

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИЗОЦИМА И БЕЛКА В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ, КАК ФАКТОРА ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

Ф.Ф. КОВАЛЁВА, А.В. РОГУЛЕВ

ФГБОУ ВО «Оренбургский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Советская, д. 6, г. Оренбург, 460000, Россия

Аннотация: В современном мире человек, как социальное существо, стал более подвержен воздействию на психоэмоциональное состояние окружающих факторов. Проведение данной работы способствует доказательству непосредственного влияния факторов, воздействующих на психоэмоциональное состояние человека, на иммунологическую активность фермента лизоцима в стрессовом и устойчивом спокойном состоянии исследуемого. В работе представлены сведения об одной из иммунных реакций организма на поступающие антигены. Показано участие лизоцима в формировании антибактериальной функции ротовой жидкости. Рассмотрено влияние психоэмоционального состояния человека на активность фермента. Представлены результаты исследования зависимости воздействия факторов окружающей среды на активность данного органического вещества. Описаны результаты и ход проведения оценки лизоцимной активности нефелометрическим методом. Данную статью могут использовать студенты лечебного и стоматологического факультетов в качестве дополнительной информации с целью повышения качества получаемых профессиональных знаний.

Ключевые слова: нефелометрический метод, лизоцим, антибактериальная активность, психоэмоциональное состояние, мурамидаза, пептидогликан.

DETECTION OF PROTEIN AND LYSOZYME IN THE ORAL FLUID AS A FACTOR OF EMOTIONAL STATE

A.V. ROGULEV, F.F. KOVALEVA

FSBEI HE "Orenburg medical University" of the Ministry of health of the Russian Federation, Sovetskaya St., 6, Orenburg, 460000, Russia

Abstract. In the modern world, a man, as a social being, has been more exposed to effect psychoemotional state of the surrounding factors. This work proves direct influence of factors affecting the psycho-emotional state of a person on the immunological activity of the enzyme lysozyme in a stressful and stable calm state of the tested. The paper presents information about one of the body's immune responses to incoming antibodies. The involvement of lysozyme in the formation of antibacterial function of oral fluid has been shown. The influence of human psycho-emotional state on enzyme activity has been considered. This work presents the results dependence of environment factor influence on the activity of this organic substance. The results and the course of the evaluation of lysozyme activity by nephelometric method have been described. For recount lysozyme activity the common protein has been determined by biuret method. This article can be used by students of medical and dental faculties as additional information to improve the quality of professional knowledge.

Keywords: nephelometric method, lysozyme, antibacterial activity, psycho-emotional state, muramidase, peptidoglycan.

Введение. Работа базируется на изучении изменения активности лизоцима, входящего в состав ротовой жидкости человека. Обращая внимание на состав ротовой жидкости, нельзя не отметить, что в него входят множество компонентов, отвечающих за местный иммунитет организма, при этом первоначальная роль лизоцима так же является обеспечение местного иммунитета ротовой полости. Известно большое количество работ определяющих активность изучаемого фермента при разных психоэмоциональных состояниях исследуемых [7-10]. Мурамидаза являющейся компонентом ротовой жидкости, покрывающей слизистую оболочку рта, обеспечивает защитную функцию слюны, сопровождающей пищевой комочек из окружающей среды по желудочно-кишечному тракту. Структура лизоцима, помимо ротовой полости, встречается в разных отделах тонкого кишечника, осуществляющей защиту этой области организма человека. Полагаясь на специфический механизм действия исследуемого фермента по отношению к муреиновой оболочке бактерий, можно судить о его косвенном участии в формировании иммунного ответа. В итоге лизоцим, как фермент, представляет большой интерес для изучения его активности, так как знания этих аспектов позволит сделать выводы о частичном снижении

или повышении иммунитета человека при воздействии окружающих факторов на его психологическое состояние.

Цель исследования – проведение необходимых экспериментов для определения закономерной взаимосвязи активности лизоцима с психоэмоциональным состоянием человека.

