

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА КАК ФАКТОР НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

ГОНЧАРОВА А.И., ОКУЛИЧ В.К., ЗЕМКО В.Ю., СЕНЬКОВИЧ С.А.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск,
Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2019. – Том 18, №4. – С. 40-45.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LYSOZYME AS A NONSPECIFIC RESISTANCE FACTOR

GONCHAROVA A.I., OKULICH V.K., ZIAMKO V.Y., SENKOVICH S.A.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2019;18(4):40-45.

Резюме.

Цель – изучить современную этиологическую структуру сиаденитов с учетом ПЦР-диагностики, установить роль лизоцима в развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез.

Материалы и методы. Обследованы 86 пациентов с сиаденитами. Пациенты находились на стационарном лечении в УЗ «Витебская областная клиническая больница». Параллельно с бактериологическим методом исследования проводили мультиплексную ПЦР-диагностику в режиме реального времени. Для обнаружения ДНК использовали набор реагентов «Септоскрин» («Литех», Россия). Результат оценивали в программе Bio Rad CFX Manager 3.0.

Результаты. При проведении бактериологического исследования у 67 (77,9%) пациентов с сиаденитами выделено 70 изолятов, отрицательные результаты посевов получены в 19 случаях (22,1%). Изучена современная этиологическая структура сиаденитов с учетом мультиплексной ПЦР-диагностики. Мультиплексная ПЦР-диагностика в сравнении с бактериологическим методом является более чувствительной на 16,6%. В эксперименте установлена антимикробная активность лизоцима против стандартных штаммов и изолятов, выделенных от пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез.

Заключение. Изучена современная этиологическая структура сиаденитов с учетом ПЦР-диагностики, установлена роль лизоцима в развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез.

Ключевые слова: сиаденит, воспалительное заболевание больших слюнных желез, ПЦР-диагностика, лизоцим.

Abstract.

Objectives. To study the modern etiological structure of sialadenitis with PCR diagnosis taken into account; to establish the role of lysozyme in the development of inflammatory diseases of the large salivary glands.

Material and methods. 86 patients with sialadenitis were examined. These patients underwent inpatient treatment in the Vitebsk Regional Clinical Hospital. In parallel with the bacteriological method of the study, multiplex PCR diagnosis was performed in real time. To detect DNA a set of reagents «Septoscreen» («Litech», Russia) was used. The result was evaluated by means of the program Bio Rad CFX Manager 3.0.

Results. During bacteriological studies, 70 isolates were isolated in 67 (77.9%) patients with sialadenitis, and inoculation negative results were obtained in 19 cases (22.1%). The modern etiological structure of sialadenitis was studied taking into consideration multiplex PCR diagnosis. Multiplex PCR diagnosis in comparison with the bacteriological method is by 16.6% more sensitive. During the experiment the antimicrobial activity of lysozyme against standard strains and isolates isolated from patients with inflammatory diseases of the large salivary glands was determined.

Conclusions. The modern etiological structure of sialadenitis has been studied with PCR diagnosis taken into account, the role of lysozyme in the development of inflammatory diseases of the large salivary glands has been established.

Key words: sialadenitis, inflammatory disease of the large salivary glands, PCR diagnosis, lysozyme.

В последние десятилетия не наблюдается тенденции сокращения частоты встречаемости поражений слюнных желез в общей структуре патологических процессов челюстно-лицевой области. По данным ряда авторов наиболее часто выделяли изоляты *S.epidermidis*, *S.aureus*, *E.coli* и представителей рода *Streptococcus*. Микробная флора у пациентов с сиаладенитами в стадии обострения представляет собой ассоциации различных видов стрептококков аэробов (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis*) и анаэробных стрептококков (*Peptostreptococcus spp.*). У пациентов с воспалительными заболеваниями слюнных желез в качестве этиологических агентов выделяют также грамотрицательные бактерии кишечной группы (*Enterobacterium spp.*, *Klebsiella spp.*), а наименее часто – представителей пародонтопатогенной микрофлоры, таких как бактероиды, фузобактерии и актиномицеты [1-3].

