налета язычной стороны зуба, вблизи протоков слюнных желез. Полностью сформированный камень — это безжизненная субстанция. Будучи частично минерализованным, камень может содержать бактерии.

Механизм образования камней недостаточно понятен, однако известно, что этому способствует локальное повышение рН ротовой жидкости. Наиболее частой причиной повышения рН является действие уреазы, катализирующей гидролиз мочевины. Слюна выступает в качестве источника кальция и фосфора. На начальных этапах образования камней кристаллы апатита можно увидеть как снаружи, так и внутри бактерий. В составе камней можно обнаружить все типы кристаллов фосфорнокислых солей кальция. Часто камни являются причиной развития болезней парадонта.

Кариес

В основе развития кариеса лежит взаимодействие внутренних и внешних факторов. *Кариес зубов* — первичное заболевание зубов множественной этиологии. Только 2 % людей устойчивы к кариесу.

Первым проявлением кариеса является белый след на гладкой зубной поверхности. Он обусловлен оптическим эффектом увеличения рассеивания света эмалью из-за повышенной пористости зубов. Пористость вызывает кислота, проникающая в эмаль из зубной бляшки, которая примыкает к поверхности эмали. Процесс продолжается до достижения эмалево-дентинового контакта, а затем деминерализация идет в сторону пульпы и латерально, вокруг места повреждения. На этой стадии внешне эмаль кажется интактной, но по мере деминерализации на поверхности эмали возникает дефект, в который проникают микроорганизмы, продолжая свое разрушительное действие. Если процесс не приостановить, он достигает пульпы.

Дентин и пульпа, в отличие от эмали, имеют клетки, которые реагируют на повреждение. Ответ включает образование вторичного дентина, минерализацию дентиновых канальцев и воспаление пульпы. В результате патологический процесс может остановиться в своем развитии.

При рассмотрении срезов зубов толщиной 20–200 мкм в поляризационном микроскопе удастся проследить этапы развития кариозного процесса. На срезах можно увидеть несколько зон повреждения, которые отличаются пористостью, объемом пространств, доступных растворителям и молекулам разных размеров. При этом более удаленные участки от поверхности эмали сильнее повреждены, чем поверхностная зона, толщиной 20–40 нм.

Это связано, прежде всего, с тем, что поверхностная зона более устойчива к кислоте. Как уже отмечалось, она имеет меньше карбонатного апатита и больше фтора. Не менее важными являются физико-химические процессы, протекающие в этом слое эмали. Здесь идет активный противоток ионов кислоты (внутрь эмали) и ионов растворяющейся эмали (на поверхность), что ведет к обогащению поверхностного слоя ионами солей.

К ранним химическим изменениям в зоне повреждения относится потеря карбонатных ионов, ионов магния и кальция. Относительно возрастает количество фтора и органических веществ. Одновременно идет форми-

рование новых кристаллов типа *брушита*, что свидетельствует о разворачивающихся процессах реминерализации.

Одна из первых теорий кариеса была выдвинута в 1890 г. Миллером. Она известна под названием «химико-паразитическая» теория. С некоторыми дополнениями она доминирует и в настоящее время. Согласно этой теории, механизм развития кариеса состоит в том, что микроорганизмы на поверхности зубов продуцируют органические кислоты, в частности, молочную, которая растворяет минеральные компоненты зубов. Среди других точек зрения можно назвать протеолитическую теорию, согласно которой ферменты бактерий растворяют органическую матрицу зубов. Согласно другой теории, бактерии образуют хелаторы кальция, которые растворяют минеральные компоненты зубов.

Роль микроорганизмов. Основным источником молочной кислоты в ротовой полости считают лактобактерии — грамм (+) бактерии, продуцирующие молочную кислоту. Правда, образовывать молочную кислоту могут и другие микроорганизмы, но лактобактерии устойчивы к таким значениям рН, при которых другие микроорганизмы не растут. Возможно, поэтому их можно встретить в зубных бляшках, где имеются условия для их роста.

При проведении массовых исследований предрасположенности к кариесу используется тест подсчета числа лактобактерий в слюне. Если их число превышает 10 тыс. в 1 мл слюны, то это неблагоприятный признак. Однако не всякая бактерия кариесогенна. Для кариесогенных бактерий характерны следующие признаки:

- способность, используя углеводы, изменять рН до 4–5;
- способность синтезировать внутриклеточные запасы углеводов, чтобы использовать их при отсутствии углеводов в пище;
- способность синтезировать внеклеточные углеводы, обеспечивая тем самым прочное соединение клеток с зубной поверхностью.

Питание и пищевые продукты как причина кариеса

Наряду с тем, что правильное сбалансированное питание оказывает благоприятный эффект на развитие зубов и их обмен, продукты питания могут приводить к повреждению эмали. Это повреждающее действие может быть прямым или опосредованным, через влияние на развитие микрофлоры ротовой полости. К настоящему времени накоплено больше всего доказательств относительно патогенетической взаимосвязи углеводов пищи и кариеса.

