

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Годовалов А.П., Яковлев М.В., Задорина И.И.

МИКРОВАРИАНТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614000, Пермь, Россия

Известно, что по концентрации альфа-амилазы в слюне можно определить ее каталитическую активность, снижение которой происходит при различных патологических процессах в полости рта. Подавляющее количество способов определения каталитической активности ферментов предполагают использование большого объема реагентов и образцов, что затрудняет исследование слюны в больших группах. Цель исследования - оценить возможности применения микроварианта реакции для определения активности альфа-амилазы слюны, а также проанализировать зависимость активности фермента от его концентрации. Материал и методы. Слюну получали у 15 людей с интактным пародонтом и зубным рядом, без соматической патологии. Для исследований in vitro готовили растворы альфа-амилазы с концентрацией фермента 10; 5; 2,5; 1; 0,5 и 0,25 мг/мл ex tempore. Для экономии образцов и реагентов объем участников реакции пропорционально уменьшили. Дальнейшую процедуру анализа осуществляли согласно инструкции производителя набора реагентов «АМИЛАЗА-ВИТАЛ» для определения активности альфа-амилазы. Статистический анализ результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента в программе Statistica 7.0. Результаты. Показана сопоставимость результатов определения активности альфа-амилазы с помощью классического и микроплашетного вариантов реакции. При увеличении концентрации альфа-амилазы от 0 до 2,5 мг/мл наблюдается прямо-пропорциональное возрастание активности фермента. В случае увеличения концентрации альфа-амилазы выше 2,5 мг/мл показано снижение ее активности, что возможно связано с выпадением части фермента в осадок. Активность фермента в слюне практически здоровых лиц при использовании микроварианта реакции составила - $528,6 \pm 2,4$ Е/л. Заключение. Таким образом, использование микроварианта реакции определения активности альфа-амилазы может быть оправдано для большого числа обследуемых. Показана линейная зависимость активности фермента от его концентрации в пределах 0-2,5 мг/мл.

Ключевые слова: альфа-амилаза; слюна; микровариант реакции; амилолитическая активность.

Для цитирования: Годовалов А.П., Яковлев М.В., Задорина И.И. Микровариант определения амилолитической активности альфа-амилазы слюны, Российский стоматологический журнал. 2019; 23 (3-4): 115-117. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2019-23-3-4-115-117>

Godovalov A.P., Yakovlev M.V., Zadorina I.I.

MICROTEST FOR THE DETERMINATION OF THE AMYLOLYTIC ACTIVITY OF SALIVA ALPHA-AMYLASE

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, 614000, Perm, Russia

It is known that the concentration of alpha-amylase in saliva can determine its catalytic activity, the decrease of which occurs during various pathological processes in the oral cavity. The overwhelming number of methods for determining the catalytic activity of enzymes involve the use of a large volume of reagents and samples, which makes it difficult to study saliva in large groups. The purpose of the study is to evaluate the possibility of using the microvariation of the reaction to determine the activity of saliva alpha-amylase, as well as to analyze the dependence of the enzyme activity on its concentration. Materials and methods. Saliva was obtained from 15 people with intact periodontal disease and the dentition, without somatic pathology. For in vitro studies, alpha-amylase solutions were prepared with an enzyme concentration of 10; five; 2.5; one; 0.5 and 0.25 mg / ml ex tempore. To save samples and reagents, the volume of the reaction participants was proportionally reduced. The further analysis procedure was carried out according to the instructions of the manufacturer of the «AMYLASE-VITAL» reagent kit to determine the activity of alpha-amylase. Statistical analysis of the results was performed using the Student's t-test in the program Statistica 7.0. Results. The comparability of the results of determining the activity of alpha-amylase using the classical and microplate variants of the reaction is shown. With an increase in alpha-amylase concentration from 0 to 2.5 mg / ml, a directly proportional increase in enzyme activity is observed. In the case of an increase in the concentration of alpha-amylase above 2.5 mg / ml, a decrease in its activity is shown, which may be due to the precipitation of a part of the enzyme. The activity of the enzyme in saliva of practically healthy individuals using the microvariation of the reaction was 528.6 ± 2.4 U / l. In conclusion the use of a microvariant of the reaction for determining the activity of alpha-amylase may be justified for a large number of subjects. A linear dependence of the enzyme activity on its concentration in the range of 0-2.5 mg / ml is shown.

Key words: alpha-amylase; saliva; micro reaction option; amylolytic activity.

