ВСЕРОССИЙСКИЙ МОЛОДЕЖНЫЙ КОНКУРС ПО ПРОБЛЕМАМ КУЛЬТУРНОГО НАСЛЕДИЯ, ЭКОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

«ЮНЭКО»

Направление: Биология

Тема: Исследование амилолитической активности альфа-амилазы ротовой жидкости как диагностического и прогностического маркера в медицинской практике

Соискатель: Клокова Ксения Алексеевна

Научный руководитель: Радина Марина Валентиновна

Место выполнения работы: Липецкая область, Елецкий район, с. Казаки

2026

Оглавление

Стр.

Введение…….3
Глава 1. Обзор источников информации……3
1.1. Фермент α-амилаза…….3
1.2. Основные методы исследования слюны……..4
Глава 2. Результаты исследований и их обсуждение…….4
2.1. Проведение анкетирования……4
2.2. Эксперимент…….5
Выводы……7
Приложение…….9

Введение

Актуальность. Оценкой состояния организма и многих патологий может служить оценка активности работы разных ферментов ротовой жидкости, и, в частности, α-амилазы слюны. Исследование слюны в ротовой полости — это неинвазивный метод диагностики, который позволяет оценить состояние полости рта, выявить патогенные микроорганизмы, нарушения в микробиоценозе, а также получить информацию о системных заболеваниях. Слюна содержит воду, муцины, ферменты, электролиты, антимикробные вещества, микроорганизмы, гормоны и другие компоненты, состав которых отражает как локальные, так и общие процессы в организме. Имеются данные, что на активность α-амилазы влияют много разных факторов, например, стрессы, курение, употребление спиртных напитков, неправильное питание, pH, возраст и другое.

Проблема: можно ли считать ротовую жидкость человека диагностическим и прогностическим маркером здоровья в медицинской практике?

Цель: определить каталитическую активность α-амилазы в слюне у разных людей методом Вольгемута и показать зависимость её активности от разных причин.

Задачи:

- Проанализировать информационные источники, современные научные данные о роли α-амилазы слюны в организме человека;
- Провести анкетирование определенных групп людей об их образе жизни, рационе питания, вредных привычках, наличии хронических и текущих заболеваний, факторах образа жизни;
- Провести эксперименты по выявлению активности α-амилазы в слюне у разных групп людей методом Вольгемута;
- Интерпретировать полученные результаты и предложить практические рекомендации Министерству здравоохранения по использованию биохимического метода анализа α-амилазы слюны для ранней диагностики и профилактики заболеваний.

Гипотеза: α-амилаза слюны – диагностический и прогностический маркер здоровья.

Методы исследования: сбор информации, анкетирование, сравнение, измерение, метод Вольгемута.

Объект исследования: слюна человека.

Предмет исследования: активность α-амилазы.

Исследования проводились в Точке Роста МБОУ СШ с. Казаки Елецкого муниципального округа в 2026 г.

Глава 1. Обзор источников информации

1.1. Фермент α-амилаза

Ферменты – это обширная группа биокатализаторов, играющая колоссальную роль в жизнедеятельности живых существ, ускоряя в организмах огромное количество биохимических реакций. Фермент α-амилаза (1,4-α-d-глюкан-глюканогидролаза, гликогеназа; шифр КФ – 3.2.1.1) – гликозил-гидролаза, кальций-зависимый фермент**,** катализирует гидролиз α(1-4)-гликозидные связи в молекулах углеводов (крахмала, гликогена) и расщепляет их сначала до декстринов, затем до мальтозы. Далее мальтоза под действием уже мальтазы расщепляется до глюкозы - основного источника энергии животного организма. Этот фермент вырабатывается у человека в различных тканях организма, но её основными источниками являются поджелудочная железа и слюнные железы, поэтому различают панкреатическую α-амилазу и слюнную α-амилазу. Он вырабатывается у человека в различных тканях организма, но её основными источниками являются поджелудочная железа и слюнные железы (панкреатическая α-амилаза и слюнная α-амилаза [3]. Впервые амилаза