Лизоцим – структура, состоящая из 130 аминокислотных остатков, составляющая часть компонентов ротовой жидкости организма, обладающая бактерицидным действием, является частью иммунологической составляющей тканевых жидкостей организма, активно контактирующей с окружающей средой [1, 3]. В 1909 году Павел Николаевич Лашенков впервые обнаружил протеолитическую функцию фермента, выборочно повреждающего клеточные стенки бактерий [5]. Впоследствии более точно описали его протеолитическое свойство гидролизировать *B*-1,4 гликозидные связи между *N*-ацетилмурамовой и *N*-ацетилглюкозамина, находящиеся в структуре пептидогликанов клеточной стенки преимущественно грамположительных бактерий [4]. Высокая экспрессия лизоцима наблюдается в кроветворных клетках, а именно в гранулоцитах, моноцитах и макрофагах [2]. В норме в организме в сутки вырабатывается порядка около 500 граммов лизоцима.

Интерес вызывает механизм лизиса, заключающийся в закреплении центрами фермента двух остатков аминокислот, связанных *B*-1,4 гликозидной связью, формирования конформационного состояния связи, близкого к переходному, при котором связь между *D* и *E* активными центрами легко разрушается. Таким образом фермент за счет активных центров (*A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*), расположенных между двумя доменами мурамидазы, осуществляется гидролиз бактериальной оболочки [4].

Материалы и методы исследования. Суточная культура лизоцим – чувствительных микрококков *M. lysodecticus* (штамм 2665 ГКИ им. Л. А. Тарасевича), исследуемый материал (ротовая жидкость), физ. раствор (*NaCl* 0,9%), центрифужные пробирки в количестве 32 штук, спектрофотометр на длине волны в 540 нм, биуретовый реактив: 0,15 г *CuSO₄·5H₂O* и 0,6 г *NaKC₄H₄O₆·4H₂O*, раствор *NaOH*

Проводили сбор материала в два этапа психоэмоциональных состояниях (утреннее время выходного дня, как момент наименее стрессового состояния человека, а также момент перед сдачей экзамена первой сессии исследуемых студентов, как момент наиболее стрессового состояния человека). Для сбора в один этап предоставлялись 2 центрифужные пробирки по 1,5 мл.

Рекомендацией перед сбором было ополаскивание ротовой полости теплой кипяченой водой, после чего осуществлять набор материала непосредственно выделением смешанной ротовой жидкости в пробирку.

Следующим этапом пробирки подписывались и подвергались экстренной заморозке.

Собирали исследуемую жидкость в виде наполненных замороженным биоматериалом для исследования, подписанных центрифужных пробирок объемом 1,5 мл по 4 штуки (по 2 пробирки на каждом из этапов сбора) с исследуемого человека.

Определение активности лизоцима проводилась нефелометрическим методом. В этом случае об активности лизоцима судили по изменению степени светопропускания опытной микробной взвеси микрококка по сравнению с исходной.

Исследование активности лизоцима проводилось по способу, который описали И.В. Марьянская, В.И. Ашкинази, Г.А. Савельева с изменениями (в связи с целью получения данных изменения единиц абсорбции для их непосредственного сравнения и анализа проводилось определение показателя светопоглощения у смеси микрококков с ротовой жидкостью, измерение проводилось каждые 5 минут при длине волны в 540 нм) [5].

Для определения содержания белка в биоматериале к 1 мл раствора, содержащего от 2 до 10 мг белка, добавляли 4 мл биуретового реактива. Пробы перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 мин, после чего фотометрировали при 540 нм. По полученным результатам строили калибровочный график зависимости оптической плотности раствора D_{540} от концентрации белка.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе проведения исследования мы наблюдали постепенное разрушение муреиновой оболочки инактивированных микрококков, выращиваемых до эксперимента в течение 24 ч., которая впоследствии смешивается с ротовой жидкостью в ячейке плашки. Под влиянием лизоцима можно обнаружить постепенное снижение показателей оптической плотности раствора, что говорит о снижении количества культуры микрококков, вследствие лизиса их [4].

По результатам изменения единиц оптической плотности в условных единицах можно конкретно судить о непосредственном участии фермента в процессе, результатом которого является снижение содержания количества микрококков в смеси. Определили прямую зависимость между снижением оптической плотности и абсолютным показателям активности лизоцима. На этом основании единицы абсорбции приняли за условные значения активности лизоцима.

