

УДК 612.313.1-02:612.8-05

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЛЮНЫ СТУДЕНТОВ НА ФОНЕ НЕРВНОГО НАПРЯЖЕНИЯ****Павлова М.М., Таренкова И.В., Петрова А.А.***ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург, e-mail: margarita.pavlova.43@mail.ru, itarenkova@mail.ru, alenochkapetrova1994@mail.ru*

Стресс – нарушение процессов гомеостаза, которое вызывает физиологические и поведенческие адаптивные рефлексии. Колебания психоэмоционального состояния (ПЭС) у человека, в том числе связанные с повышенным нервным напряжением, оказывают влияние на биохимический слюнный состав. Психологические и эмоциональные воздействия способны привести к морфологическим изменениям в слюнных железах, связанных с уменьшением объёмов выделяемых секретов, наблюдаются колебания концентраций общего белка и активности ферментов. Фиксирование данных аномалий открывает возможность применять эти отклонения в медицинской диагностике. В работе было исследовано влияние нервно-психической нагрузки как составного компонента психологического и эмоционального состояния студентов на отдельно взятые биохимические показатели ротовой жидкости: концентрация общего белка, активность ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК). Задействованы стандартные фотометрические методы исследования. Полученные данные говорят о явном влиянии психоэмоциональной нагрузки на исследуемые биохимические показатели: возрастание концентрации общего белка (увеличение в пределах от 2% до 400%), снижение активности ферментов АОЗ (на 5–10%), возрастание продуктов ПОЛ. Организм, будучи подверженным стрессовым состояниям, вызывает отклонения от нормальных показателей метаболических процессов СОПР. Это выражено изменением общего белка, сдвигами активности ферментов окислительно-восстановительных процессов, антиоксидантной защиты, а также продуктов ПОЛ смешанной слюны.

**Ключевые слова:** слюна, психоэмоциональное состояние (ПЭС), слизистая оболочка полости рта (СОПР), активные формы кислорода (АФК), супероксиддисмутаз (СОД), каталаза, малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК)

**INVESTIGATION OF BIOCHEMISTRY CHANGEABLE INDICATORS OF STUDENTS' SALIVA UNDER THE INFLUENCE OF NERVOUS STRAIN****Pavlova M.M., Tarenkova I.V., Petrova A.A.***Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, e-mail: margarita.pavlova.43@mail.ru, itarenkova@mail.ru, alenochkapetrova1994@mail.ru*

Stress – a state of impaired homeostasis, causing a physiological and behavioral adaptive response. Changes in PES in humans, including those associated with increased nervous strain, affect the biochemical composition of saliva. Psycho-emotional effects lead to morphological changes in the salivary glands, the amount of saliva secreted decreases, the concentration of total protein and the activity of enzymes change, which makes it possible to use these indicators in medical diagnostics. The study of the influence of the neuropsychic load as part of the psycho-emotional state of students on some biochemical indices of mixed saliva: total protein content, activity of antioxidant protection enzymes – superoxide smutase (SOD) and catalase (CAT), the content of the products of lipid peroxidation (LPO) – malonevodehyde (MDA), diene conjugates (DC). Used standard photometric research methods. The data obtained indicate a pronounced effect of psycho-emotional stress on the analyzed biochemical parameters: an increase in the concentration of total protein (from 2% to fourfold increase), a decrease in the activity of AOD enzymes (by 5-10%), an increase in POL. The psychoemotional stress to which the whole organism is exposed has an influence on the nature and course of metabolic processes of the COPN. This is manifested in a change in total protein, in shifts in the activity of enzymes of redox processes, antioxidant protection, as well as the products of LPO mixed saliva.

**Keywords:** saliva, psycho-emotional state (PES), oral mucosa, reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), catalase, malonic dialdehyde (MDA), diene conjugates (DC)

Смешанная слюна – это смесь биологических жидкостей, в состав которой входят вода, белки, соли, гликопротеины, липиды, углеводы и минеральные компоненты из слюнных желёз, сыворотки крови и тканей полости рта. Ротовая жидкость многогранна по функциональной нагрузке: она участвует в пищеварительных, минерализующих, стерилизующих, защитных, бактерицидных, иммунных, гормональных и других процессах организма; что отражается на ее биохимическом составе, представленном разнообразными белками, липидами (холестерин и его эфиры, свободные жирные кислоты, глицерофосфолипиды и т.д.), стероидными гормонами (кортизол, эстрогены, прогестерон, тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростерон, 11-ОН-андростенедион и др.), специфическими углеводами (олигосахаридные компоненты муцинов, свободные гликозаминогликаны, ди- и моносахариды), небелковыми азотсодержащими вещества-