К примеру, у эскимосов, питание которых состоит из мяса, рыбы и жиров, довольно редко встречается кариес. Переход их на «цивилизованную» диету приводит к увеличению повреждения зубов кариесом.

Существует параллель между распространением кариеса и количеством потребляемой сахарозы. Так, во время Второй мировой войны, когда количество потребляемой сахарозы уменьшилось — уменьшилось и пораже-

ние кариесом. С другой стороны, у больных с врожденной недостаточностью фруктозо-1-фосфат альдозы (поэтому они не могут потреблять сахар, вызывающий у них диспепсические явления) кариес встречается очень редко.

Как известно, в состав сахарозы входит остаток глюкозы и фруктозы. Именно эти продукты высвобождаются в ходе ферментативного гидролиза сахарозы в ротовой полости.

5. ДИАГНОСТИКА РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ

В настоящее время интерес к слюнной диагностике значительно возрос и это связано с ростом литературных данных о взаимосвязи функций слюнных желез со многими системами организма.

При *инфекционных заболеваниях* смешанная слюна используется для иммуноферментной диагностики *гепатитов А, В, и С*.

В настоящее время поставлен вопрос использования слюны для тестирования ВИЧ-инфекции.

Высокая чувствительность определения антител к **ВИЧ и генам ВИЧ** в слюне и моче, указывают на целесообразность проведения скрининг-анализа к ВИЧ-1 с целью оценки эпидемиологической обстановки. Установлено, что смешанная слюна людей, которые не входят в группы повышенного риска, содержит не идентифицированные пока что факторы, которые подавляют ВИЧ-инфекцию.

Рекомендуется использовать исследование специфического IgA в ротовой полости для диагностики вируса гриппа.

В 85 % случаев дает положительный результат определение в слюне специфических антител (класса IgM) при лептоспирозе.

В настоящее время проводятся скрининг исследования в *гастродуоденальной патологии*.

Показано, что в обеспечении гомеостаза креатинина при язвенной болезни желудка принимает участие гематосаливарный барьер, гомеостатирующая функция которого имеет особенности в зависимости от локализации язвенного дефекта в пределах гастродуоденальной слизистой оболочки. Установлено усиление агрессивности слюны в период обострения дуоденальной язвы. Показана роль изменений саливарного гомеостаза и возможность использования в диагностике индекса агрессии, как соотношение компонентов по принципу агрессия/защита. В качестве агрессивных факторов на слизистую оболочку органов гастродуоденальной зоны изучалось влияние гистамина, арахидоновой кислоты и алюминия, а в качестве защитных — действие серотонина, эйкозопентаеновой кислоты и цинка.

Изучение динамики ферментного спектра у больных *лейкозами* отражает процессы, происходящие как в целостном организме, так и в полости рта. Установлено, что специфические изменения активности щелочной и

кислой фосфатаз, а также альфа-амилазы в смешанной слюне у больных лейкозами находятся в прямой зависимости как от санации очагов хронического периодонтита и полости рта, так и проводимой полихимиотерапии.

Ротовая жидкость используется для исследования проблем *пищевой аллергии*. Иммунологические исследования показали, что у детей с аллергическими заболеваниями на фоне пищевой непереносимости наблюдается уменьшение концентрации иммуноглобулинов **A, G, M** и *лизоцима* в слюне, что указывает на снижение антибактериальной функции ротовой жидкости. Снижение иммуноглобулина **A** и его секреторного компонента (**S-IgA**) в ротовой жидкости отражает угнетение гуморального иммунитета.

В *онкологической практике* установлено значительное снижение активности лизоцима у пациентов с раком и предраком желудка, что позволяет более спешно формировать группы риска по этому заболеванию.

В литературных данных отмечается высокая корреляция альфа-фетопротеина в слюне и сыворотке, причем содержание этого белка выше в слюне. Иммуноферментный анализ альфа-фетопротеина используется для диагностики гепатоклеточной карциномы.

В экспериментах оценивался белковый спектр слюны при воздействии различных психоэмоциональных состояний. Для «нормальной» активности психики характерен условно невысокий («средний») уровень белка в полосах (на электрофореграмме), при этом фракция в области 55 кДа являлась наибольшей по объему.

При сниженном психоэмоциональном тоне, в случае депрессии или подавленного настроения белковый состав смешанной слюны (БССС) сильно обедняется фракциями.

В случаях сильного волнения или переживания в БССС могут практически исчезать фракции с молекулярной массой > 40 кДа, а ниже этой границы возникает размазывание белка в виде большого пятна.