В дальнейшем к имеющемуся биоматериалу добавляли биуретовый реактив (0,15 г *CuSO₄·5H₂O* и 0,6 г *NaKC₄H₄O₆·4H₂O*), и по истечению 10 минут проводили анализ содержания белка. Определение проводилось спектрофотометром *Apel* (*AP-101*, Япония) со светофильтром на длину волны в 540 нм.

При проведении анализа общего белка наблюдали образовании в щелочной среде окрашенного в

фиолетовый цвет комплекса пептидных связей с ионами двухвалентной меди.

Содержание белка в исследуемом растворе рассчитывают по формуле (2), формируют систематизированные знания о количестве общего белка

$$D/0,431=K \quad (1)$$

$$C=K \times 10 \quad (2)$$

где D – оптическая плотность взвеси, а C – концентрация белка

Таблица 1

Результаты содержания общего белка

общий белок	
1 испытуемый <i>max</i>	4,24
1 испытуемый <i>min</i>	3,11
2 испытуемый <i>max</i>	4,24
2 испытуемый <i>min</i>	3,8
3 испытуемый <i>min</i>	2,32
3 испытуемый <i>max</i>	2,87
4 испытуемый <i>min</i>	2,5
4 испытуемый <i>max</i>	4,13
5 испытуемый <i>max</i>	3,15
5 испытуемый <i>min</i>	3,55
6 испытуемый <i>min</i>	3,27
6 испытуемый <i>max</i>	2,46
7 испытуемый <i>min</i>	2,8
7 испытуемый <i>max</i>	3,66
8 испытуемый <i>min</i>	3,22
8 испытуемый <i>max</i>	3,73

Имея результаты проведения исследования ротовой жидкости на общий белок, а также на абсорбционную способность при взаимодействии с культурой микрококков, можно сделать пересчет полученной активности на белок, чтобы все результаты исследования можно было сопоставить в стандартизированной форме. В свою очередь условные единицы активности преобразуем в значения активности фермента путем осуществления пересчета значений условных единиц активности фермента на количество белка.

Стоит заметить, что у каждого испытуемого по результатам исследования было заметно влияние фактора психоэмоционального воздействия, при котором у человека активность фермента снижалась.

В подтверждение наших наблюдений в табл. 2 приводятся показания средних значений активности лизоцима (у.е/мг)

Таблица 2

Среднее значение активности лизоцима

1 испытуемый <i>max</i>	0,001703354	5 испытуемый <i>max</i>	0,001587302
1 испытуемый <i>min</i>	0,000928903	5 испытуемый <i>min</i>	0,000406886
2 испытуемый <i>max</i>	0,000733753	6 испытуемый <i>min</i>	0,000237853
2 испытуемый <i>min</i>	0,000964912	6 испытуемый <i>max</i>	0,001129178
3 испытуемый <i>min</i>	0,001867816	7 испытуемый <i>min</i>	0,003809524
3 испытуемый <i>max</i>	0,001277584	7 испытуемый <i>max</i>	0,001123254
4 испытуемый <i>min</i>	0,003911111	8 испытуемый <i>min</i>	0,001449275
4 испытуемый <i>max</i>	0,000780199	8 испытуемый <i>max</i>	0,001221329

