

СЛИННА АЛЬФА-АМІЛАЗА ЯК МАРКЕР СТРЕСОРНОЇ РЕАКЦІЇ ОРГАНІЗМУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Цубер В.Ю., Тарасенко Л.М.

УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ, м. Полтава

Проведено аналіз літератури, що стосується застосування слинної альфа-амілази як індикатора психоемоційного стресу та маркера активності симпато-адреналової системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: слинна альфа-амілаза, ротова рідина, психоемоційний стрес

Слина як легкодоступний об'єкт неінвазивного методу дослідження дозволяє вирішувати складні питання психосоматичних змін під впливом стресогенних факторів. В цьому аспекті значний інтерес представляє слинна альфа-амілаза, яка складає біля 40% білків ротової рідини (змішаної слини)¹.

Слинна альфа-амілаза

Слинна альфа-амілаза (α -1,4- α -D-глюкан 4-глюкангідролаза, К.Ф. 3.2.1.1) - один з найважливіших ферментів ротової рідини, є ендоглюкозидазою, яка, діючи на α -1-4 глікозидні зв'язки амілози, амілопектину, глікогену, розщеплює їх до декстринів, мальтози, ізомальтози і, таким чином, є першою ланкою в процесі травлення гомополісахаридів.

Слинна альфа-амілаза складає від 40% до 50% загального білка ротової рідини, синтезується ацинарними клітинами переважно (80%) привушних слинних залоз [39].

Як і більшість інших макромолекул слини, альфа-амілаза є мультифункціональною молекулою [21]. Крім участі в травленні полісахаридів, слинна альфа-амілаза має як мінімум дві відомі біологічні функції: зв'язується з високою афінністю з певними видами стрептококів, що населяють ротову порожнину та сприяє агрегації бактерій в ротовій

¹ В подальшому тексті – ротова рідина

рідині, перешкоджаючи їх адгезії до поверхні зубів [7, 22]. Будучи зв'язаною з бактеріями, альфа-амілаза зберігає свою ферментативну активність, тому що містить окремі, але схожі за будовою активні центри для розщеплення вуглеводів та для зв'язування бактерій [31]. Але одночасно альфа-амілаза, що входить до складу зубної пелікули, може сприяти адгезії мікроорганізмів до поверхні зубів та гідролізу бактеріями крохмалю з утворенням органічних кислот, що сприяє розвитку карієсу.

Будова та властивості ферменту

Молекула альфа-амілази складається з 496 амінокислотних залишків. Альфа-амілаза є металоферментом, коферментом якого є іон кальцію, що стабілізує первинну та вторинну структуру ферменту. Один моль кальцію припадає на один моль ферменту. Наявність у ротовій рідині хлорид-, бромід- та іодид-іонів підвищує активність альфа-амілази. За амінокислотним складом слинна альфа-амілаза на 94% подібна до панкреатичної альфа-амілази людини [1] та на 97% - до панкреатичної альфа-амілази свині [18], тому панкреатична альфа-амілаза свині може слугувати моделлю будови слинної альфа-амілази.

Відомо декілька ізоферментів слинної альфа-амілази, що відрізняються амінокислотним складом та наявністю залишків вуглеводів. Плазма крові містить дві ізоформи альфа-амілази – слинну (s-тип) та панкреатичну (p-тип) у співвідношенні 45% та 55% відповідно. Відновлення та алкілювання дисульфідних зв'язків у молекулі альфа-амілази призводить до повної втрати ферментативної активності [31]. Припускається, що в активному центрі альфа-амілази містяться залишки гістидину [31] та аспарагінової кислоти [38]. Температурним оптимумом активності ферменту є 37 – 40° С. Оптимальне значення рН для активності альфа-амілази коливається в межах 6,7 – 7,4. Фермент зберігає порівняно високу активність у лужному середовищі, його активність починає поступово знижуватись при рН 9,0. Фермент інактивується при низьких величинах рН, тому травлення вуглеводів, що почалося в ротовій порожнині, припиняється у кислому

середовищі шлунка. Слинна альфа-амілаза не втрачає активності при кімнатній (22° C) і більш високих температурах (37° C) до трьох тижнів [11]. Декілька циклів заморожування та розморожування не впливають на активність цього ферменту. Однократне заморожування – розморожування рекомендують для зменшення в'язкості слини, обумовленої наявністю муцинів, з метою підвищення точності відбору піпеткою потрібного об'єму матеріалу [29].

