Косолапов Никита (7 класс)

«Оценка содержания белка и pH в слюне школьников в зависимости от состояния полости рта»

Лучшая работа на Всероссийском форуме научной молодежи «Шаг в будущее» (г. Москва) в области биомедицины
Научный руководитель: аспирант кафедры неорганической химии Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева, преподаватель химии Лицея № 1 «Спутник» Маринчев Сергей Сергеевич
Научный консультант: кандидат химических наук, доцент Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева Абдульмянов Алексей Рафикович

Введение

Использование слюны для диагностики заболеваний является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений медицины. В современной научной литературе имеется много работ, доказывающих, что слюна оказывает большое влияние на поддержание гомеостаза полости рта и является важной физиологической жидкостью человека, а некоторые показатели слюны могут являться чувствительными индикаторами заболеваний и состояний организма. Анализ слюны является неинвазивным и безболезненным, что представляется большим преимуществом перед традиционными физиологическими жидкостями, такими как кал, моча и кровь. Однако слюна является наименее изученной из всех жидкостей человека. На данный момент, основное внимание клинических специалистов привлекает анализ слюны на различные параметры с целью получения разнообразной диагностической информации. В литературе описано, что уровень pH и белка в слюне взрослых людей является показателем различных болезней полости рта. Однако, несмотря на то, что значения эти параметров в слюне сильно зависят от возраста человека, взаимосвязь содержания белка и pH в слюне школьников от состояния полости рта до сих пор не была изучена.

Актуальность работы заключается в изучении возможности использования таких биомаркеров как белок и pH в слюне школьников для анализа состояния полости рта.

Объект исследования: слюна.

Предмет исследования: концентрация общего белка и pH в слюне школьников в зависимости от состояния полости рта.

Гипотеза: по концентрации общего белка и уровню pH в слюне школьников можно судить о состоянии полости рта.

Целью работы является изучение зависимости концентрации общего белка и pH в слюне школьников от состояния полости рта.

Задачами данной работы являлись:

1. Анализ научной литературы по данной проблеме;
2. Анкетирование школьников Лицея №1 «Спутник» на предмет состояния полости рта, анализ слюны на содержание белка и pH и оценка полученных результатов.

Научная новизна: в данной работе впервые произведена оценка содержания белка и pH в слюне школьников в зависимости от состояния полости рта.

Практическая ценность: прослеживается взаимосвязь содержания белка и pH в слюне школьников от состояния полости рта. Анализ белка и pH в слюне школьников может быть использован для указания на наличие проблем полости рта и дальнейшего обращения к врачу стоматологу.

1. Обзор литературы по теме исследования

1.1. Слюна

Слюна – одна из шести биологических жидкостей организма. Слюна (лат. saliva) – прозрачная бесцветная жидкость, жидкая биологическая среда организма, выделяемая в полость рта тремя парами крупных (подъязычные, подчелюстные, околоушные) и множеством мелких слюнных желез полости рта [1]. В полости рта образуется смешанная слюна или ротовая жидкость, состав которой различается с составом смеси секретов желез, так как в ротовой жидкости находятся микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, различные частички пищи, компоненты зубного налета и зубного камня. В научной литературе, часто, термин «Слюна» используется и для ротовой жидкости и для смешанной слюны.

Слюна осуществляет множество функций в защите и сохранении целостности слизистой оболочки полости рта [1], а именно:

- принимает участие в очищении полости рта от остатков пищи, налета и бактерий;
- покрывает слизистую оболочку полости рта, механически защищая ее от травм во время еды, глотания и речи;
- выделяет карбоангидразу (густин), которая играет роль в развитии вкусовых рецепторов
- благодаря буферным свойствам, она нейтрализует негативное действие сильных кислот и щелочей в пределах емкости буфера;
- обеспечивает поступление ионов, необходимых для реминерализации зубов;

Слюна на 99,5% состоит из воды, а остальное – растворенные в ней минеральные вещества и органические компоненты [2]. Органические вещества слюны – это белки, которые синтезируются в слюнных железах и вне их. Концентрация белков в слюне – от 1 до 4 г/л. Среднее значение pH слюны составляет 6,75 (от 6,2 до 7,4). Уровень данных параметров в слюне зависит от возраста человека и его здоровья [3].

