

ОБРАЗУЮЩИЕ БИОПЛЕНКУ МИКРООРГАНИЗМЫ И ФЕРМЕНТЫ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ В ПАТОГЕНЕЗЕ СИАЛАДЕНИТОВ

ГОНЧАРОВА А.И.

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

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №3. – С. 58-66.

BIOFILM FORMING MICROORGANISMS AND ORAL FLUID ENZYMES IN THE PATHOGENESIS OF SIALADENITIS

GONCHAROVA A.I.

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

Vestnik VGMU. 2018;17(3):58-66.

Резюме.

Цель исследования – изучить этиологическую структуру, уровень sIgA в ротовой жидкости и IL-1 β в сыворотке крови, ферментативную активность ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами.

Материал и методы. Обследованы 86 пациентов с сиаладенитами. Пациенты находились на стационарном лечении в УЗ «Витебская областная клиническая больница». Выделены и идентифицированы микроорганизмы протоковой слюны пациентов с сиаладенитами, определена способность выделенных изолятов к формированию биопленки, оценена чувствительность выделенных микроорганизмов к антибиотикам в составе биопленки; изучены способность сыворотки крови пациентов с сиаладенитами разрушать матрикс биопленки и эластазная и БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости, исследовано содержание IL-1 β в сыворотке крови пациентов с сиаладенитами и иммуноферментным методом определен уровень sIgA в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами. Результаты. В 77,9% случаев подтверждено значение микробного фактора, среди выделенных изолятов преобладали представители рода *Streptococcus* (45,8%) и *Staphylococcus* (32,9%). Наибольшей способностью к формированию микробной пленки среди часто встречающихся изолятов обладали представители вида *S. aureus* – 24,45; 20,27-49,29 мкг/лунку. При сравнении МПК₉₀ *S. aureus* в составе биопленок по сравнению с плактонными формами к антибиотикам обнаружено, что МПК₉₀ выросла от 8,5 до 99 раз. Наиболее эффективными в отношении *S. aureus* являются имипенем, меропенем, ванкомицин и ципрофлоксацин. Предрасполагающим фактором риска развития сиаладенитов является снижение уровня sIgA в ротовой жидкости $\leq 0,16$ мг/мл и низкая способность расщеплять матрикс биопленки – $\leq 11,28$ мкг/мл. Среди изученных факторов наиболее значимым является применение в качестве дополнительного диагностического критерия сиаладенитов определение уровня активности эластазы ротовой жидкости $\geq 0,005$ пкат.

Заключение. Изучена этиологическая структура, уровень sIgA в ротовой жидкости и IL-1 β в сыворотке крови, ферментативная активность ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами.

Ключевые слова: сиаладенит, биопленка, эластазная активность, БАПНА-амидазная активность, IL-1 β , sIgA.

Abstract.

Objectives. To study the etiological structure, the level of sIgA in the oral fluid and IL-1 β in the blood serum, the enzymatic activity of the oral fluid in patients with sialadenitis.

Material and methods. 86 patients with sialadenitis were examined. These patients underwent inpatient treatment in the Vitebsk Regional Clinical Hospital. The isolation and identification of ductal saliva microorganisms in patients with sialadenitis were carried out, the ability of isolates to form biofilms was determined, sensitivity assessment of the isolated microorganisms to antibiotics in biofilm was performed; the ability of patients' blood serum to destroy the biofilm matrix was also studied; the elastase and BAPNA amidase activity of the oral fluid was determined; the IL-1 β content in the blood serum was evaluated and the level of sIgA in the oral fluid of patients with sialadenitis was determined.

Results. In 77,9 per cent of cases, the value of the microbial factor was confirmed, among the isolated isolates, representatives of the genus *Streptococcus* (45,8%) and representatives of the genus *Staphylococcus* (32,9%) prevailed. The greatest ability to form a microbial film among the frequently occurring isolates belonged to representatives of the species *S. aureus* – 24,45; 20,27-49.29 μg / socket. While comparing the MIK_{90} *S. aureus* in plankton forms and biofilms it was found increased from 8,5 to 99 times. The most effective against *S. aureus* are imipenem, meropenem, vancomycin and ciprofloxacin. A predisposing risk factor for the development of sialadenitis is a decrease in sIgA in the oral fluid $\leq 0,16$ mg / ml, along with a new risk factor for the development of inflammatory diseases of the large salivary glands, such as the low ability to cleave the biofilm matrix – $\leq 11,28$ mkg / ml. However, the most significant out of the studied factors is the use of determining the activity level of the oral fluid elastase $\geq 0,005$ pc as an additional diagnostic criterion for the development of sialadenitis.