В состоянии творческого подъема и возвышенного состояния БССС насыщен фракциями, и концентрация белков в некоторых из них (особенно 55 кДа) значительно превышает уровень белка в предыдущих трех случаях.

Изучение природы БССС с молекулярной массой в области 55 кДа показало, что в этот диапазон входят следующие белки: бета-1,4-галактозилтрансфераза, ингибиторы связывания стрептококка к гидрофобным поверхностям, амилаза и специфическая протеаза, гидролизующие высокомолекулярные гликопротеины. В этой же области был обнаружен еще один белок, который имеет высокую степень гомологии (75 %) с определенными участками первичной структуры белков, относящихся к семейству пролин, обогащенных белков слюны человека.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЙ

Лабораторные работы

Лабораторная работа 1. *Определение активности пероксидазы в слюне.*

Принцип метода. В присутствии перекиси водорода пероксидаза окисляет индигокармин, который при этом обесцвечивается.

Ход определения. В опытную и контрольную пробы вносят по 0,5 мл ацетатного буфера и добавляют 0,5 мл индигокармина. В опытную пробу добавляют 0,25 мл смешанной слюны. Помещают обе пробы в водяную баню при 30 °С на 5 мин. По окончании инкубации в опытную пробу вносят 0,25 мл раствора перекиси водорода, а в контрольную — 0,5 мл дистиллированной воды. Включают секундомер и останавливают реакцию через 2 мин после добавления в обе пробы по 1,5 мл 20 %-ного раствора серной кислоты. Пробы интенсивно встряхивают и колориметрируют в кюветах толщиной 1 см на фотоэлектроколориметре (λ 610 нм) против дистиллированной воды.

Активность пероксидазы рассчитывают по формуле 1:

$$A = (E_k - E_o) \times 1142,9, \quad (1)$$

где A — активность в мкмоль/мин на 1 литр; E_k — экстинкция контроля; E_o — экстинкция опыта; 1142,9 — расчетный коэффициент.

Лабораторная работа 2. *Количественное определение фосфатов в слюне.*

Принцип метода основан на реакции неорганического фосфора с молибденовой кислотой. При этом образуется комплекс, который при соответствующих условиях может восстанавливаться аскорбиновой кислотой. При этом появляется окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству неорганического фосфора, присутствующего в растворе.

Ход определения. К 0,1 мл слюны прибавляют 2,4 мл 5 % ТХУ для осаждения белка, перемешивают и центрифугируют 20 мин. Супернатант сливают и в нем проводят определение.

Пробу перемешать и инкубировать в термостате при 37 °С градусах в течение 20 мин. После охлаждения измерить оптическую плотность опыта и стандарта при 635 нм против контрольной пробы на ФЭКе.

При расчете используют формулу 2:

$$C = 0,05 \times \frac{E_{on}}{E_{cm}} \times 0,1, \quad (2)$$

где C — содержание фосфора в г/л; E_{on} — экстинкция опыта; 0,05 — мг/мл фосфора; E_{cm} — экстинкция стандарта.

Лабораторная работа 3. **Определение активности щелочной фосфатазы в слюне (по методу Bessey и др.).**

Принцип метода. Субстрат — паранитрофенилфосат гидролизуется в присутствии щелочной фосфатазы с образованием паранитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание.

Ход определения. В опытную и контрольную пробы вносят по 0,5 мл субстратно-буферной смеси. В опытную пробу приливают 0,1 мл слюны и обе пробы помещают на 30 мин в водяную баню при 37 °С. После окончания инкубации обе пробы переносят в ледяную баню и приливают по 5 мл 0,02 н. раствора NaOH, а в контрольную пробу еще добавляют 0,1 мл слюны. Интенсивность окрашивания пробы измеряют против контроля (длина волны 405 нм) на ФЭКе или спектрофотометре. Активность фермента рассчитывают по формуле 3:

$$A = E \times 101, \quad (3)$$

где А — активность фермента в мкмоль/мин на 1 л слюны; Е — оптическая плотность, 101 - коэффициент пересчета в мкмоль/л.

Лабораторная работа 4. **Определение рН слюны**

Принцип метода основан на изменении физико-химических свойств индикаторной бумаги под действием рН слюны.

Ход определения. Каплю слюны наносят на универсальную индикаторную полоску и немедленно сравнивают полученную окраску с соответствующей шкалой рН.

Лабораторная работа 5. **Качественные реакции на α -амилазу слюны.**

Принцип метод основан на расщеплении крахмала под действием α -амилазы слюны на отдельные фракции декстринов.

Ход определения. На предметное стекло нанести 1 каплю 0,5 %-ного раствора крахмала и 1 каплю слюны. Оставить при комнатной температуре на 5 мин и добавить 1 каплю раствора Люголя.