1.1.1. Использование слюны для диагностики заболеваний

Слюна начала использоваться в диагностике более 2000 лет. Анализ же состава слюны с использованием сложных химических и биохимических методов начал использоваться более века назад. [4]. Ученые сходятся во мнении, что диагностика и профилактика заболеваний с использованием человеческой слюны [5] является актуальной задачей и все больше прогрессивных лабораторий и практикующих врачей готовятся к этой новой технологии.

Также интерес к слюне как к диагностической жидкости растет с каждым годом из-за ее относительно простого и неинвазивного сбора. Собирать слюну значительно проще, безопаснее и экономичнее, чем кровь, особенно у детей и пожилых пациентов [6].

На настоящее время многие заболевания можно диагностировать с помощью слюны: рак [7], стресс [8], аллергии [9], бесплодие и др. [10]. Изменения свойств слюны выявлены у детей с синдромом Дауна [11]. Наблюдается определенная взаимосвязь между психологическим стрессом и уровнем кортизола в слюне [12].

Уровень pH слюны влияет на здоровье зубов [13]. Содержание белка в слюне взрослых людей является показателем состояния полости рта [14]. Выявлена [15] взаимосвязь содержания белка и pH в слюне взрослых с такими заболеваниями как гингивит и периодонтит.

Таким образом, количество публикаций, посвященных исследованию слюны, ежегодно растет. Несомненно, слюна является одним из самых перспективных объектов для исследования. Слюна - единственная биологическая жидкость с уникальным набором исследовательских возможностей, предусматривающих полную неинвазивность, многократный и почти неограниченный по объему забор материала. Основное внимание клинических специалистов привлекает анализ слюны на различные параметры с целью получения разнообразной диагностической информации. Уровень pH и белка в слюне взрослых людей является показателем состояния полости рта.

2. Экспериментальная часть

2.1. Реагенты и оборудование

- весы аналитические A&D GH-120;
- pH-метр Metler Toledo
- фотометр КФК-2
- бидистиллятор типа БД-2 по ТУ 25-11-1002-78;
- электроплитка с регулятором с закрытой спиралью типа ЭПШ 1 – 08/220 по ГОСТ 14919 – 83;
- воронки стеклянные диаметром 56, 75 $см^3$ по ГОСТ 25336 – 82;
- пипетки калиброванные с делениями по ГОСТ 20292 – 74 вместимостью 1,2,5,10 $см^3$;
- дозатор для отбора вытяжки 10 и 50 $см^3$ погрешностью воспроизводимости не более 2% или бюретки 2-го класса точности вместимостью 10 – 25$см^3$ по ГОСТ 20292 – 74;
- палочки стеклянные оплавленные;
- стаканы химические 200, 250, 500 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336 – 82;
- дозатор пипеточный Лайт Thermo Scintific Ленпипет 1-10мкл ТУ 9443-007-33189998-2007;
- дозатор пипеточный Лайт Thermo Scintific Ленпипет 100-1000мкл ТУ 9443-007-33189998-2007;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;
- калий-натрий виннокислый 4-водный по ГОСТ 5845-79;
- купорос медный по ГОСТ 19347-2014;

- натр едкий по ГОСТ Р 55064-2012:
- альбумин бычий сывороточный лиофилизированный 98% (Sigma Aldrich) по ТУ 10П 34-69.

2.2. Методика эксперимента

В нашем исследовании мы использовали слюну школьников 7-8 классов лицея №1 «Спутник» – 10 человек обоего пола в возрасте от 13 до 14 лет. Исследование было добровольным и анонимным. Перед пробоотбором слюны участникам необходимо было ответить на вопросы в анкете о состоянии полости рта.

Нестимулированную слюну человека собирали методом плевания без глотания, сразу после пробуждения, натощак до чистки зубов. Приблизительно было собрано 5-10 мл слюны.

Оценка содержания белка в слюне проводилась по Биуретовому методу. Белки в щелочной среде реагируют с сернокислой медью с образованием комплексных соединений, окрашенных в фиолетовый цвет. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в растворе. Основываясь на этом принципе, оценка содержания белка в слюне проводилась путем смешивания неразбавленной слюны с реагентом (45 г соли Рошелля и 15 г сульфата меди в 400 мл 0,2Н гидроксида натрия) и измерение окрашенного комплекса с использованием фотоэлектрического колориметра КФК-2 (приложение 1) на длине волны 546 нм. Для проведения калибровки использовали стандартный раствор 6 г бычьего альбумина, растворенного в 100 мл физиологического раствора. Содержание белка в пробах определяли с помощью построенного калибровочного графика зависимости концентрации белка от оптической плотности (приложение 2).