For citation: Godovalov A.P., Yakovlev M.V., Zadorina I.I. Microtest for the determination of the amylolytic activity of saliva alpha-amylase. Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal. 2019; 23(3-4): 115-117. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2019-23-3-4-115-117>

For correspondence: Yakovlev Mikhail V., student of dentistry faculty, Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, mikhailyak@mail.ru

Information about authors:

Godovalov A.P., <http://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 04.03.2019

Accepted 16.04.2019

Для корреспонденции: Яковлев Михаил Владимирович, студент стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, E-mail: mikhailyak@mail.ru

Введение

Многочисленными исследованиями показано снижение активности различных ферментов слюны при патологических процессах в пародонте и твердых тканях зуба. Альфа-амилаза не является исключением [1, 2]. Известно, что от концентрации ферментов в сложных биологических растворах может зависеть их каталитическая активность. Изучение этой концентрации необходимо для определения степени тяжести стоматологической патологии и выбора правильной стратегии лечения [3].

Большинство способов определения каталитической активности альфа-амилазы основано на детекции способности фермента расщеплять субстрат, а именно крахмал, так как альфа-амилаза гидролизует 1,4-гликозидные связи в молекулах сложных углеводов [4]. Однако известны и другие подходы к оценке активности альфа-амилазы. Ряд авторов используют определение количества газа, выделяющегося в процессе реакции (манометрический метод), или фиксируют изменение оптического вращения (поляриметрический метод). Для количественного определения расщепленного ферментом субстрата (крахмала) применяют фотометры, которые позволяют изучить скорость ферментативной реакции по изменению поглощения субстрата при определенной длине волны [5].

Зачастую для реакций, входящих в данные методы, требуется большой объем реагентов и образцов, что затрудняет исследование слюны, особенно у большой группы людей одновременно. С другой стороны, химическая промышленность выпускает альфа-амилазу в сухом виде, поэтому требуются методы определения каталитической активности растворов с различной концентрацией фермента при его растворении.

Цель исследования – оценить возможность применения микроварианта реакции, определения активности альфа-амилазы слюны, а также проанализировать зависимость активности фермента от его концентрации.

Материал и методы

Активность альфа-амилазы определяли набором реагентов «АМИЛАЗА-ВИТАЛ» (Россия). Для экономии образцов и реагентов использовали полистироловый плоскодонный планшет для иммуноферментного анализа с объемом лунки 0,3 мл, а объем участников реакции пропорционально уменьшили. Дальнейшую процедуру анализа осуществляли согласно инструкции производителя. Для детекции окрашенного продукта применяли спектрофотометр PowerWave X (США).

Для определения концентрации альфа-амилазы использовали приготовленные *ex tempore* растворы альфа-амилазы (Россия) с концентрацией фермента 10; 5; 2,5; 1; 0,5 и 0,25 мг/мл соответственно. Пробы слюны в объеме 0,1 мл отбирали натощак у 15 человек в возрасте 20–25 лет с интактным пародонтом и зубным рядом без соматической патологии, согласно К.Н. Меньнику и соавт. [6].

Статистический анализ результатов выполняли с помощью *t*-критерия Стьюдента в программе Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов сравнивали результаты определения активности альфа-амилазы микропланшетным и классическим методами. Показано отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$), что позволило нам использовать для дальнейших исследований только микропланшетный вариант.

В ходе исследований выявлена прямая зависимость активности альфа-амилазы от следующих ее концентраций – 2,5; 1; 0,5; 0,25 и 0 мг/мл соответственно. Так, с увеличением концентрации фермента в 2 раза его каталитическая активность увеличивается более чем в 1,3 раза. Напротив, активность растворов фермента с концентраций выше 2,5 мг/мл начинает снижаться. Активность раствора альфа-амилазы с концентрацией фермента 5 мг/мл снижается более чем в 1,2 раза по сравнению с активностью данного фермента в концентрации 2,5 мг/мл. В свою очередь активность раствора с 10 мг/мл альфа-амилазы снижается более чем в 1,5 раза по сравнению с активностью данного фермента в растворе с концентрацией 5 мг/мл.

Известно, что у здоровых людей активность альфа-амилазы слюны составляет в среднем 530 Е/л [7]. При использовании микропланшетного варианта реакции установлено, что активность фермента у 15 доноров с интактным пародонтом и зубным рядом без соматической патологии – $528,6 \pm 2,4$ Е/л.