была описана под названием «диастаза» почти 200 лет назад немецким исследователем (Leuchs, 1831), но позднее – уже в 20 веке – была переименована в амилазу, хотя термин диастаза до сих пор употребляется в клинико-диагностических лабораториях, например, для изучения диастазы в слюне и мёде у пчел [4, 5]. Содержание амилазы в слюне различно у разных людей; активность фермента бывает не одинакова, поэтому переваривание слюной одного и того же количества крахмала у разных людей занимает разное время. Известно, что по концентрации α-амилазы в слюне можно определить ее каталитическую активность, снижение которой происходит при различных патологических процессах в полости рта, пищеварительной системе и зависит от разных факторов, например, стресса, вредных привычек, образа жизни, питания [9]. Имеются научные данные, что слюна является клинически информативной биологической жидкостью, содержащей множество биомаркеров, что делает возможным проведение многочисленных анализов для разработки способа тестирования пациента на месте, в том числе экспресс-тесты. Диагностика по слюне является новой областью более простого использования не только при обнаружении патологий полости рта, желудочно-кишечного тракта, слюнных желёз, но и в скрининге онкологических заболеваний [2, 3]. Использование слюны расширяет перспективы для постановки клинического диагноза, динамики и мониторинга заболевания. Поэтому поиск быстрых, простых, безболезненных, малоинвазивных, информативных методов диагностики состояния организма – одна из главных перспективных областей медицины.

1.2. Основные методы исследования слюны

1. Биохимическое исследование (оценка микробиоценоза полости рта). Определении количественного и качественного состава короткоцепочечных жирных кислот — метаболитов анаэробных и аэробных микроорганизмов. Метод газожидкостной хроматографии позволяет оценить состояние микрофлоры, диагностировать пародонтоз, гингивит, стоматит.

2. Микробиологические методы. Посев на питательные среды для выявления конкретных бактерий (например, Streptococcus mutans, Lactobacillus, Candida)

3. Молекулярно-биологические методы, такие как ПЦР (полимеразная цепная реакция), которая позволяет обнаружить ДНК конкретных патогенов.

4. Оценка физико-химических свойств. Измерение кислотности (pH) и буферной ёмкость слюны — способности нейтрализовать кислоты. Определение содержания кальция, фосфора, натрия, калия и других элементов.

5. Цитологические исследования. Анализ клеточного состава слюны.

6. Иммунологические исследования. Определение уровня иммуноглобулинов (sIgA, IgM, IgG) и других воспалительных медиаторов.

7. Сиалометрия. Функциональный тест, при котором оценивают количество и качество слюны (прозрачность, наличие осадка) при стимуляции раствором аскорбиновой кислоты.

8. Спектрофотометрия. Использование прибора спектрофотометра, который определяет химический состав веществ при прохождении через биоматериал света различной длины волны.

В нашем исследовании использовался метод Вольгемута [2,4,6].

Глава 2. Результаты исследований и их обсуждение

2.1. Проведение анкетирования

В исследовании участвовало 50 человек разного возраста. Им была предложена анкета, в которой были заданы вопросы о рационе питания, образе жизни, вредных привычках, состоянии здоровья, хронических и текущих заболеваниях (П).

Проанализировав результаты анкетирования, из данной группы были отобраны для дальнейшего исследования 5 добровольцев: курящий взрослый мужчина, больной ОРВИ подросток, школьник с повышенной кровоточивостью десен, и два относительно здоровых человека, один из которых контрольный.

2.2. Эксперимент

Эксперимент. Определение активности α-амилазы слюны методом Вольгемута [2, 4, 9].

Метод основан на том, что слюну разводят в дистиллированной воде в определенной последовательности, затем в каждую пробирку приливают одно и тоже количество раствора крахмала и находят наименьшее содержание фермента, которое полностью расщепляет всё количество добавленного крахмала. Расчет активности фермента проводят на 1 мл слюны. Амилазная активность слюны или амилокластическая сила слюны выражается количеством 0,1% раствора крахмала в мл, которое может расщепляться 1 мл слюны при температуре 38^0С в течении 30 мин. В норме амилазная активность слюны составляет 160-320 усл.ед. по Вольгемуту [9].