Определение pH слюны проводилось с помощью pH-метра Metler Toledo (приложение 3).

Результаты анкетирования и анализа слюны представлены в табл. 1-2.

Таблица 1

Уровень белка в слюне в зависимости от состояния полости рта школьника

Состояние полости рта	Количество опрошенных	Концентрация белка в слюне, г/л
Боль в зубах при жевании	2	1,9 ± 0,1
Кровоточивость десен	2	1,25 ± 0,05
Здоровая полость рта	6	0,75 ± 0,15

Таблица 2

Уровень pH слюны в зависимости от состояния полости рта школьника

Состояние полости рта	Количество опрошенных	Значение pH
Боль в зубах при жевании	2	6,68 ± 0,07
Кровоточивость десен	2	6,78 ± 0,03
Здоровая полость рта	6	7,58 ± 0,07

3. Обсуждение результатов

Концентрация белка в слюне школьников со здоровой полостью рта оказалась на 40% ниже, чем у школьников с кровоточивостью десен. И на 60% ниже, чем у школьников с болью в зубах во время жевания (рис.1).

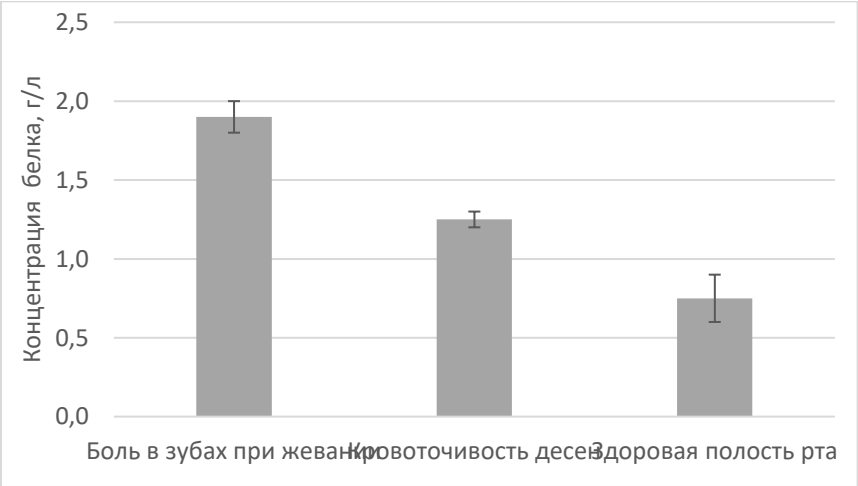

Рисунок 1. Зависимость концентрации белка в слюне школьников от состояния полости рта

Уровень pH в здоровой группе на 11% и 12% выше, чем у школьников с кровоточивостью десен и болью в зубах при жевании соответственно (рис.2).

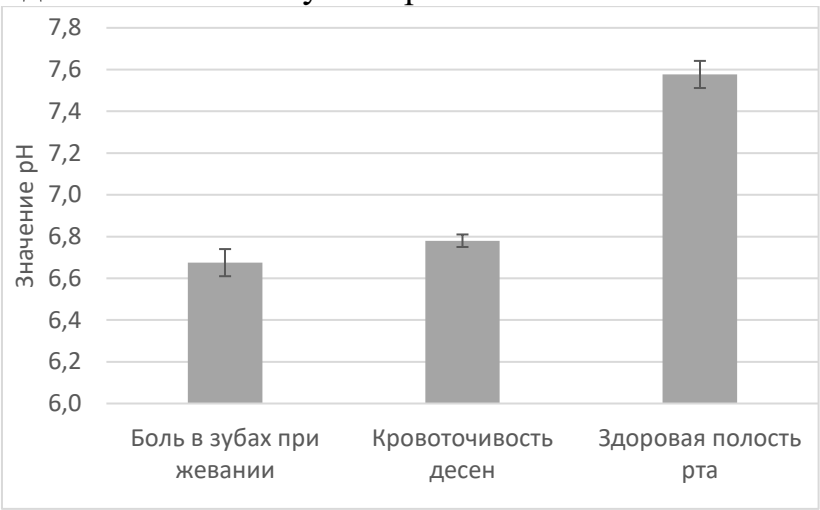

Рисунок 2. Зависимость значения pH в слюне школьников от состояния полости рта

Из анализа результатов, полученных в нашем исследовании, можно сделать вывод, что концентрации белка и pH в слюне школьников зависит от состояния полости рта. У школьников, которые жаловались на кровь во время чистки зубов и болью в зубах при жевании, наблюдается значительное увеличение общего уровня белка и уменьшение pH. Таким образом, анализ белка и pH в слюне школьников может быть использован для указания на наличие проблем полости рта и дальнейшего обращения к врачу-стоматологу.