Лабораторная работа 6. **Качественное определение молочной кислоты в осадке слюны и надосадочной жидкости слюны.**

Принцип метода. При взаимодействии фенолята железа, имеющего фиолетовый цвет, с лактатом, образуется лактат железа желто-зеленого цвета.

Ход определения. Слюну (1,5 мл) отцентрифугировать при 3 тыс. об./мин в течение 15 мин. Слить надосадочную жидкость. Осадок растворить в 0,5 мл воды, проделать в обеих пробах реакцию Уффельмана. Для этого к 20 каплям 1 %-ного раствора фенола добавляют 2 капли 1 %-ного раствора хлорного железа. Получают фенолят железа, окрашенный в фиолетовый цвет. В

2 пробирки с фенолятом приливают полученный надосажок и растворенный осадок. Фиолетовая окраска переходит в желто-зеленую вследствие образования молочно-кислого железа.

Лабораторная работа 7. **Количественное определение лактата в слюне.**

Принцип метода. В присутствии серной кислоты лактат превращается в ацетальдегид.

Ход определения. К 0,2 мл слюны добавляют 2 мл 10 %-ного раствора ТХУ и центрифугируют 7 мин при 1500 об./мин. В другую пробирку отбирают 3 мл концентрированной серной кислоты и добавляют 0,5 мл центрифугата, а также 2 капли 12 %-ного раствора сульфата меди. Перемешивают и нагревают 5 мин в кипящей водяной бане. После охлаждения добавляют 1 каплю 1,5 %-ного раствора параоксидифенила и оставляют на 30 мин, периодически встряхивая. Помещают в кипящую водяную баню на 90 с. После охлаждения колориметрируют на ФЭКе против контроля, который вместо центрифугата содержит 0,5 мл ТХУ. Длина волны равна 582 нм.

Расчет содержания лактата проводят по формуле 4:

$$C = \frac{A}{0,045} \times 11,3, \quad (4)$$

где C — количество лактата в мкмоль на 1 л слюны; A — количество лактата в мг/мл, найденные по калибровочному графику; 0,045 — количество слюны в мл, внесенное в пробу.

Лабораторная работа 8. **Определение роданидов (тиоцианатов) в слюне.**

Принцип метода. Роданиды (SCN^-) в кислой среде образуют комплексное соединение красного цвета с трехвалентным железом.

Качественная реакция. К 5 каплям слюны добавляют 2 капли 2 %-ного раствора соляной кислоты и 2 капли 0,01 %-ного раствора хлорного железа. Развивается красное окрашивание.

Ход количественного определения роданидов. В центрифужную пробирку вносят 0,2 мл слюны, 1,3 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 20 %-ного раствора ТХУ, перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Стандартная проба содержит 2 мл (0,2 мг) раствора тиоцианата аммония и 1,5 мл раствора хлорного железа. Обе пробирки центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 мин. Далее центрифугат переносят в темную склянку, добавляют 1,5 мл 24 %-ного раствора хлорного железа, закрывают пробкой и колориметрируют против контроля, содержащего 2 мл дистиллированной воды и 1,5 мл раствора хлорного железа на ФЭКе при длине волны 540 нм. Расчет по формуле 5:

$$C = \frac{E_{on}}{E_{cm}} \times C_{cm} \times 0,2, \quad (5)$$

где C — содержание роданидов в мг/мл; $C_{ст}$ — концентрация тиоцианатов в стандартной пробе; E_o — экстинкция опыта; $E_{ст}$ — экстинкция стандарта; 0,2 — количество слюны.

Лабораторная работа 9. **Определение активности кислой фосфатазы.**

В десневой жидкости определяется активность ряда ферментов, но при воспалении пародонта наибольшим изменения подвержены лизосомальные гидролазы (катепсин D, кислая фосфатаза и др.).

Принцип метода. В кислой среде паранитрофенилфосфат гидролизуется ферментом — фосфатазой до паранитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание.

Ход определения. В опытную и контрольную пробу вносят по 0,5 мл субстратно-буферной смеси. В опытную пробу приливают 0,4 мл экстракта из полоски с десневой жидкостью (ДЖ), перемешивают и помещают обе пробы на 30 мин в водяную баню при 37 °С. По окончании инкубации пробы переносят в ледяную баню и приливают по 5 мл 0,1 н. раствора NaOH. В контрольную пробу добавляют 0,4 мл ДЖ. Интенсивность окраски опытной пробы измеряют против контроля при длине волны 405–410 нм. Для расчета используют калибровочный график, построенный с использованием различных количеств паранитрофенола.

Активность фермента рассчитывают по формуле 6:

$$A = \frac{C}{30} \times a, \quad (6)$$

где A — активность кислой фосфатазы в мкмоль/мин на мг белка; C — концентрация паранитрофенола, найденная по калибровочному графику; 30 — время инкубации в минутах; a — количество белка в мг в пробе, соответствующее 0,4 мл ДЖ.