Conclusions. The etiological structure, the level of sIgA in the oral fluid and IL-1 β in the blood serum, the enzymatic activity of the oral fluid of patients with sialadenitis were studied.

Key words: sialadenitis, biofilm, elastase activity, BAPNA amidase activity, IL-1 β , sIgA.

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 представители рода *Streptococcus* [1].

Секреторный IgA (sIgA) представляет собой один из основных иммуноглобулиновых изотипов слюны и всех других секретов слизистых оболочек организма. Секреторный IgA связывает микроорганизмы и нейтрализует токсины, ингибирует связывание вирусов и бактерий с поверхностью слизистых оболочек. [2, 3].

В ряде работ показана роль бактериальных плёнок в развитии инфекционных осложнений у больных стоматологического профиля [4]. Наиболее важной отличительной особенностью бактерий, находящихся в составе биопленки, является повышенная резистентность к антибактериальным препаратам [5], что в определенной мере объясняет недостаточную эффективность проводимого лечения инфекции.

Наряду со способностью к фагоцитозу, нейтрофилы способны к нетозу – процессу кислородзависимой клеточной гибели, который является важным механизмом врожденного иммунного ответа: при нетозе происходит дезинтеграция ядерной мембраны и выброс ДНК наружу [6, 7]. Цитоплазма нейтрофилов содержит различные типы гранул, компоненты которых играют ведущую роль в эффекторных функциях нейтрофилов. Эластаза и трипсин являются компонентами первичных гранул нейтрофилов. БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости является одним из видов протеолитической активности, для изучения которой в качестве суб-

страта используют натрий-бензоил-DL-аргинин-4(p)-нитроанилида гидрохлорида [8].

Следует упомянуть о важности цитокинов, которые при воспалительной реакции выступают в качестве первичных регуляторов провоспалительных и противовоспалительных ответов. Важной ролью цитокинов является стимулирование образования и высвобождения большого количества других вторичных медиаторов воспаления [9, 10]. Содержание цитокинов в сыворотке крови пациентов резко меняется при развитии воспалительных процессов. Из этого следует, что оценка уровней отдельных ключевых цитокинов может служить в качестве диагностического и прогностического критерия развития и исхода заболевания. IL-1 β представляет собой один из ключевых медиаторов и выступает в качестве одного из наиболее важных регуляторов провоспалительного цитокинового каскада [11].

Цель исследования – изучить этиологическую структуру, уровень sIgA в ротовой жидкости и IL-1 β в сыворотке крови, ферментативную активность ротовой жидкости пациентов с сиаденитами.

Материал и методы

Было проведено обследование 86 пациентов с сиаденитами. Пациенты находились на стационарном лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии 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%. Длительность госпитализации составила от 3 до 13 дней,

в среднем $6,46 \pm 2,46$ дня.

Группу сравнения составили 23 человека без гнойно-воспалительных заболеваний и патологии слюнных желез.

Перед проведением лечебных мероприятий проводили забор ротовой жидкости за час до еды в стерильные пробирки. У пациентов с сиаладенитами два раза в течение срока госпитализации: 1 проба – в день поступления в стационар до проведения антибактериальной терапии, 2 проба – в первый день клинического выздоровления, совпадающий с выпиской пациента из стационара; ротовая жидкость замораживалась и хранилась при -25°C . Кровь забирали натощак с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугировалась со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 10 минут; сыворотка отбиралась, замораживалась и хранилась при -25°C . Перед проведением лечебных мероприятий в день поступления в стационар до проведения антибактериальной терапии проводили забор протоковой слюны из выводного протока большой слюнной железы в зависимости от локализации воспалительного процесса на транспортную питательную среду, в случае проведения хирургического вмешательства проводили интраоперационный забор материала с целью последующего выделения и идентификации микроорганизмов.

Идентификация микроорганизмов. Выделяли чистую культуру микроорганизма согласно инструкции по применению № 075-0210 «Микробиологические методы исследования биологического материала», утвержденной Министерством Здравоохранения Республики Беларусь 13.03.2010 г.