Правила подготовки к исследованию

- За несколько дней до анализа испытуемые исключили приём противовоспалительных средств, антибиотиков.
- За 3 часа до сдачи слюны не употребляли пищу и напитки, исключили курение и жевательную резинку.
- Перед сбором биоматериала не чистили зубы.
- Перед сбором слюны прополоскали рот водой.
- Использовали стерильный контейнер.
- Сбор проводили утром натощак, до чистки зубов.
- После сбора плотно закрыли контейнер, указали на этикетке ФИО, дату и время сбора.
- Биоматериал можно хранить контейнере в холодильнике при температуре +2…+8 С не более 4 часов.

Ход эксперимента

В 10 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл воды. Слюну разводят в 10 раз. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл этой разведенной слюны и перемешивают (это разведение 1:20). Затем 1 мл слюны из этой пробирки переносят во вторую, перемешивают (слюна разведена 1:40). Затем 1 мл слюны из второй пробирки переносят в третью, из третьей в четвертую и т.д., то есть из предыдущей в последующую. Из 10 пробирки 1 мл смеси выливают. Таким образом, получается 10 пробирок со слюной, где в каждой последующей пробирке содержание фермента вдвое меньше, чем в предыдущей. Во все эти пробирки добавляют ещё по 1 мл воды и по 2 мл 0,1 % раствора крахмала, перемешивают и помещают в водяную баню на 30 мин при температуре 37-38^0С. Через 30 минут пробирки достают, охлаждают и добавляют по 1 капле раствора йода и перемешивают. Жидкость в пробирках в зависимости от степени расщепления крахмала может окрашиваться в желтый, розовый, красный и фиолетовый цвет. Раствор желтого цвета свидетельствует о полном расщеплении крахмала, фиолетовый – о том, что крахмал в растворе еще сохранился.

Схема расщепления: Крахмал (синяя окраска с йодом) → амилодекстрины (синяя окраска с йодом) → эритродекстрины (красно-бурая окраска с йодом) → ахродекстрины (отсутствие окраски с йодом) → мальтоза (отсутствие окраски с йодом).

Результаты эксперимента оформлены в таблицах.

Таблица 1.

Условная активность α-амилазы в слюне

	1 испытуемый	2 испытуемый	3 испытуемый	4 испытуемый	5 испытуемый

	(курящий)	(с признаками ОРВИ)	(пародонтоз)	(здоров)	(здоров) Контроль
Активность α-амилазы	80	80	640	320	160

Для расчета и оценки амилазной активности слюны берется последняя пробирка с желтой окраской, отсчитывая с конца [8].

Результаты эксперимента по методу Вольгемуту.

Таблица 2.

Результат опытов испытуемого №1

Испытуемый №1										
№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Разведение слюны (раз)	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10248
Объём 0,1% крахмала	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл
Цвет окрашивания йодом	Желтый	Желтый	Желтый	Оранжевый	Красный	Фиолетовый	Темно-фиолетовый	Синий	Синий	Синий

Таблица 3.

Результат опытов испытуемого №2

Испытуемый №2										
№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Разведение слюны (раз)	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10248
Объём 0,1% крахмала	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл
Цвет окрашивания йодом	Желтый	Желтый	Желтый	Оранжевый	Красный	Фиолетовый	Темно-фиолетовый	Синий	Синий	Синий

Таблица 4.

Результат опытов испытуемого №3

Испытуемый №3										
№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Разведение слюны (раз)	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10248
Количество 0,1% крахмала	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл
Цвет окрашивания йодом	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Темно-оранжевый	Красный	Фиолетовый	Синий

Таблица 5.

Результат опытов испытуемого №4

Испытуемый №4										
№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Разведение слюны (раз)	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10248
Объём 0,1% крахмала	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл
Цвет окрашивания йодом	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Оранжевый	Темно-красный	Фиолетовый	Фиолетовый	Синий

Таблица 6.