ПЦР-диагностика является неотъемлемой частью комплекса диагностических процедур на современном этапе развития клинической и лабораторной диагностики. К преимуществам метода главным образом можно отнести быстроту получения результата при сравнении со стандартным микробиологическим методом. Метод ПЦР-анализа базируется на исследовании генетического материала микроорганизмов, который содержится в биологических жидкостях, полученных от пациентов. Неоспоримым преимуществом метода является также возможность при минимальном количестве материала в кратчайшие сроки получить ответ об этиологической структуре заболевания [4-6].

Мультиплексная ПЦР-диагностика представляет собой реакцию, при которой используется более одной пары праймеров для проведения амплификации нескольких ДНК-овых матриц. Это позволяет одновременно диагностировать целую группу патогенов в режиме реального времени при использовании различных флуоресцентных меток [7].

Условно-патогенные микроорганизмы могут вызывать инфекционный процесс в макроорганизме с нормальной иммунной системой только в случае большой инфицирующей дозы на единицу защитного фактора. Поэтому инфекции, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, возникают обычно у лиц с иммунодефицитами или на фоне другого

неинфекционного заболевания, которое сопровождается нарушением целостности кожных покровов и слизистых оболочек, изменением функции органов и систем [8].

Лизоцим находится во всех биологических жидкостях организма и представляет собой один из наиболее важных факторов неспецифической резистентности макроорганизма. Оценка содержания данного фермента позволяет определить активность системы фагоцитов. Концентрация лизоцима в сыворотке крови растет при острых и хронических миело- и моноцитарных лейкозах, нейтрофильном лейкоцитозе, туберкулезе, саркоидозе, острой бактериальной инфекции и значительно снижается при хронических бактериальных инфекциях, сепсисе, перитоните, гипоплазии костного мозга. Лизоцим обеспечивает защиту слизистой ротовой полости от патогенов, разрушая пептидогликан бактериальной стенки. Главными продуцентами лизоцима в макроорганизме являются околоушные и поднижнечелюстные слюнные железы. Содержание фермента в секрете подчелюстных желез выше, чем в околоушных. Лизоцима находится в большем количестве в смешанной слюне, чем в сыворотке крови. Оценка лизоцимной активности ротовой жидкости позволяет определить функциональное состояние слюнных желез и защитные свойства слюны при инфекционных заболеваниях полости рта [9-13].

Цель исследования – изучить современную этиологическую структуру сиаладенитов с учетом ПЦР-диагностики, установить роль лизоцима в развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез.

Материал и методы

В исследование было включено 86 пациентов с сиаладенитами. Пациенты находились на стационарном лечении в стоматологическом отделении УЗ «Витебская областная клиническая больница». Средний возраст пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез составил $47,25 \pm 14,78$ года, в демографической структуре преобладали мужчины, составившие 55%, женщины – 45%. Продолжительность лечения в отделении была от 3 до 13 дней, в среднем $6,46 \pm 2,46$ дня.

Перед проведением лечения в день поступления в стоматологическом отделении перед проведением антибактериальной терапии осу-

ществляли забор слюны из выводного протока большой слюнной железы в зависимости от локализации воспаления на транспортную питательную среду, в случае проведения хирургического вмешательства проводили интраоперационный забор материала с целью последующего выделения и идентификации микроорганизмов [14].

Выделение микроорганизмов. Идентификацию чистой бактериальной культуры проводили согласно инструкции по применению № 075-0210 «Микробиологические методы исследования биологического материала», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 13.03.2010 г.

Параллельно с бактериологическим методом исследования на 12 образцах проводили мультиплексную real-time ПЦР-диагностику. Идентификацию генетического материала *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* проводили с использованием набора реагентов «Септо-скрин» («Литех», Россия). Оценку результатов осуществляли в программе Bio Rad CFX Manager 3.0. При случайной контаминации пробы концентрация генетического материала возбудителя была минимальна и находилась у нижней границы чувствительности метода.