мическом составе, представленном разнообразными белками, липидами (холестерин и его эфиры, свободные жирные кислоты, глицерофосфолипиды и т.д.), стероидными гормонами (кортизол, эстрогены, прогестерон, тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростерон, 11-ОН-андростенедион и др.), специфическими углеводами (олигосахаридные компоненты муцинов, свободные гликозаминогликаны, ди- и моносахариды), небелковыми азотсодержащими вещества-

ми (мочевина, мочевая кислота, креатин и др.), витаминами, катионами и анионами. В слюнной жидкости также можно обнаружить в относительно малых количествах: плазму крови, бактерии и части шелушившихся клеток эпителиальной ткани. За сутки человек способен произвести от полутора до двух литров ротовой жидкости. Связующим компонентом, составляющим более 94% от ее массы, является вода [1]. Слюнные железы легко возбуждаемы, они реагируют на любые раздражители внутренних органов и систем организма, вне зависимости от того, обоснованы ли они патологически или физиологически.

Имеются основания полагать, что состав человеческой слюны может формироваться в результате воздействия целого ряда факторов. Суточное время, нервные состояния, гипертония, инфекционные заболевания, месячные циклы, беременность и многие другие параметры способны приводить к кратковременным изменениям состава слюнной секреции. Протяженные по времени флуктуации состава слюны обычно сопряжены с процессами старения, системных болезней и медикаментозного лечения; не исключается влияние расовых признаков, генеалогических особенностей, климата, и аналогичных факторов, способных выявить спецификации норм белок-микробного взаимодействия, белкового полиморфизма, синергетического или антагонистического взаимодействия белков в ротовой полости. В последние годы намечается тенденция в популяризации исследований колебаний состава биологических жидкостей человека; появляется все больше работ, посвященных изучению воздействия разных психологических и эмоциональных состояний на уровень содержания отдельных компонентов слюны (определенных стероидных гормонов, секреторного иммуноглобулина А [2]).

Механизмы действия и последствия эмоционального неустойчивого состояния относятся к области слабоизученных разделов хемобиодинамики и медицинской практики [3]. Концепция стрессового состояния, предложенная Г. Селье, получила широкое распространение как в лабораторных, так и в клинических исследованиях. «Стресс – состояние нарушенного гомеостаза, вызывающее физиологический и поведенческий адаптивный ответ». Согласно Г. Селье, под воздействием гормонов гипофиза и надпочечников возникают неспецифические модальные депривации, сопровождающиеся ростом массы надпочечников, вилочковой и лимфатических желёз, язвенными поражениями ЖКТ. Современные представле-

ния о стрессовом состоянии, как бинарной системной реакции человека, подтверждены исследованиями отечественных и зарубежных учёных, которые подтверждают корреляцию состояния стресса и нарушений функциональности сердечно-сосудистой системы, кислородообеспечивающих, ментальных механизмов, изменения уровня иммунитета, катехоламинов, гормонов щитовидной, слизистой и других желёз внутренней секреции.

Около сотни лет назад было установлено, что изменения ПЭС в человеческом организме вызывают изменения химического состава слюнной жидкости. Люди, осуществляющие трудовую деятельность в экстремальных условиях, либо сопряжённых с риском для жизнедеятельности, подвергаются постоянному психоэмоциональному стрессу, что, в свою очередь, выражается на состоянии слизистой оболочки полости рта (СОПР). Интенсивность кариозного поражения зубных поверхностей и пародонтоза у таких личностей в 1,5–2,5 раза выше по сравнению с теми, которые находятся в бытовых условиях. Также наблюдается деградация защитных способностей системы ротовой полости, состояния слюнных желёз и дегидратации смешанной слюны. Психоэмоциональные воздействия приводят к изменениям гистологического строения слюнных желёз, уменьшается масса выделяемой слюны, изменяется концентрация общего белка и активность ферментов, что даёт возможность использовать эти показатели в медицинской практике [4].

Некоторые разновидности стрессовых состояний способны привести к изменению активности антиоксидантных ферментов слюны и концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [5]. В ротовой полости свободные радикалы катализируют окислительную модификацию белков и липидов слизистой оболочки (СОПР). Установлено, что модифицированные белки являются одной из главных причин стоматологических болезней – гингивита, пародонтита и многих других.

Данные о влиянии психологических и эмоциональных стрессовых состояний на химический состав смешанной слюны в литературных источниках недостаточны, поэтому проведённое нами исследование является актуальным не только для теоретического, но и для практического стоматологического применения.