Лабораторная работа 10. **Получение десневой жидкости.**

ДЖ получают путем введения в десневую щель стандартной полоски хроматографической бумаги. Высушивается поверхность зуба, он изолируется от попадания слюны, а затем в десневую щель в области верхних 3, 4, 5-го коренных зубов заостренным концом вводится полоска хроматографической бумаги на 1–5 мин. Полученные полоски с ДЖ пропитывают 0,02 %-ным спиртовым раствором нингидрина. Окрашенную в сине-фиолетовый цвет площадь, измеряют и рассчитывают ее в мм².

Лабораторная работа 11. **Определение количества нитритов в слюне.**

Принцип метода. В присутствии сульфаниловой кислоты и N-этилендиамина, нитриты образуют diaзосоединения красного цвета.

Ход определения. К 0,1 мл слюны в центрифужную пробирку приливают 2 мл дистиллированной воды, 0,5 мл сульфаниловой кислоты и 0,5 мл

0,05 %-ного N-этилендиамина. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а затем центрифугируют при 3 тыс. об./мин в течение 10 мин для осаждения белков. Оптическая плотность надосадочной жидкости определяется на ФЭКе при длине волны 540–550 нм против контроля, содержащего 2,1 мл воды, 0,5 мл сульфаниловой кислоты и 0,5 мл N-этилендиамина.

Расчет проводят по формуле 7:

$$C = E_{on} \times 711, \quad (7)$$

где C — концентрация мкмоль/л; E_{on} — экстинкция опытной пробы, 711 — коэффициент пересчета NO_2 .

Лабораторная работа 12. **Количественное определение хлоридов в слюне.**

Принцип метода. Хлориды экстрагируют 96 %-ным спиртом. Хлор оттитровывают нитратом серебра в присутствии бихромата калия. Хлористое серебро, как менее растворимое, в первую очередь выпадает в осадок. Следующая капля раствора азотнокислого серебра, введенная после выпадения всего хлора, реагирует с бихроматом калия, причем образуется AgCrO_4 коричневого цвета (конец реакции).

Ход реакции. В пробирку помещают 0,2 мл слюны и 2,0 мл спирта, хорошо перемешивают и оставляют на 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 3 тыс. об./мин в течение 15 мин. Сливают надосадок и добавляют к нему одну каплю 7 %-ного раствора бихромата калия, появляется желтое окрашивание. Затем раствор оттитровывают 0,01 н. раствором азотнокислого серебра из мерной пипетки на 1 мл по каплям до появления коричневой окраски.

Расчет проводят по формуле 8:

$$C = \frac{0,355 \cdot E}{0,2}, \quad (8)$$

где C — концентрация в г/л; $0,355$ — мг хлора соответствует 1 мл 0,01 н раствора азотнокислого серебра; E — количество 0,01 н. раствора азотнокислого серебра, израсходованное на титрование; $0,2$ — количество слюны в пробе.

Лабораторная работа 13. **Оценка всасывающей функции ЖКТ по показателям йодинометрии слюны.**

Принцип метода. Пероральное введение йодида калия с водой или в капсуле стимулирует слюнные железы выделять этот йод, что используется для оценки всасывающей функции ЖКТ.

Ход исследования. После тщательного ополаскивания полости рта у обследуемого берут пробу слюны в объеме 0,5–10 мл до и через 10 мин после приема внутрь йодида калия в дозе 0,06 мг на 1 кг массы тела в 5–10 мл воды с запиванием 100 мл дистиллированной воды. Йодинометрию про-

водят в микроячейке электролитического ключа. По величине электродного потенциала при помощи калибровочной кривой результаты выражают в единицах pI с последующим расчетом содержания ионов йода в микромолях. О всасывающей функции ЖКТ судят по величине показателей йодионетрии, полученных через 10 мин за вычетом соответствующих показателей исходной пробы. В норме эти показатели у клинически здоровых людей в возрасте 18–21 год равняются $5,3 \pm 0,06$ pI, что соответствует содержанию йодида $6,61 \pm 0,98$ мкмоль/л.

Учитывая прямую зависимость величины электродного потенциала от концентрации ионов йода в слюне, можно ограничиться выражением результатов анализа в милливольтгах, что упрощает и ускоряет использование метода. В норме этот показатель равен $38,8 \pm 3,7$ мВ.

Доза вводимого йодсодержащего препарата в связи с высокой чувствительностью йодиноселективного электрода уменьшается в 50–100 раз, что снижает воздействие экзогенного йода на щитовидную железу.

Лабораторная работа 14. *Количественное определение белка и муцина (гликопротеина) в слюне.*

Принцип работы. Раствор белка в щелочной среде с реактивом Бенедикта дает фиолетовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка в минимальном объеме слюны (0,1 мл).