Секреція альфа-амілази

Ацинарні клітини іннервуються як симпатичним, так і парасимпатичним відділами вегетативної нервової системи (ВНС), які, зокрема, контролюють секрецію альфа-амілази. Центр слиновиділення (ретиккулярна формація) знаходиться під регулюючим впливом кори головного мозку. Нейротрансмітери зв'язуються зі специфічними рецепторними білками біомембрани, викликаючи різке збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Це призводить до посилення транспорту рідини та електролітів та помірному вивільненню білків. Показано, що симпатична стимуляція викликає повільну секрецію слини з високою активністю альфа-амілази, тоді як при парасимпатичній стимуляції вміст органічних речовин та активність альфа-амілази в слині є низькими [5]. При комбінованій симпатичній і парасимпатичній стимуляції секреція альфа-амілази була набагато вищою, ніж при сумі парціальних стимуляцій окремих відділів ВНС. При парасимпатичній стимуляції запас альфа-амілази в ацинарних гранулах набагато швидше відновлюється завдяки її синтезу, ніж при симпатичній стимуляції [6].

Нейромедіатор симпатичних нейронів норадреналін взаємодіє як з альфа-, так і з бета-адренорецепторами ацинарних клітин. Активація альфа-рецепторів пов'язана з підвищенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію, тоді як активація бета-рецепторів викликає збільшення концентрації внутрішньоклітинного цАМФ. Це призводить до посиленого виділення секреторних білків, що зберігаються у зв'язаних з мембраною гранулах [9]. У

дослідженнях на щурах було виявлено, що стимуляція бета-адренорецепторів збільшує концентрацію альфа-амілази в 30 разів, тоді як стимуляція альфа-адренорецепторів – в 10 разів [35]. Блокатори бета-адренорецепторів зменшують секрецію альфа-амілази [20] та протидіють підвищенню активності альфа-амілази, яке відбувається у відповідь на дію стресорних факторів на організм [37]. Стимуляція симпатичного відділу ВНС антагоністом альфа-2-адренорецепторів йохімбіном значно підвищує активність цього ферменту в ротовій рідині [12].

Альфа-амілаза та адгезія мікроорганізмів до поверхні зуба

Встановлено, що альфа-амілаза входить до складу набутої пелікули зубної емалі і може слугувати акцептором при адгезії мікроорганізмів до поверхні зуба [4]. Фермент *in vitro* стимулює адгезію амілазозв'язуючих бактерій до гідроксиапатиту [32]. Інгібітор альфа-амілази значно знижує частоту карієсу у щурів, яких тримали на дієті з термічно обробленого крохмалю [23]. Доведено існування взаємозв'язку між активністю альфа-амілази та частотою виникнення карієсу. Для цього у зубних бляшках та слині визначали загальну кількість карієсогенних бактерій (*S. salivarius*, *S. mutans*), активність сахарози та альфа-амілази. Єдиною достовірною відмінністю у осіб з високим та низьким рівнем карієсу була активність альфа-амілази, яка була вищою у осіб з високим рівнем карієсу [14].

Вплив деяких факторів на активність альфа-амілази

А. Стать: на даний час відсутні дані про існування відмінностей активності альфа-амілази між чоловіками та жінками в тому числі за умов гострого стресу збільшення активності альфа-амілази не відрізнялося у осіб обох статей [29, 36].

Б. Вік: базальна активність альфа-амілази майже відсутня у новонароджених, але протягом перших трьох років життя постійно збільшується, досягаючи рівня у дорослих [29].

В. Циркадні ритми: активність альфа-амілази значною мірою залежить від часу дня: найвища активність спостерігається пізно ввечері, а найнижча –

в ранкові години після пробудження [26]. і обернено відображає концентрацію кортизолу, яка є найнижчою ввечері, а найвищою – після пробудження [30].

Г. Паління: в літературі наведені суперечливі дані стосовно впливу звичного паління на активність слинної альфа-амілази [17, 24]. Після випалювання однієї цигарки активність слинної альфа-амілази у 20 здорових курців обох статей зменшилася на 44% [40].