Цель работы: исследование влияния неустойчивого нервно-психического состояния как составного компонента психоэмоционального состояния студентов на некоторые биохимические показатели

смешанной слюны: объемы и массы белка, активность ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК).

#### Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы проводилась на базе лаборатории кафедры химии ФГБОУ ВО «ОрГМУ» Минздрава РФ. Исследование проводили в группе студентов стоматологического факультета (30 человек, средний возраст –  $20 \pm 3$  года). В качестве материала исследования использовали образцы смешанной слюны,

Слюну собирали натощак без стимуляции после чистки зубов методом сплёвывания в пробирку в количестве 3–5 мл в качестве контроля, что позволило исключить внешние факторы, способные повлиять на секрецию, и добиться максимальной чистоты эксперимента. Далее проводили сбор слюны у этих же студентов после двухчасовой лекции и после четырёхчасового лабораторно-практического занятия (ЛПЗ) утром в последующие дни. Собранную слюну центрифугировали (10 минут, при 10000 об/мин), собирали надосадочную жидкость и хранили ее при температуре  $-20^\circ\text{C}$ . В исследуемых образцах определяли следующие биохимические показатели: общий белок, активность ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы, а также продукты перекисного окисления липидов – МДА и диеновые конъюгаты (ДК).

Количественное определение содержания белка проводили биуретовым методом на спектрофотометре Arel (Япония). Концентрацию белка определяли с помощью градуировочного графика, построенного с использованием стандартного белка.

Исследование МДА осуществляли также фотометрически по интенсивности поглощения при длине волны 532 нм окрашенного триметинового комплекса, образующегося при его взаимодействии с 2-тиобарбитуровой кислотой [6]. В работе использовали спектрофотометр Genesys – 20 (КНР).

О содержании конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов судили по интенсивности поглощения липидного экстракта при длине волны 233 нм на спектрофотометре Beckman coulter (США) – метод Z. Placer в модификации В.Б. Гаврилова, М.И. Мишкорудной [7].

Определение активности каталазы проводили кинетическим спектрофотометрическим методом, основанным на снижении

его субстрата – пероксида водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  при внесении его в пробу [8, 9]. Оптическую плотность растворов во времени измеряли при длине волны 240 нм на спектрофотометре Beckman coulter (США) в течение 30 с, рассчитывали процент убыли субстрата, активность выражали в ед/мг белка.

Об активности СОД судили по степени ингибирования реакции аутоокисления адреналина в адренохром в щелочной среде. Результаты оценивали спектрофотометрически (Beckman coulter (США)) по величине оптической плотности накапливающегося адренохрома, имеющего максимум поглощения при длине волны 347 нм [10]. Расчет активности фермента проводили по формуле

$$\left(1 - \frac{\Delta E \text{ опыта}}{\Delta E \text{ контроля}}\right) * 100\%,$$

где  $\Delta E$  опыта – экстинкция в опыте,  $\Delta E$  контроля – экстинкция в контроле.

Переводили полученные результаты в удельную активность – ед/мг белка.

Экспериментальные результаты были обработаны методами мат. статистики. При определении уровня достоверности полученных данных применялся критерий Стьюдента.

#### Результаты исследования и их обсуждение

После изучения литературных источников мы пришли к выводу, что качественный и количественный белковый состав человеческой слюнной секреции прямо коррелирует с его психоэмоциональным состоянием: так, например, при подавленных эмоциональных состояниях наблюдается снижение, а при эмоционально положительных – повышение общего белка в ротовой жидкости по сравнению с нормальным психическим состоянием [4].

Источниками белков в ротовой жидкости являются: секреции больших и малых слюнных желёз; микроорганизмы, лейкоциты, шелушенный эпителий, плазма крови. Белки слюны стимулируют процессы различных функций организма, как то: пищеварительная (альфа-амилаза, мальтаза, пептидаза, пепсин, гастрин), минерализующая, иммунная (иммуноглобулины, лизоцим, лактоферрин, гистамины, статерины, муцины), антигрибковая, смазывающая, буферная и антиоксидантная. При этом один и тот же белок может участвовать в нескольких процессах, что говорит об их полифункциональности. Некоторые из них ещё и участвуют в регуляции биологических систем организма – сердечно-сосуди-

стой, нервной и других. На сегодняшний день методом двухмерного электрофореза в секрети слюны обнаружено более тысячи протеинов, из которых каталогизированы лишь 306. Они по своей структуре неоднородны и могут отличаться по молекулярной массе, конвергенции в электромагнитных излучениях, процентном содержании фосфата и иной биоактивностью.

Нервные переживания сопровождаются характерными изменениями в метапроцессах СОПР и в химическом составе ротовой жидкости, зависящих от природы и силовых параметров нагрузки и от психологического состояния индивидуума.