Выделенный из слюны муцин труднорастворим, и даже в щелочной среде его раствор остается мутным, что может служить препятствием при определении как белкового, так и углеводного компонентов. Чтобы исключить влияние вязкости и мутности, определение муцина проводят по разнице между содержанием общего белка в слюне и в супернатанте, после выделения гликопротеидов (муцина).

Ход исследования. Для определения белка к 0,1 мл слюны приливают 1,9 мл дистиллированной воды, 2 мл 6 %-ного едкого натрия, тщательно перемешивают, добавляют 0,2 мл раствора Бенедикта, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем спектрофотометрируют при длине волны 330 нм против контроля на реактивы.

В пробирку вносят 0,1 мл слюны, 1,9 мл воды (дистиллированной) и 2–3 капли 20 % раствора уксусной кислоты до выделения комочков муцина (последние после растворения в щелочи дают положительную реакцию и пробу Фелинга). Содержимое пробирки тщательно перемешивают путем встряхивания в течение 5 мин, далее центрифугируют при 1,5–2 тыс. об./мин. Супернатант сливают в чистую пробирку, добавляют к нему 2 мл 6 %-ного NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта, затем встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Спектрофотометрирование проводят при длине волны 330 нм против контроля на реактивы.

Результат (в мг/дл) подсчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам альбумина. Содержание муцина в слюне определяют по разности между содержанием белка в слюне и в супернатанте. Коэффициент сходимости и воспроизводимости по белку — 3,56 %, по муцину — 5,14 %.

Содержание муцина в слюне практически здоровых людей составляет в среднем $75,4 \pm 8,8$ мг/дл, для сравнения при язвенной болезни желудка — $259 \pm 17,9$ мг/дл. У других больных (смешанная группа) содержание муцина может достигать $122,5 \pm 7,7$ мг/дл.

После лечения содержание белка в слюне больных снижается, тогда как содержание муцина хотя и снижается, но остается выше, чем у здоровых.

Высокий уровень муцина в слюне больных является защитной реакцией организма в состоянии болезни, когда муцин как слизеподобное вещество препятствует колонизации слизистой микроорганизмами.

Лабораторная работа 15. **Определение активности лизоцима слюны.**

Принцип работы. Основан на определении антилизоцимной активности микроорганизмов при оптимальном разведении и инкубации при 37°C.

Ход исследования. В качестве тест-культуры использовали 24-часовую культуру *Micrococcus lysodeikticus* (ML-штамм № 2665 ГИСК им. Л. А. Тарасевича). Бактериальные клетки убивали хлороформом в течение 60 минут, смывали 0,067 М фосфатным буфером с ЭДТА и один раз 0,067 М фосфатным буфером без ЭДТА. Культуру ML отделяли путем центрифугирования при 3,5 тыс. об./мин 20 мин. После этого к осадку ML добавляли этот же буферный раствор и на спектрофотометре СФ-46 (540 нм) оптическую плотность суспензии микрококка доводили до 0,300. Исследуемые образцы слюны разводили 0,067 М фосфатным буфером в соотношении 1:9. К 2 мл субстрата (суспензии тест-штамма ML) добавляли 0,5 мл раствора слюны.

Измерения начинали непосредственно после внесения всех компонентов в смесь и через 10 мин инкубации при 37 °С. В контрольном опыте к 2 мл суспензии микрококка добавляли 0,5 мл 0,067 М фосфатного буфера. Активность лизоцима рассчитывали по специальной, выведенной формуле 9:

$$AL = \frac{(D_o - D_k) \times K \times 10 \times 2}{10} \text{ ед./мл/мин,} \quad (9)$$

где D_o — начальная плотность, D_k — конечная оптическая плотность, K — коэффициент пересчета, равный 100, 10 — разведение слюны, 2 — пересчет на 1 мл, 10 — время инкубации.

Для выведения расчетной формулы определения удельной активности культуру микрококка готовили описанным выше способом. После чего полученную биомассу делили на 2 равные части. Одну часть доводили до оптической плотности 0,300 при длине волны 540 нм. При этом объем буфе-

ра составил 24 мл. В другой части путем минерализации по Кьельдалю, отгонки по Конвею и титрования определяли количество азота и рассчитывали содержание белка в пробе. Пятикратным исследованием установлено, что при оптической плотности 0,300 в пробе содержится 3,48 мг белка в микрококках. Столько же его содержится в 24 мл суспензии, а в 1 мл — 0,0148 мг. За единицу активности лизоцима условно принято количество фермента, способного лизировать ГАГ (гликозаминогликаны) и ПГ (протеогликаны), содержащие 0,001 мг белка.