Заключение

1. Проведен анализ научной литературы, который показал, что, слюна - единственная биологическая жидкость с уникальным набором исследовательских возможностей, предусматривающих полную неинвазивность, многократный и почти неограниченный по объему забор материала. Основное внимание клинических специалистов привлекает анализ слюны на различные параметры с целью получения разнообразной диагностической информации. Уровень pH и белка в слюне взрослых людей является показателем различных болезней полости рта. Однако, несмотря на то, что значения эти параметров в слюне сильно зависят от возраста человека, взаимосвязь содержания белка и pH в слюне школьников от состояния полости рта до сих пор не была изучена.

2. Анкетирование школьников Лицея №1 «Спутник» на предмет состояния полости рта и анализ слюны на содержание белка и pH показали, что у школьников с кровоточивостью десен и болью в зубах во время жевания наблюдается значительное увеличение уровня белка и уменьшение pH. В настоящей работе прослеживается взаимосвязь содержания белка и pH в слюне от состояния полости рта школьников. Поэтому анализ белка и pH в слюне школьников может быть использован для указания на наличие проблем

полости рта и дальнейшего обращения к врачу стоматологу.

Таким образом, гипотеза о том, что содержание белка и pH в слюне школьников зависят от состояния полости рта, подтвердилась.

В перспективе развития данной темы и практического применения результатов работы, планируется проведение исследования по оценке содержания белка и pH в слюне школьников с заболеваниями полости рта совместно с врачами стоматологической клиники «КиО», г. Самара.

Список литературы

1. Saliva: its role in health and disease. Working Group 10 of the Commission on Oral Health, Research and Epidemiology // Int. Dent. J.1998. V. 42 № 4.. P. 287–304.
2. Шатохина С. Н., Разумова С. Н., Шабалин В. Н. Морфологическая картина ротовой жидкости: диагностические возможности // Стоматология. 2006. № 4. С. 14–17.
3. Amerongen A.V. Saliva--the defender of the oral cavity // Oral. Dis. 2002.V. 8, № 1. P. 12–22.
4. Farnaud S. J., Kosti O., Getting S. J., Renshaw D. Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease // Scientific World Journal. 2010. V. 10. P. 56.
5. Dodds M. W., Johnson D. A., Yeh C. K. Health benefits of saliva: A review // J Dent. 2005. V. 33. P. 33.
6. Lusa Cadore E., Lhullier F. L., Arias Brentano M., Marczwski. Salivary hormonal responses to resistance exercise in trained and untrained middle-aged men // J. Sports Med Phys Fitness. 2009. V. 49 P. 7.
7. Wu J. Y., Yi C., Chung H. R., Wang D. J., Chang W. C. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma // Oral Oncol. 2010. V. 46. P. 31.
8. Nicolson N., Storms C., Ponds R., Sulon J. J. Gerontol A. Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging // Biol Sci Med Sci. 1997. V. 52. P. 68-75.
9. Kefalides P.T. Saliva research leads to new diagnostic tools and therapeutic options // Intern Med. 1999. V. 21. P. 991.
10. Cassiday L. J. Salivary proteome changes as women age // Proteome Res. 2009. V. 8(11). P. 4886.
11. Davidovich E. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of Down syndrome children to healthy children // J. Paediatr. Dent. 2010. Vol. 20. P. 235–241.
12. Nicolson N., Storms C., Ponds R. Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging // J. Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1997. V. 52(2). P. 68-75.
13. Савченко Е. В., Анипко Е. А. Слюна на страже наших зубов // Научно-методический электронный журнал «Концепт». 2015. Т. 25. С. 46–50.
14. J. S. Kumar, R. Gayathri, V. V. Priya. Evaluation of salivary total proteins, albumin, globulin, and albumin/globulin ratio among healthy individuals and

patients with chronic gingivitis // Drug Invention Today. V. 10. 2018. P. 925-928.
15. Mulki Shaila, G. Prakash Pai, Pushparaj Shetty. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis // J. Indian Soc Periodontol. 2013. V. 17. P. 42–46.