Так, на фоне нервного напряжения у студентов было зафиксировано увеличение концентрации общего белка в слюне, которое было установлено достоверным. На рисунке наглядно показаны количественные изменения в протеоме слюны в условиях эксперимента.

Ключевыми компонентами физиологической регуляции белкового состава смешанной человеческой слюны считаются центры вегетативного контроля больших слюнных желёз. Эти железы иннервируются симпатическими и парасимпатическими нервами.

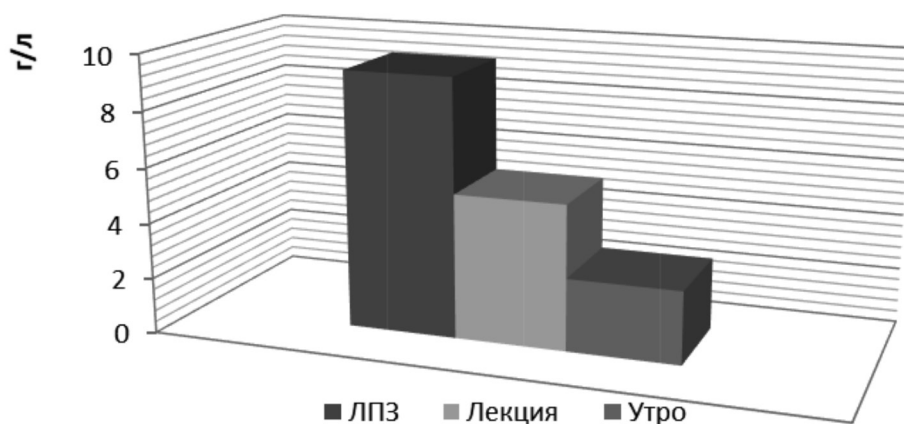
После двух академических часов наблюдалось повышение содержания общего белка по сравнению с контролем на 2% и составило  $5,21 \pm 0,88$  г/л против  $2,61 \pm 0,64$  г/л. После четырех академических часов практиков содержание общего белка повысилось в 4 раза по сравнению с контролем и составило  $9,30 \pm 0,89$  г/л, данное повышение достоверно ( $p > 0,01$ ).

На лабораторно-практическом занятии нервное напряжение студентов значительно

повышено – это можно объяснить выполнением контрольных мероприятий, таких как тестовые задания, устные ответы, защита работы. Таким образом, студенты испытывают повышенную ПЭН, при этом происходит значительный выброс гормонов адреналина, глюкокортикоидов, приводящий к уменьшению массы слюны, повышению сухости СОПР и, как следствие, повышению общего белка в слюнной секреции.

Состояние ротовой полости во многом определяется числом активных форм кислорода (АФК) и развитием свободнорадикального окисления (СРО). В образовании АФК в сосудах участвуют клетки эндотелия, которые необходимы для осуществления физиологических процессов: фагоцитарной активности, циклооксигеназной и липооксигеназной и других реакций. АФК инициируют перекисное окисление липидов в мембранах, заканчивающееся образованием конечных продуктов: малонового диальдегида (МДА), кетонов, спиртов, простых эфиров и углеводов, диеновых конъюгатов (ДК).

Предотвращает накопление АФК антиоксидантная система, которая включает ферментативную защиту: супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу, миелопероксидазу, а также неферментативную защиту (витамины С, Е, А, мочевая кислота, церулоплазмин и другие). Ферментативная и неферментативная антиоксидантные системы функционируют взаимосвязано. Ослабление любого звена защиты активирует СРО и, если сохранившиеся звенья не компенсируют ослабшее звено, развивается патологический процесс. Представлялось интересным оценить изменения в ферментативной АОС и состоянии СОПР в условиях нашего эксперимента.



*Изменение содержания общего белка (г/л) в смешанной слюне студентов*



**Таблица 1**

Активность ферментов АОЗ в слюне студентов

Активность ферментов АОЗ	Количество студентов	Утро (контроль)	После лекции	После ЛПЗ
КАТ ед/мг белка	30	32,8 ± 1,2	31,14 ± 1,5	27,52 ± 1,8
СОД ед/мг белка	30	26,54 ± 1,75	24,04 ± 0,5	24,04 ± 0,5

**Таблица 2**

Уровень продуктов ПОЛ в слюне студентов

Продукты ПОЛ	n	Утро	После лекции	После ЛПЗ
МДА, нмоль/л	30	0,33 ± 0,04	0,39 ± 0,05	0,45 ± 0,06
ДК, нмоль/л	30	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,1 ± 0,04

В табл. 1 отражена динамика изменения активности ферментов антиоксидантной защиты – СОД и каталазы при изменении психоэмоционального состояния студентов.