Зміни активності слинної альфа-амілази як маркер активності симпатoadреналової осі та психоемоційного стресу

Фізична активність, що супроводжується активацією симпатичної нервової системи, підвищує концентрацію альфа-амілази в ротовій рідині. Оскільки вивільнення слинної альфа-амілази стимулюється активацією автономної НС, яка контролюється ЦНС, можна очікувати збільшення секреції цього ферменту також під впливом психоемоційного стресу [27]. Перші відомості про вплив стресу на секрецію альфа-амілази з'явилися в кінці 70-х років минулого століття [15], але широкий інтерес до цієї проблеми виник пізніше, після досліджень Chatterton з співавт., які спостерігали збільшення активності альфа-амілази в ротовій рідині у відповідь на низку стресорних подразнень, у тому числі на фізичні навантаження та психоемоційне напруження [10]. В даній роботі порівнювали зміни активності альфа-амілази в ротовій рідині та концентрації норадреналіну та адреналіну в плазмі крові у відповідь на зазначені стресори. Спостерігались значимі позитивні кореляції між досліджуваними параметрами в умовах виконання фізичних вправ (відповідно $r = +0,64$ та $r = +0,49$). Однак за умов психоемоційного стресу дана кореляція була незначною і недостовірною ($r = +0,17$). Всупереч цьому, при визначенні впливу психоемоційного напруження на активність альфа-амілази та вираженість різних кардіоваскулярних параметрів, що відображають активність автономної нервової системи, була показана наявність тісного взаємозв'язку [8, 16, 13]. Найвища концентрація альфа-амілази в слині

спостерігається відразу після впливу стресорного фактору. Активність ферменту повертається до вихідного рівня через 10-20 хв [25]. Важливо зазначити, що активність слинної альфа-амілази швидше змінюється при гострому стресі, ніж концентрація кортизолу; поріг активації ферменту при фізичній активності нижчий, ніж у кортизолу [29].

Оскільки альфа-амілаза відображає активність симпатичної НС, її визначення пропонується як показник активації симпато-адреналової осі та чутливий біомаркер вираженості стресорних змін в організмі. Спостерігали значне збільшення концентрації альфа-амілази в слині після 15-хвилинної «стресорної» відеогри [34]. Концентрація альфа-амілази підвищується під впливом екзаменаційного стресу, не зменшується при повторному впливі стресорного фактора [33]. Така і з співавт. визначали вплив «стресогенного» та «релаксогенного» фільмів на концентрацію кортизолу та альфа-амілази в ротовій рідині. Виявлено, що стресогенний (неприємного змісту) фільм викликав підвищення концентрації як кортизолу, так і альфа-амілази. Натомість, при перегляді релаксогенного фільму зміни концентрації кортизолу в слині не спостерігалося, тоді як концентрація слинної альфа-амілази зменшилась [36].

Стрес – загальна неспецифічна реакція організму на дію надзвичайних подразників (стресорів), що характеризується активацією нейрогуморальних механізмів та обумовленими ними метаболічними та функціональними змінами [2].

Функція слинних залоз виявилась найбільш вдалою моделлю, що дозволила академіку І.П. Павлову на підставі безумовних рефлексів обґрунтувати вчення про умовнорефлекторну діяльність ЦНС. Вирішальна роль слиновидільного рефлекса в аналізі умовних рефлексів дає підстави для обґрунтування тісного взаємозв'язку діяльності слинних залоз і детермінованих станом ЦНС поведінкових реакцій [3].

Враховуючи дані про те, що вміст альфа-амілази у змішаній слині відображає білковосинтетичну функцію слинних залоз, можна вважати, що

визначення активності цього фермента та змін його активності під впливом стресогенних чинників є адекватним методичним підходом для оцінки типу реагування та стресостійкості організму.

Біомаркери стресу, що відображають гомеостаз ротової рідини, заслуговують на особливу увагу, оскільки їх легко отримувати неінвазивним способом. На відміну від дослідження активності гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової осі, для чого вимірюють концентрацію кортизолу в ротовій рідині, оцінка активності симпатoadреналової осі до недавнього часу проводилася шляхом лише електрофізіологічних досліджень та визначення концентрацій катехоламінів в плазмі крові, що потребує складної апаратури та інвазивного втручання – забору зразка крові [30]. Рівень катехоламінів слини не є надійним маркером інтенсивності стресорної реакції організму, оскільки перехід норадреналіну з плазми крові в ротову рідину займає близько однієї години [19].

У дослідженнях Такаї з співавторами підвищення активності слинної альфа-амілази у відповідь на психоемоційні подразники було більш вираженим та спостерігалось значно раніше, ніж підвищення концентрації кортизолу в слині [36]. Це дало змогу авторам припустити, що зміна активності слинної альфа-амілази є кращим показником реакції організму на психоемоційний стрес порівняно з кортизолом. Крім цього, цей фермент є більш зручним для оцінки стресорних реакцій, тому що збільшення активності альфа-амілази, викликане психосоціальним стресом, не залежить від швидкості секреції слини [28].