Изучение антимикробной активности лизоцима против стандартных штаммов и изолятов, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитами. Предварительно выделяли чистую культуру. Выделенный штамм пересекали на агар и выращивали при 37°C в течение суток. При помощи бактериальной петли в асептических условиях готовили взвесь микроорганизмов на бульоне Мюллера-Хинтона. Оптическая плотность приготовленной бактериальной взвеси при измерении на денситометре соответствовала 0,5 единицы по стандарту мутности МакФарланда, что равняется $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. В планшет, начиная со второй лунки каждого последующего ряда, вносили по 180 мкл бульона Мюллера-Хинтона. В качестве отрицательно контроля в последних двух лунках каждого ряда был бульон Мюллера-Хинтона в объеме 200 мкл. В первую лунку ряда добавляли 200 мкл взвеси микроорганизмов в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Из первой лунки ряда переносили во вторую 20 мкл микробной взвеси, из второй в третью и т.д., готовя таким образом десятикратное разведение, исключая кон-

трольные лунки. В нечетный ряд вносили последовательно по 20 мкл лизоцима в известной концентрации, в четный ряд лизоцим не вносили.

Статистическую обработку данных, полученных в ходе проведения исследования, осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007, Statistica (Version 10, StatSoft Inc., США, лицензия №СТАФ999К347156W). Тип распределения количественных признаков определяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Изучаемые показатели имели параметрическое распределение (p для критерия Шапиро-Уилка во всех группах $>0,05$). Для признаков с нормальным распределением рассчитывали среднюю арифметическую (M) и стандартное отклонение (σ). Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При проведении бактериологического исследования у 67 (77,9%) пациентов с воспалительными заболеваниями слюнных желез было выделено 70 изолятов, отрицательные результаты посевов получены в 19 случаях (22,1%). Из представленных микроорганизмов наиболее часто встречались изоляты рода *Streptococcus* 32 микроорганизма (45,8%) и представители рода *Staphylococcus* – 23 изолята (32,9%), 5 изолятов (7,1%) – рода *Candida* и 5 изолятов (7,1%) – рода *Actinomyces*, 3 изолята (4,3%) – рода *Gemella* и 2 изолята (2,8%) представители семейства *Enterobacteriaceae* [14].

Параллельно с бактериологическим методом были исследованы микроорганизмы и их ассоциации. В 100% случаев параллельно с бактериологическим методом были идентифицированы методом ПЦР *S. aureus* + *Streptococcus spp.* В двух случаях было подтверждено отсутствие бактериальной флоры методом ПЦР. В то же время в двух образцах, в которых не были выявлены бактериологическим методом микроорганизмы, методом ПЦР были выявлены представители рода *Streptococcus*. Таким образом, на основании представленных данных ПЦР-диагностика в сравнении с бактериологическим методом является более чувствительной на 16,6%.

Для подтверждения роли лизоцима как фактора неспецифической резистентности в защите от инфекционных агентов, выделяемых у пациентов с сиаладенитами, была изучена антимикробная активность лизоцима на стандартных

штаммах *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, *S.aureus* ATCC 29213, *S.pneumonia* ATCC 49619 и *S.agalactiae* ATCC 13813, а также изолятах *S.aureus*, *S.epidermidis* и *S.oralis*, *S.mitis*, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитами.

При определении активности лизоцима против исследуемых нами штаммов была использована концентрация лизоцима 600 мг/л, близкая к медианному значению активности лизоцима ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами, и 1 мг/мл, соответствующая верхней границе показателя активности лизоцима ротовой жидкости для 87% пациентов с сиаладенитами в день поступления в стационар.

В исследовании было использовано две разновидности лизоцима: выделенный из нейтрофилов человека и лизоцим человека рекомбинантный, поэтому было принято решение сравнить антимикробную активность данных образцов лизоцима против наиболее чувствительного к лизоциму штамма *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. При изучении антимикробной активности лизоцима в концентрации 1 мг/мл методом диффузии в агар против штамма *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 зона угнетения роста для лизоцима, выделенного из нейтрофилов человека, составила 23 ± 1 мм и 22 ± 1 мм для лизоцима человека рекомбинантного, при этом статистически значимо показатели не отличались ($p > 0,05$).