Результат опытов испытуемого №5

Испытуемый №5										
№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Разведение слюны (раз)	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10248
Объём 0,1% крахмала	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл
Цвет окрашивания йодом	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Оранжевый	Красный	Темно-красный	Фиолетовый	Фиолетовый	Синий

Из полученных данных видно, что в первой (у курильщика) и второй пробе (с ОРВИ) активность α-амилазы намного ниже, а в третьей выше по сравнению с контролем. Видимо, это может быть связано с тем, что курение оказывает негативное влияние на работу слюнных желез. Никотин способен убивать клетки слюнных желез, тем самым снижает выработку ферментов. У больного респираторным заболеванием понижена активность α-амилазы в связи с общим ослаблением организма во время инфекции. В пробе 3 видно, что «заболевания ротовой полости могут увеличивать активность амилазы» [9]. У испытуемых с пробой 4, 5 (относительно здоровых, согласно анкетированию), показатели активности фермента отличаются. В научных медицинских источниках [2, 3, 8, 9] сказано, что на активность фермента α-амилазы могут влиять и другие факторы: стрессы, питание, образ жизни. По результатам анкетирования выявлено, что у испытуемого №4 в рационе питания преобладает углеводная пища, которая может увеличивать концентрацию фермента.

Выводы

В результате проделанной работы можно сделать выводы:

1. Проведённое исследование показало, что уровень активности α-амилазы в слюне может служить диагностическим и прогностическим маркером здоровья человека в медицинской практике
2. Повышенный уровень α-амилазы может указывать на проблемы с пищеварением, неправильное питание, а пониженный – на общее ослабление организма, заболеваемость острыми вирусными инфекциями, наличие вредных привычек;

3. Исследование ротовой жидкости в целом может внести значительный вклад в скрининг заболеваний, оценку риска, прогнозирование рецидивов и другие прогностические оценки результатов.

Перспективы и рекомендации использования результатов работы

В связи с тем, что для диагностики тех или иных заболеваний важное значение имеет активность амилазы, полученные данные дают основание для более тщательного выбора методики и проверки результатов. Интерпретация результатов исследований предоставляет информацию для врача, но не является диагнозом. Точный диагноз устанавливает специалист на основе комплексного обследования.

Список использованных источников информации

1. Аналитическая химия. Справочные материалы: Учебно-методическое пособие по дисциплинам «Аналитическая химия» и «Аналитическая химия и физико-химические методы анализа» для студентов химико-технологических специальностей. / сост. Соколовский А.Е., Е.В.Радион Е.В.; под общ. ред. Е.В.Радион – Мн.:БГТУ, 2005. 80 с.
2. Биохимический практикум: пособие для самостоятельной аудиторной работы студентов, обучающихся по специальностям 060101-Лечебное дело, 060103-Педиатрия Часть 1. / Авторский коллектив: Камилов Ф.Х., Галимов Ш.Н., Аглетдинов Э.Ф., Князева О.А., Абдуллина Г.М., Карягина Н.Т., Байгильдина А.А., Валиев А.Г., Сагидуллин Ф.А., Кулагина И.Г., Кидрасова Р.С., Меньшикова И.А., Бикметова Э.Р. – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2014 – с.
3. Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие / Вавилова Т.П. – 2-е изд., испр. и доп. – 2008. – 208 с.
4. Лакиза, Н. В. Аналитическая химия: учеб.-метод. пособие / Н. В. Лакиза, С. А. Штин ; М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2019. –139 с.
5. Макаров В.А. Практикум по ветеринарно-санитарной экспертизе с основами технологии продуктов животноводства. М.: Агропромиздат, 1987. – 271 с
6. Спектрофотометры, особенности применения. Статья. https://medmebel.ru/articles/spektrofotometry-meditsinskie-chto-eto-takoe-dlya-chego-ispolzuyut-osobennosti-primeneniya/?ysclid=mlurucpkms952536270
7. Физическая химия. Спектрохимия. Лабораторный практикум: Ф505 учебно-методич. пособие /сост.: А. В. Гребенник, А. Ю. Крюков. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2017. – 80 с.
8. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 106 с.

Приложение

I. АНКЕТА

1. Ваш возраст.
2. Ваш пол.
3. Какой пище вы отдаёте большее предпочтение: белковой, углеводной, жирной, овощам, фруктам?
4. Являетесь ли вы курильщиком?
5. Употребляете ли вы спиртные напитки?
6. Имеете ли вы хронические заболевания? Если да, то какие?
7. Болеете ли вы в настоящее время вирусными инфекциями?
8. Хотели бы вы безболезненно исследовать здоровье своего организма?

II. Фотографии



Фото 1. Определение активности α-амилазы слюны методом Вольгемута



Фото 2. Определение активности α-амилазы слюны методом Вольгемута