Таким чином, слинну альфа-амілазу можна розглядати як маркер активності симпатичної нервової системи, що є одним із провідних компонентів стресреалізуючої системи, а також як об'єктивний індикатор стресорних змін в організмі.

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисов А.Б. Слюнные железы. Слюна. — М. : Издательство РАМН, 2003. — 136 с.
2. Тарасенко Л.М., Суханова Г.А., Мищенко В.П. и др. Слюнные железы (биохимия, физиология, клинические аспекты). — Томск : Изд-во НТЛ, 2002. — 124 с.
3. Тарасенко Л.М., Непорада К.С., Петрушанко Т.А. Слюнные железы и слюна как чувствительные объекты исследования стрессоустойчивости организма (обзор собственных исследований, к 100-летию открытия условного рефлекса) // Украинский стоматологический альманах. — 2004. — № 5-6. — С. 31 —34.
4. Al-Hashimi I., Levine M.J.. Characterization of *in vivo* salivary-derived enamel pellicle // Arch. Oral Biol. — 1989. — № 34. — P. 289 —295.
5. Asking B. Sympathetic stimulation of amylase secretion during a parasympathetic background activity in the rat parotid gland // Acta Physiol. Scand. — 1985. — № 124. — P. 535 — 542.
6. Asking B., Proctor G.B. Parasympathetic activation of amylase secretion in the intact and sympathetically denervated rat parotid gland // Q. J. Exp. Physiol. — 1989. — № 74. — P. 45 — 52.
7. Bosch J.A., Brand H.S., Ligtenberg A.J. et al. Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva // Psychosom. Med. — 1996. — № 58. — P. 374 —382.
8. Bosch J.A., De Geus E.J., Veerman E.C. et al. Innate secretory immunity in response to different stresses that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity // Psychosom. Med. — 2003. — № 65. — P. 245 —258.
9. Castle D., Castle A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins // Crit. Rev. Oral. Biol. Med. — 1998. — № 9. — P. 4 — 22.

10. Chatterton R.T. Jr., Vogelsong K.M., Lu Y.C. et al. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity // *Clin. Physiol.* — 1996. — № 16. — P. 433 —448.
11. Decaro J.A. Methodological considerations in the use of salivary alpha-amylase as a stress marker in field research // *Am. J. Hum. Biol.* — 2008. — № 20. — P. 617 — 619.
12. Ehlert U., Erni K., Hebisch G. et al. Salivary alpha-amylase levels after yohimbine challenge in healthy men // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2006. — № 91. — P. 5130 — 5133.
13. El-Sheikh M., Erath S.A., Buckhalt J.A. et al. Cortisol and children's adjustment: the moderating role of sympathetic nervous system activity // *J. Abnorm. Child Psychol.* — 2008. — № 36. — P. 601 —611.
14. Fiehn N.E., Oram V., Moe D. Streptococci and activities of sucrases and α -amylases in supragingival dental plaque and saliva in three caries activity groups // *Acta Odontol. Scand.* — 1986. — № 44. — P. 1 —9.
15. Gilman S.C., Fischer G.J., Biersner R.J. et al. Human parotid alpha-amylase secretion as a function of chronic hyperbaric exposure // *Undersea Biomed. Res.* — 1979. — № 6. — P. 303 —307.
16. Granger D.A., Kivlighan K.T., Blair C. et al. Integrating the measurement of salivary alpha-amylase into studies of child health, development, and social relationships // *J. Pers. Soc. Relat.* — 2006. — № 23. — P. 267 —290.
17. Granger D.A., Blair C., Willoughby M. et al. Individual differences in salivary cortisol and alpha-amylase in mothers and their infants: relation to tobacco smoke exposure // *Dev. Psychobiol.* — 2007. — № 49. — P. 692 —701
18. Horii A.M., Emi N., Tomita T. et al. Primary structure of human pancreatic α -amylase gene: its comparison with human α -amylase gene // *Gene* — 1987. — № 60. — P. 57 — 64.
19. Kennedy B. Catecholamines in human saliva // *Life Sci.* — 2001. — № 69. — P. 87 —99.