Метод используется для исследования функциональной активности слюнных желез и протективных свойств слюны при различных патологических процессах в ротовой полости. Данное исследование возможно также проводить при изучении влияния различных гигиенических средств ротовой полости и пищевых продуктов на антимикробные свойства слюны с целью оценки качества потребляемой продукции.

Определение содержания лизоцима в слюне имеет практическое значение в клинической лабораторной диагностике, при пищевых отравлениях, особенно у детей (таблица 3).

Употребление различных химических, биологических добавок и примесей пищи создает проблему пищевой аллергии. Особенно высокая чувствительность организма к пищевым продуктам отмечается у детей, что связано с незрелостью ферментативных систем ЖКТ и особенностями общего и местного иммунитета. У детей с пищевой аллергией отмечается дисбаланс индивидуальных уровней лизоцима в ротовой жидкости, что указывает на дисфункцию местного и гуморального иммунитета полости рта.

Таблица 3 — Содержание лизоцима в слюне у детей до и после лечения* ($M \pm m$)

Показатель	Группы детей			Контроль
	бронхиальная астма	атопический дерматит	аллергические реакции	
Лизоцим до лечения, мг/л	0,81 ± 0,03	0,92 ± 0,05	0,96 ± 0,05	1,59 ± 0,12
Лизоцим после лечения, мг/л	1,40 ± 0,05	1,43 ± 0,07	1,47 ± 0,08	—

* Шилова, М. А. Содержание лизоцима и иммуноглобулинов в ротовой жидкости у детей с пищевой аллергией / М. А. Шилова. // Медицинские новости. — 2000. — № 8. — С. 66–69.

Лабораторная работа 16. **Определение кальция и фосфора в ротовой полости с целью профилактики кариеса зубов.**

Принцип работы. Основан на образовании комплекса иона кальция с анионом ЭДТА (трилон В), который устойчив в сильнощелочной среде при рН 12–13. Комплекс ионов магния в этой среде разрушается, а магний выделяется в виде гидроксида. Отсутствие свободных ионов кальция при титровании трилоном В обнаруживается индикатором мурексидом.

Ход работы. Ротовую жидкость объемом 0,5–1,0 мл разбавляют дистиллированной водой до объема 50 мл, добавляют 1 мл 1 %-ного раствора

гидроксиламин гидрохлорида, 2 мл 2 н. раствора гидроксида натрия, несколько кристаллов мурексида и титруют 0,05 н. раствором трилона В до изменения окраски.

Нижний предел обнаружения кальция в ротовой жидкости при исследовании 0,5 мл слюны составляет 8,0 мг/л.

Определение фосфора основано на реакции ортофосфатов с молибдатом аммония в кислой среде. Образующаяся при этом желтая гетерополи-кислота под действием восстановителей аскорбиновой кислоты или хлорида олова, превращается в интенсивно окрашенное синее соединение.

Для разрушения белков 0,1 мл слюны обрабатывали 2,4 мл 7 %-ного раствора ТХУ кислоты, затем раствор центрифугировали. Аликвотную часть центрифугата (0,1–2,0 мл) использовали для анализа. Интенсивность окраски измеряли с помощью ФЭКа. Расчет проводили по калибровочному графику. Нижний предел обнаружения фосфора в ротовой жидкости — 1,0 мг/л.

Содержание фтор-иона в слюне определяют с помощью фторселективного электрода потенциометрическим методом.

Поскольку слюна постоянно омывает зубы, то повышение концентрации минеральных компонентов в ней способствует лучшей минерализации зубов.