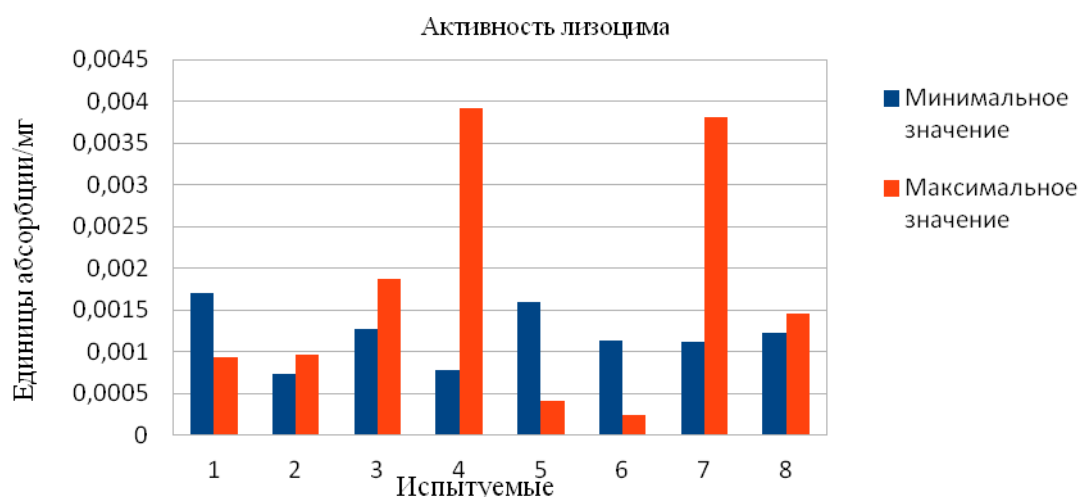


Рис. Активность лизоцима

Таким образом, при анализе полученных в результате исследования данных табл. 2 и гистограммы можно заметить, что у испытуемых номер 1, 5, 6 показания активности лизоцима в момент наибольшей психоэмоциональной нагрузки на психосоматику больше, чем в момент наибольшей независимости от факторов окружающей среды. В свою очередь остальные испытуемые в момент наибольшей нагрузки имели меньшую активность данного фермента в сравнении с показателями активности в момент отсутствия влияния внешних факторов на психоэмоциональное состояние человека, что говорит о снижении иммунологической активности ротовой жидкости. В среднем разность усредненных показателей удельной активности лизоцима составляет $0,001373 \pm 0,00067$ у.е./мг. В итоге можно судить о том, что стрессовые факторы, воздействуя на психоэмоциональное состояние человека, снижают иммунную активность ротовой жидкости. Данную статью могут использовать студенты лечебного и стоматологического факультетов в качестве дополнительной информации с целью повышения качества получаемых профессиональных знаний.

Благодарности

Работы по исследованию измерения величины абсорбции проводились при поддержке ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН

Литература

1. Азнабаева Л.М., Федорова Т.О., Укубаева Д.Г., Михайлова Е.А., Киргизова С.Б., Фомина М.В., Миронов А.Ю. Лизоцим слюны и антилизоцимная активность микроорганизмов – представителей биотопа миндалин больных хроническим тонзилитом. М., 2017. С. 238–240.
2. Субботкина Т.А. Субботкин М.Ф. Лизоцим у карповых рыб (cyprinidae) из различных климатических зон. М., 2015. С. 118–125.
3. Егоров И.А., Егорова Т.В. Применение водорастворимой формы алтавим лизоцим при выращивании цыплят-бройлеров. М., 2015. С. 4–6.
4. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Нуждина А.В., Дмитриева О.А., Овчинникова Е.Д., Смирнов С.А., Тишков В.И., Еремеев Н.Л. Кинетические особенности лизиса живых бактерий иммобилизованным лизоцимом. Тверь, 2018. С. 203–204.
5. Декина С.С., Романовская И.И., Леоненко И.И., Егорова А.В. Мукоадгезивный гель с иммобилизованным лизоцимом: получение и свойства. Киев, 2015. С. 104–109.
6. Гордина Е.М., Горовиц Э.С., Лемкина Л.М., Поспелова С.В. Изучение устойчивости к лизоциму бактерий рода *staphylococcus*. Казань, 2018. С. 12–14.
7. Шишкова Ю.С., Филимонова О.И., Емелина А.С., Липская А.Д., Хасанова Д.М., Бабилова М.С., Тезиков Д.А. Содержание лизоцима в слюне пациентов с несъемными зубными протезами. М., 2014. С. 478–480.
8. Рогова Л.Н., Фоменко И.В., Тимошенко А.Н. Иммунологическая и микробиологическая характеристика слизистой оболочки полости рта у детей с врожденной расщелиной верхней губы и нёба (обзор литературы). Волгоград, 2016. С. 19–22.

9. Лобанец В.Я. Иммунологическая реактивность и неспецифические механизмы защиты в условиях развития пародонтита у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью. М., 2015. С. 4.
10. Фаропонова Е.А. Биохимические показатели ротовой жидкости при заболеваниях пародонта у детей с психоневрологическими расстройствами. Краснодар, 2017. С. 22.