20. Laurikainen K., Laurikainen E., Tenovuoto J. et al. Effects of a beta-blocking agent, timolol maleate, on saliva in healthy volunteers // *Scand. J. Dent. Res.* — 1998. — № 96. — P. 121 — 127.
21. Levine M.J., Reddy M.S., Tabak L.A. et al. Structural aspects of salivary glycoproteins // *J. Dent. Res.* — 1987. — № 66. — P. 436 — 441.
22. Mandel I.D. The functions of saliva // *J. Dent. Res.* — 1987. — № 66. — P. 623 — 627.
23. Mormann J.E., Schmid R., Muhlemann H.R.. Effect of α -amylase and α -glucosidase inhibitors on caries incidence and plaque accumulation in rats // *Caries Res.* — 1983. — № 17. — P. 353 — 356.
24. Nagaya T., Okuno M. No effects of smoking or drinking habits on salivary amylase // *Toxicol. Lett.* — 1993. — № 66. — P. 257 — 261.
25. Nater U. M., Rohleder N., Gaab J. et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm // *International Journal of Psychophysiology.* — 2005. — № 55. — P. 333 — 342.
26. Nater U.M., Rohleder N., Schlotz W. et al. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase // *Psychoneuroendocrinology.* — 2007. — № 32. — P. 392 — 401.
27. Nater U.M., N. Rohleder. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research // *Psychoneuroendocrinology.* — 2009. — № 34. — P. 486 — 496.
28. Rohleder N., Wolf J.M., Maldonado E.F. et al. The psychosocial stress-induced increase of salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate // *Psychophysiology.* — 2006. — № 43. — P. 645 — 652.
29. Rohleder N., Nater U.M. Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations // *Psychoneuroendocrinology.* — 2009. — № 34. — P. 469 — 485.
30. Rohleder N., Nater U.M., Wolf J.M. et al. Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase an indicator of sympathetic activity? // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2004. — № 1032. — P. 258 — 263.

31. Scannapieco F.A., E.J. Bergey, M.S. Reddy et al. Characterisation of salivary α -amylase binding to *Streptococcus sanguis* // Infect. Immun. — 1989. — № 57. — P. 2853 — 2863.
32. Scannapieco F. A., Torres G., Levine M. J. Salivary Alpha-Amylase: Role in Dental Plaque and Caries Formation // CROBM — 1993. — № 4. — P. 301 —307.
33. Schoofs D., Hartmann R., Wolf O.T. Neuroendocrine stress responses to an oral academic examination: no strong influence of sex, repeated participation and personality traits // Stress. — 2008. — № 11. — P. 52 —61.
34. Skosnik P.D., Chatterton R.T., Swischer T. et al. Modulation of attentional inhibition by norepinephrine and cortisol after psychological stress // Int. J. Psychophysiol. — 2000. — № 36. — P. 59 —68.
35. Skov Olsen P., Kirkegaard P., Rasmussen T. Adrenergic effects on secretion of amylase from the rat salivary glands // Digestion — 1988. — № 41. — P. 34 — 38.
36. Takai N., Yamaguchi M., Aragaki T. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults // Arch. Oral Biol. — 2004. — № 49. — P. 963 —968.
37. van Stegeren A., Rohleder N., Everaerd W. et al. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade // Psychoneuroendocrinology. — 2006. — № 31. — P. 137 — 141.
38. Vihinen M., Olikka P., Niskanen J. et al. Site-directed mutagenesis of a thermostable amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues // J. Biochem. — 1990. — № 107. — P. 267 — 272.
39. Zakowski J.J., Bruns D.E. Biochemistry of human alpha-amylase isoenzymes // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. — 1985. — № 21. — P. 283 —322.
40. Zappacosta B., Persichilli S., Mordente A. et al. Inhibition of salivary enzymes by cigarette smoke and the protective role of glutathione // Hum. Exp. Toxicol. — 2002. — № 21. — P. 7 —11.

СЛЮННАЯ АЛЬФА-АМИЛАЗА КАК МАРКЕР СТРЕССОРНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Цубер В.Ю., Тарасенко Л.М.

УКРАИНСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ СТОМАТОЛОГИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ,
г. Полтава

Резюме

Проведен анализ литературы, касающейся применения слюнной альфа-амилазы как индикатора психоэмоционального стресса и маркера активности симпато-адреналовой системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: слюнная альфа-амилаза, ротовая жидкость, психоэмоциональный стресс

SALIVARY ALPHA-AMYLASE AS A MARKER OF STRESSOR REACTION OF THE ORGANISM (REVIEW OF LITERATURE)

V.Y. Tsuber, L.M. Tarasenko

UKRAINIAN MEDICAL STOMATOLOGICAL ACADEMY, Poltava

Summary

A study of literature on application of salivary alpha amylase as an indicator of psychoemotional stress and a marker of activity of the sympatho-adrenal axis.

KEY WORDS: salivary alpha-amylase, whole saliva, psychoemotional stress