Активность ферментов АОЗ (СОД и каталазы) на всех этапах исследования снижалась. Так, активность каталазы после 2-х часовой лекции снизилась на 5% по сравнению с контролем. После проведения 4-х часового лабораторно-практического занятия активность КАТ понизилась на 10% и составила 27,52 ± 1,8 ед/мг белка. При исследовании СОД было отмечено понижение активности фермента как после лекции, так и после ЛПЗ на 7% (24,04 ± 0,5 ед/мг белка) по сравнению с контролем (26,54 ± 1,75 ед/мг белка).

Так как под действием ПЭН суммарное количество белков в слюне возрастает, однако меняется их фракционный состав, можно предположить, что на фоне повышенной ПЭН студентов снижается выработка данной фракции белков – ферментов.

Как видно из полученных данных, в СОПР снижается АОЗ, что приводит к повышению АФК и, как следствие, к повышению ПОЛ мембран СОПР, это отражается на повышении образующихся продуктов ПОЛ, МДА и ДК, при этом данное повышение незначительное.

Результаты исследования продуктов ПОЛ (МДА и ДК) представлены в табл. 2.

Приведенные результаты исследования продуктов ПОЛ указывают на то, что количественный состав компонентов секреции склонен повышаться на фоне психоэмоциональной нагрузки ( $p < 0,01$ ). По всей видимости, для накопления критических значений МДА и ДК требуется большее время психоэмоциональной нагрузки.

### Закключение

Студенты на лекционных и практико-лабораторных занятиях подвержены по-

вышенному нервному напряжению, или критическому уровню ПЭН, что негативно отражается на флуктуациях биохимических показателей ротовой жидкости. Результаты проведенного исследования подтверждено, что психоэмоциональный стресс, которому подвержены все системы человеческого организма, оказывают влияние на характер и течение метаболических процессов СОПР. Это проявляется в увеличении содержания общего белка, в снижении активности ферментов антиоксидантной защиты, повышении скорости ПОЛ и накоплении его продуктов в смешанной слюне.

Результаты проведенного исследования могут иметь определенное значение для изучения влияния психоэмоционального состояния (ПЭС) на биохимический состав биологических жидкостей, а также для диагностики ПЭН. В данных условиях смешанная слюна является одной из самых удобных для взятия пробы и изучения модельной системы организма.

### Список литературы

1. Васильева А.О., Павлова Г.В., Караваева Т.Ф., Ваганова Н.П. Определение биохимического состава слюны у школьников с различной физической нагрузкой в комплексных биохимических исследованиях // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=10508> (дата обращения: 25.04.2019).
2. Филаретова Л.П. Стресс в физиологических условиях // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2010. Т. 96. № 9. С. 924–935.
3. Жигулина В.В. Влияние стресса на кожу и развитие кожных заболеваний (обзор литературы) // Верхневолжский медицинский журнал. 2014. № 3. С. 31–34.
4. Григорьев И.В., Артамонов И.Д., Уланова Е.А., Богданов А.С. Белковый состав смешанной слюны человека: механизмы психофизиологической регуляции // Вестник РАМН. 2004. № 7 С. 36–47.
5. Криштоп В.В., Курчанинова М.Г. Биохимические показатели окислительного стресса в ротовой жидкости у студентов с разным стоматологическим статусом и качеством

жизни // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 10–2. С. 81–85.

6. Аджиев Д.Д. Исследование продуктов перекисного окисления липидов, неферментативной и ферментативной антиоксидантной системы в возрастной динамике самцов кроликов // Вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 674–684.

7. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. 1983. № 3. С. 33–35.

8. Бойцова Т.А., Паламарчук И.А., Бровко О.С., Вальчук Н.А., Слобода А.А., Жильцов Д.В. К вопросу о каталазной активности лишайников // Успехи современного естествознания. 2017. № 11. С. 7–11.

9. Balasubramanian M., Nirmala P. Evaluation of antioxidant properties of Foliose lichens. *Journal of Chemical and Pharmaceutical research*. 2014. Vol. 6. № 9. P. 177–184.

10. Сирота Т.В. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений // Патент РФ № 2144674. Патентообладатель Сирота Т.В. МПК G01N33/52. Использование соединений или составов для колориметрического, спектрофотометрического или флуориметрического анализа, например реактивной бумаги. МПК G01N33/68. С использованием протеинов, пептидов или аминокислот; заявлено 24.02.1999; опубл. 20.01.2000. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2144674> (дата обращения: 25.04.2019).