В целом, на современном этапе развития медицинской науки все большее предпочтение отдается микрообъемным вариантам классических реакций. Подобная ситуация позволяет увеличивать группы обследуемых лиц, проводить исследования одновременно, а также использовать компьютерную обработку результатов. Предлагаемый микровариант реакции определения активности альфа-амилазы обладает всеми вышеперечисленными характеристиками. В ходе исследований показано, что в диапазоне концентрации альфа-амилазы 0–2,5 мг/мл ее активность нарастает, а при дальнейшем увеличении количества фермента его активность снижается. Подобное явление может быть обусловлено меньшей растворимостью насыщенного раствора и выпадением фермента в осадок, что необходимо учитывать при приготовлении растворов альфа-амилазы.

Заключение

Таким образом, показано, что предлагаемый микровариант определения активности альфа-амилазы может быть использован наряду с классическим вариантом реакции, обладает рядом преимуществ за счет увеличения числа проб для одномоментного исследования и снижения объемов, используемых реагентов. Выявлен диапазон концентраций альфа-амилазы (0–2,5 мг/мл), когда наблюдается прямая зависимость с активностью фермента.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feng Y., Li Q., Chen J., Yi P., Xu X., Fan Y., et al. Salivary protease spectrum biomarkers of oral cancer. *Int J. Oral Sci.* 2019;11(1): 7.
2. Zhang Q., Chen B., Zhu D., Yan F. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: A cross-sectional study. *Arch. Oral Biol.* 2016; 72: 92–8.
3. МаксUTOва В.О., Цветков В.О., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И. Определение активности амилolyтических ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в полиакриламидном геле. *Доклады Башкирского университета*, 2017; 295): 736–40.
4. Садовничий В.А., Ветров Д.П., Вишнеvский В.В. и др. Математический метод определения каталитической активности ферментов в сложных биологических растворах. *Интеллектуальные системы. Теория и приложения (ранее: Интеллектуальные системы по 2014, № 2, ISSN 2075-9460)*. 2013; 17(1–4. — С.): 517–22.
5. Яковлев М.В., Батог К.А. Изучение антибиопленочной активности альфа-амилазы. *Материалы XVII научной конференции молодых ученых и специалистов с международным участием «Молодые ученые – медицине»*. Владикавказ; 2018: 339–41.
6. Мельник К.Н., Баишева Г.М., Гильмиярова Ф.Н., Аллатова Т.А. Саливадиагностика как метод определения иммунологической адаптации к учебному стрессу в условиях различного питьевого поведения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(6): 353–7.
7. Биохимия ротовой жидкости в норме и при патологии. Учебно-методическое пособие. Под ред. Шестопалова А.В. /ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России. М.: ИКАР; 2017.

REFERENCES

1. Feng Y., Li Q., Chen J., Yi P., Xu X., Fan Y., et al. Salivary protease spectrum biomarkers of oral cancer. *Int J. Oral Sci.* 2019;11(1): 7.
2. Zhang Q., Chen B., Zhu D., Yan F. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: A cross-sectional study. *Arch. Oral Biol.* 2016; 72: 92–8.
3. Maksutova V.O., Tsvetkov V.O., Shpirmaya I.A., Ibragimov R.I. Determination of amylolytic enzyme activity by hydrolysis of a substrate immobilized in a polyacrylamide gel. *Doklady Bashkirskogo Universiteta*. 2017; 295): 736–40. (in Russian)
4. Sadovnichiy V.A., Vetrov D.P., Vishnevsky V.V., et al., Mathematical Method for Determining the Catalytic Activity of Enzymes in Complex Biological Solutions. *Intellektualnye systemy. Teoriya i prilozheniy* (previously: Intellectual Systems 2014, No. 2, ISSN 2075-9460), 2013; 17(1–4. — С.): 517–22. (in Russian)
5. Yakovlev M.V., Batog, K.A. *Study of the anti-biofilm activity of alpha-amylase // Proceedings of the XVII Scientific Conference of Young Scientists and Specialists with International Participation «Young Scientists to Medicine»*. Vladikavkaz; 2018: 339–41. (in Russian)
6. Melnik K.N., Baisheva G.M., Gilmiyarova F.N., Allatova T.A. Salivadiagnosis as a method for determining the immunological adaptation to educational stress in different drinking behavior. *Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika* 2018; 63(6): 353–7. (in Russian)
7. Biochemistry of oral fluid in health and disease. Teaching manual. Ed. A.V. Shestopalov. Pirogov FGBOU, Ministry of Health of Russia. Moscow: IKAR Publishing; 2017. (in Russian)

Поступила 04.03.2019

Принята в печать 16.04.2019