References

1. Aznabaeva LM, Fedorova TO, Ukubaeva DG, Mihajlova EA, Kirgizova SB, Fomina MV, Mironov AJu. Lizocim sljunny i antilizocimnaja aktivnost' mikroorganizmov – predstavitelej biotopa mindalin bol'nyh hronicheskim tonsilitom [Saliva lysozyme and antilysozyme activity of microorganisms - representatives of the biotope of tonsils of patients with chronic tonsillitis]. Moscow; 2017. Russian.
2. Subbotkina TA, Subbotkin MF. Lizocim u karpovyh ryb (cyprinidae) iz razlichnyh klimaticeskikh zon [Lysozyme in carp fish (cyprinidae) from various climatic zones]. Moscow; 2015. Russian.
3. Egorov IA, Egorova TV. Primenenie vodorastvorimoj formy altavim lizocim pri vyrashhivanii cyplyat-brojlerov [The use of a water-soluble form of altavim lysozyme when growing broiler chickens]. Moscow; 2015. Russian.
4. Levashov PA, Matolygina DA, Nuzhdina AV, Dmitrieva OA, Ovchinnikova ED, Smirnov SA, Tishkov VI, Eremeev NL. Kineticheskie osobennosti lizisa zhivyh bakterij immobilizovannym lizocimom [Kinetic features of the lysis of living bacteria with immobilized lysozyme]. Tver'; 2018. Russian.
5. Dekina SS, Romanovskaja II, Leonenko II, Egorova AV. Mukoadgezivnyj gel' s immobilizovannym lizocimom: poluchenie i svojstva [Mucoadhesive gel with immobilized lysozyme: preparation and properties]. Kiev; 2015. Russian.
6. Gordina EM, Gorovic JeS, Lemkina LM, Pospelova SV. Izuchenie ustojchivosti k lizocimu bakterij roda staphylococcus [Studying lysozyme resistance of bacteria of the genus staphylococcus]. Kazan'; 2018. Russian.
7. Shishkova JuS, Filimonova OI, Emelina AS, Lipskaja AD, Hasanova DM, Babikova MS, Tezikov DA. Soderzhanie lizocima v sljune pacientov s nesemnymi zubnymi protezami [The content of lysozyme in the saliva of patients with fixed dentures]. Moscow; 2014. Russian.
8. Rogova LN, Fomenko IV, Timoshenko AN. Immunologicheskaja i mikrobiologicheskaja karakteristika slizistoj obolochki polosti rta u detej s vrozhdjonnoj rasshhelinoj verhnej guby i njoba (obzor literatury) [Immunological and microbiological characteristics of the oral mucosa in children with congenital cleft lip and palate (literature review)]. Volgograd; 2016. Russian.
9. Lobanec VJa. Immunologicheskaja reaktivnost' i nespecificheskie mehanizmy zashhity v uslovijah razvitija parodontita u bol'nyh s gastrojezofageal'noj refljuksnoj boleznu [Immunological reactivity and non-specific defense mechanisms in the development of periodontitis in patients with gastroesophageal reflux disease]. Moscow; 2015. Russian.
10. Faroponova EA. Biohimicheskie pokazateli rotovoj zhidkosti pri zabelevanijah parodontita u detej s psihonevrologicheskimi rassstrojstvami [Biochemical indicators of oral fluid in periodontal diseases in children with neuropsychiatric disorders]. Krasnodar; 2017. Russian.

Библиографическая ссылка:

Ковалёва Ф.Ф., Рогулев А.В. Определение лизоцима и белка в ротовой жидкости, как фактора психоэмоционального состояния // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2020. №1. Публикация 1-9. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2020-1/1-9.pdf> (дата обращения: 12.02.2020). DOI: 10.24411/2075-4094-2020-16497. *

Bibliographic reference:

Rogulev AV, Kovaleva FF. Opredelenie lizocima i belka v rotovoj zhidkosti, kak faktora psihoemocional'nogo sostoyaniya [Detection of protein and lysozyme in the oral fluid as a factor of emotional state]. Journal of New Medical Technologies, e-edition. 2020 [cited 2020 Feb 12];1 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/vnmt/bulletin/e2020-1/1-9.pdf>. DOI: 10.24411/2075-4094-2020-16497.

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2020-1/e2020-1.pdf>