При использовании метода серийных разведений микроорганизмов лизоцим в концентрации 1 мг/мл подавлял рост *M.lysodeikticus* в концентрации $1,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, тогда как для *S.aureus*, выделенного из протоковой слюны пациента с сиаладенитом, данный показатель составил только $1,5 \cdot 10^2$ КОЕ/мл. Стандартные штаммы *S.aureus* ATCC 29213, *S.pneumonia* ATCC и *S.agalactiae* ATCC, изоляты *S.aureus*, *S.epidermidis* и *S.oralis*, *S.mitis* в максимальном разведении были устойчивы к действию лизоцима в концентрации 600 мкг/мл. В то же время лизоцим в данной концентрации проявил высокую активность, подавив рост *Micrococcus lysodeikticus* в концентрации $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл.

Концентрация лизоцима 1000 мкг/мл, соответствующая верхней границе показателя активности лизоцима ротовой жидкости 87% пациентов с сиаладенитами в день поступления в стационар, эффективна против стандартного штамма *M. lysodeikticus* и изолята *S.aureus*, выделенного из протоковой слюны пациентов. В то же время данная концентрация лизоцима была не-

эффективна против изолятов стрептококков, наиболее часто выделяемых у пациентов с сиаладенитами. Концентрация лизоцима 600 мкг/мл, близкая к медианному значению активности лизоцима ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами, эффективна только в отношении *M. lysodeikticus* и не подавляет рост других штаммов и изолятов.

При развитии местного воспалительного процесса в больших слюнных железах наблюдается активное выделение лизоцима моноцитарно-макрофагальными клетками, что приводит к увлечению его содержания в ротовой жидкости, однако концентрация лизоцима недостаточна для угнетения роста микроорганизмов, вызывающих сиаладенит. В данном случае этот неспецифический фактор гуморального иммунитета ротовой полости оказывается неэффективным и приводит к развитию сиаладенитов.

Данный факт определения антимикробной активности лизоцима позволяет установить патогенез воспалительных заболеваний больших слюнных желез, предположить патогенетические механизмы развития сиаладенитов с учетом роли повышения секреции лизоцима в развитии гнойно-воспалительного процесса.

В результате проведенного исследования в эксперименте *in vitro* подтвержден факт роли лизоцима в развитии гнойно-воспалительного процесса больших слюнных желез.

Установлено, что уровень лизоцима, который продуцируется при инфекционном процессе в больших слюнных железах, является недостаточным для подавления роста патогенной микрофлоры, что в большинстве случаев приводит к развитию сиаладенита.

Заключение

1. Использование метода мультиплексной ПЦР-диагностики имеет преимущество по чувствительности относительно бактериологического метода, позволяет уточнить этиологическую структуру сиаладенитов и повысить процент выявленных патогенов с 77,9 до 94,5% случаев.

2. В эксперименте установлена антимикробная активность лизоцима против стандартных штаммов и изолятов, выделенных от пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез, которая не обеспечивает защиту от этиологических агентов заболеваний больших слюнных желез.

Литература

1. Микробиология и иммунология для стоматологов / под ред.: Р. Дж. Ламонта [и др.] ; пер. с англ. под ред. В. К. Леонтьева. – М. : Практ. медицина, 2010. – 504 с.
2. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта : учебник / под ред. В. Н. Царева. – М. : GEOTAR-Media, 2013. – 576 с.
3. Микрофлора полости рта: норма и патология : учеб. пособие / Е. Г. Зеленова [и др.]. – Н. Новгород : НГМА, 2004. – 158 с.
4. Dobson, J. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser / J. Dobson, M. Wilson // Arch. Oral Biol. – 1992 Nov. – Vol. 37, N 11. – P. 883–887.
5. O'Neill, J. F. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue / J. F. O'Neill, C. K. Hope, M. Wilson // Lasers Surg. Med. – 2002. – Vol. 31, N 2. – P. 86–90.
6. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / S. S. Atshan [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2013 Aug. – Vol. 18. – P. 106–112.
7. Лопухов, Л. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн // Клин. микробиология и анти-