При потреблении фторированной соли происходит увеличение скорости саливации, что способствует снижению вязкости слюны. Потребление фторида натрия (в таблетках) приводит к снижению вязкости ротовой жидкости в 1,08 раза ($p < 0,01$). Потребление фторированной соли приводит к снижению вязкости слюны в 1,12 раза, что способствует лучшему доступу минеральных компонентов к эмали зубов и повышению ее устойчивости к кариесу зубов. Профилактика кариеса зубов оказывает благоприятное влияние на состав и свойства ротовой жидкости, устраняет ряд патогенетических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаева, А. Г.* Структура, функции и адаптивный рост слюнных желез / А. Г. Бабаева, Е. А. Шубникова. — М.: Изд-во МГУ, 1979. — 190 с.
2. *Боровский, Е. В.* Биология полости рта / Е. В. Боровский, В. К. Леонтьев. — М.: Медицина, 1991. — С. 172–186.
3. *Вавилова, Т. П.* Слюна и десневая жидкость: учеб.-метод. пособие / Т. П. Вавилова, Н. И. Трунилина, Ю. А. Петрович: М-во здравоохранения РСФСР – Медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко. — М.: МГУ, 1986. — 38 с.
4. *Волчкова, В. М.* Диагностическая ценность исследования ферментов слюны у больных лейкозами / В. М. Волчкова, Т. Т. Березов, Т. Т // Клинико-биохимические исследования. — 1995. — С. 46–53.
5. *Григорьев, И. В.* Слюна и психическая сфера человека / И. В. Григорьев. — М.: Ноосфера-3000, 2005. — 157 с.
6. *Гриневич, В. Б.* Уровень креатинина в крови и слюне-прогностический критерий клинического течения язвенной болезни / В. Б. Гриневич, Е. И. Ткаченко, Ю. П. Успенский // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1996. — № 1. — С. 58–62.
7. *Григорьев, И. В.* Слюна как предмет лабораторной диагностики / И. В. Григорьев, А. А. Чиркин // Медицинские новости. — 1998. — № 4. — С. 4–13.
8. *Коротько, Г. Ф.* Роль слюнных желез в обеспечении постоянства гидролитической активности крови / Г. Ф. Коротько, Ш. К. Кадыров // Физиол. журнал им. И. М. Сеченова. — 1994. — Т. 80, № 8. — 108 с.
9. *Коротько, Г. Ф.* Гастрин в слюне / Г. Ф. Коротько, Ш. К. Кадыров // Физиология человека. — 1993. — Т. 20, № 2. — 61 с.
10. Циркадные ритмы концентрации кортизола в слюне во время длительного космического полета / И. М. Ларина [и др.] // Физиология человека. — 2000. — Т. 26, № 4. — 95 с.
11. *Нетаха, Ж. Н.* Изучение саливации у человека в норме и при патологии / Ж. Н. Нетаха, С. Н. Ляпун // Клиническая медицина. — 1972. — № 9. — 15 с.
12. *Олецкий, Э. И.* Биохимия соединительной ткани и органов полости рта / Э. И. Олецкий, А. Д. Таганович, В. К. Кухта. — Мн.: БГМУ, 2002. — С. 45–53.
13. *Рыбакова, М. Г.* Об эндокринной функции слюнных желез / М. Г. Рыбакова // Архив патологии. — 1978. — № 2. — 85 с.
14. *Сукманский, О. И.* Биологически активные вещества слюнных желез / О. И. Сукманский. — Киев: Здоровье, 1991. — 111 с.
15. *Сукманский, О. И.* Взаимосвязь щитовидной и слюнной желез / О. И. Сукманский // Вестник стоматологии. — 1995 — № 2. — 143 с.
16. *Рыбакова, М. Г.* Об эндокринной функции слюнных желез / М. Г. Рыбакова // Архив патологии. — 1978. — № 2. — 85 с.
17. Физиология человека / В. М. Покровский [и др.]; под общ. ред. В. М. Покровского, Г.Ф. Коротько — М.: Медицина, 1998. — Т. 2. — 38 с.
18. *Шилова, М. А.* Содержание лизоцима и иммуноглобулинов в ротовой жидкости у детей с пищевой аллергией / М. А. Шилова // Медицинские новости. — 2000. — № 8 — С. 66–69.
19. *Шубникова, Е. А.* Секреция желез: Очерки. Традиционные и нетрадиционные аспекты секреторного процесса. — Е. А. Шубникова, Г. Ф. Коротько. — М.: Изд-во МГУ, 1986. — 38 с.
20. Signaling mechanisms that regulate receptors / В. Baum [et al.] // DDT. — 1996. — № 1. — С. 502–612.
21. Reliability of salivary testosterone measurements: a multicenter evaluation / J. M. Dabbs [et al.] // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41, № 11. — 1581 p.
22. *Putz, Z.* Radioimmunoassay of thyroxine in saliva / Z. Putz, A. Vanuga, J. Veleminsky // Exp. And Clinic. Endocrinol. — 1985. — Vol. 85, № 2. — 199 p.

СОДЕРЖАНИЕ

Механизм секреции слюны. Факторы, влияющие на формирование белкового состава слюны	3
Биохимический состав ротовой жидкости	5
Функции белков слюны	10
Минерализующая функция слюны (ротовой жидкости).....	19
Диагностика ротовой жидкости.....	25
Практическая часть занятий.....	27
Литература	36

Учебное издание

Грицук Александр Иванович
Свергун Валентина Тимофеевна
Коваль Александр Николаевич

**БИОХИМИЯ
РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ**

**Учебно-методическое пособие
для студентов 2 курса медицинских вузов
медико-диагностического и лечебного факультетов**

2-е издание, переработанное и дополненное

Редактор *О. В. Кухарева*
Компьютерная верстка *А. М. Елисеева*

Подписано в печать 06.09.2011.

Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная 65 г/м². Гарнитура «Таймс».
Усл. печ. л. 2,33. Уч.-изд. л. 2,54. Тираж 70 экз. Заказ 342.

Издатель и полиграфическое исполнение
Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
ЛИ № 02330/0549419 от 08.04.2009.
Ул. Ланге, 5, 246000, Гомель.