8. микроб. химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 96–106.
8. Косинец, А. Н. Инфекция в хирургии : руководство / А. Н. Косинец, Ю. В. Стручков. – Витебск : ВГМУ, 2004. – 510 с.
9. Immunobiology / C. A. Aneway [et al.]. – 5th ed. – New York : Garland Science, 2001.
10. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М. : Медицина, 2002. – 541 с.
11. Jacobs, D. S. Laboratory test handbook / D. S. Jacobs, W. R. DeMott, D. K. Oxley. – Hudson, Ohio : Lexi-comp, 2004. – 1342 p.
12. Sanghamitra, N. J. Expanding coordination chemistry from protein to protein assembly / N. J. Sanghamitra, T. Ueno // Chem. Commun. (Camb.). – 2013 May. – Vol. 49, N 39. – P. 4114–4126.
13. Venkataramani, S. Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier Transform Infrared study / S. Venkataramani, J. Truntzer, D. R. Coleman // J. Pharm. Bioallied Sci. – 2013 Apr. – Vol. 5, N 2. – P. 148–153.
14. Гончарова, А. И. Образующие биопленку микроорганизмы и ферменты ротовой жидкости в патогенезе сиаладенитов / А. И. Гончарова // Вестн. ВГМУ. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 58–66.

Поступила 05.04.2019 г.

Принята в печать 25.07.2019 г.

References

1. Lamont RDzh, Lantts MS, Berne RA, Leblank DDzh, Leont'yev VK, red. Microbiology and immunology for dentists. Moscow, RF: Prakt meditsina; 2010. 504 p. (In Russ.)
2. Tsarev VN, red. Microbiology, virology and oral immunology: uchebnik. Moscow, RF: GEOTAR-Media; 2013. 576 p. (In Russ.)
3. Zelenova EG, Zaslavskaya MI, Salina EV, Rassanov SP. Oral microflora: normal and pathological: ucheb posobie. Nizhny Novgorod, RF: NGMA; 2004. 158 p. (In Russ.)
4. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Arch Oral Biol. 1992 Nov;37(11):883-7. doi: 10.1016/0003-9969(92)90058-g
5. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. Lasers Surg Med. 2002;31(2):86-90. doi: 10.1002/lsm.10087
6. Atshan SS, Shamsudin MN, Karunanidhi A, van Belkum A, Lung LT, Sekawi Z, et al. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Infect Genet Evol.

- 2013 Aug;18:106-12. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.002
7. Lopukhov LV, Eydel'shteyn MV. Polymerase chain reaction in clinical microbiological diagnosis. Klin Mikrobiolog Antimikrob Khimioterapiia. 2000;2(3):96-106. (In Russ.)
8. Kosinets AN, Struchkov YuV. Infection in surgery: rukovodstvo. Vitebsk, RB: VGMU; 2004. 510 p. (In Russ.)
9. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology. 5th ed. New York: Garland Science; 2001.
10. Nazarenko GI, Kishkun AA. Clinical evaluation of laboratory results. Moscow, RF: Meditsina; 2002. 541 p. (In Russ.)
11. Jacobs DS, DeMott WR, Oxley DK. Laboratory test handbook. Hudson, Ohio: Lexi-comp; 2004. 1342 p.
12. Sanghamitra NJ, Ueno T. Expanding coordination chemistry from protein to protein assembly. Chem Commun (Camb). 2013 May;49(39):4114-26. doi: 10.1039/c2cc36935d
13. Venkataramani S, Truntzer J, Coleman DR. Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier Transform Infrared study. J Pharm Bioallied Sci. 2013 Apr;5(2):148-53. doi: 10.4103/0975-7406.111821
14. Goncharova AI. Biofilm forming microorganisms and oral fluid enzymes in the pathogenesis of sialadenitis. Vestn VGMU. 2018;17(3):58-66. (In Russ.)

Submitted 05.04.2019

Accepted 25.07.2019

Сведения об авторах:

Гончарова А.И. – старший преподаватель кафедры клинической микробиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Окулич В.К. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8226-6405>;

Земко В.Ю. – аспирант кафедры анестезиологии и реаниматологии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Сенькович С.А. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Goncharova A.I. – senior lecturer of the Chair of Clinical Microbiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Okulich V.K. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Clinical Microbiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8226-6405>;

Ziamko V.Y. – postgraduate of the Chair of Anesthesiology & Critical Care Medicine with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Senkovich S.A. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Clinical Microbiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра клинической микробиологии. E-mail: – anna2569@yandex.ru – Гончарова Анна Игоревна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Clinical Microbiology. E-mail: – anna2569@yandex.ru – Goncharova Anna Igorevna.