Для обнаружения различных видов стрептококков использовали кровяной агар Шедлера, стафилококки выделяли на желточно-солевом агаре, для выделения грибов применяли среду Сабуро, для кишечной группы бактерий – среду Эндо. Посевы помещали в анаэробостаты (Himedia) с пакетами GasPak EZ CO₂ Pouch System Sachets для создания капнофильных условий, культивировали в течение суток при 37°C . Для выделения облигатных анаэробов использовали кровяной агар Шедлера и пакеты для создания анаэробных условий HiAnaeroGasPack, которые также помещали в анаэробостат. При проведении культурально-исследовательского и последующей идентификации выделенных чистых культур руководствовались общепринятыми правилами клинической микробиологии, используя принятые алгоритмы. Для

идентификации выделенных культур использовали комплекс морфологических, культуральных, биохимических, хемотаксономических и других признаков.

Идентификацию аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе ATB Expression фирмы «bioMérieux». Для идентификации использовались стрипы: rapid ID 32 STREPT – для стрептококков, ID 32 STAPH – для стафилококков, ID 32 C – для кандид, rapid ID 32 A – для анаэробов.

Оценка способности микроорганизмов к формированию биопленок. Определяли способность микроорганизмов образовывать биопленки в течение 2 суток с помощью метода с применением 96-луночного полистиролового пластикового планшета. Для определения массы полученные на спектрофотометре значения оптической плотности (E_{opt}) переводили в вес микробной биопленки из расчета на одну лунку 96-луночного планшета для ИФА [12].

Метод определения минимальной подавляющей концентрации для бактерий в составе биопленки и планктонных форм. Для изучения эффективности применения антибактериальных препаратов сравнивали минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотиков для планктонных форм бактерий и микроорганизмов в составе биопленки с помощью метода серийных разведений. В качестве критериев чувствительности изолята к антибиотикам использовали рекомендации Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (EUCAST 7.1).

Способность сыворотки крови пациентов с сиаладенитами разрушать матрикс биопленки. Для оценки способности биологических объектов расщеплять экзополимерный матрикс биопленки применяли метод с использованием Конго-красного [12].

Определение эластазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами. Для определения активности эластазы нами была модифицирована методика определения эластазной активности в биологических жидкостях Бэйли Дж. [13].

Определение БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами. Для определения БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости в качестве субстрата протеолиза использовали бензоил-аргинин-р-

нитроанилид [14].

Оценку sIgA проводили с помощью набора реагентов для количественного иммуноферментного анализа «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ». Оценку содержания IL-1β в сыворотке крови пациентов с сиаладенитами проводили с помощью набора реагентов для количественного иммуноферментного анализа «Интерлейкин-1бета-ИФА-БЕСТ».

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программ Microsoft Excel 2007, Statgraphics 2.1., Statistica (Version 10, StatSoft Inc., США, лицензия №СТАФ999К347156W). Тип распределения количественных признаков определяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Так как изучаемые показатели имели непараметрическое распределение во всех группах (р для критерия Шапиро-Уилка во всех группах >0,05), статистическую обработку проводили с помощью теста Манна-Уитни для независимых выборок и парного критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Результаты представлены в виде медианы (Me) с указанием нижнего 25-й (LQ) и верхнего 75-й квартилей (UQ). Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводился непараметрическим методом Спирмена. Значение коэффициента корреляции $r = 0,7-0,99$ расценивали как сильную корреляцию, $r = 0,3-0,69$ – корреляцию средней силы, $r = 0-0,29$ – слабую корреляцию.

Результаты и обсуждение

При проведении бактериологического исследования у 67 (77,9%) пациентов с сиаладенитами 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*.

Среди представителей рода *Streptococcus* было идентифицировано 24 изолята, среди которых наиболее часто встречались *S.oralis* – 9 (37,5%) и *S. mitis* – 7 изолятов (29,17%), *S. sangvinis* – 4 изолята (16,7%) и *S. anginosus* – 3 изолята (12,5 %), *S. salivarius* – 1 изолят (4,13%).

Стафилококки были представлены *S. aureus* – 12 изолятов (52,2 %) и КОС *S. epidermidis* – 11 (47,8%). Энтеробактерии идентифицированы как *E. cloacae* – 2 изолята. Таким образом, наши исследования подтвердили полиэтиологичность сиаладенитов.

В большинстве случаев выделялся только один вид бактерий – 59 пациентов (84,3%). Микробная флора протоковой слюны была представлена микробными ассоциациями у 11 пациентов (15,7%), из них *G. morbillorum* + *A. viscosus* – 2 случая; в остальных случаях однократно встречались следующие варианты: *S. aureus* + *S. mitis*; *S. aureus* + *S. anginosus*; *S. epidermidis* + *A. viscosus*; *S. epidermidis* + *C. glabrata*; *S. epidermidis* + *S. mitis*; *S. epidermidis* + *S. sangvinis*; *S. mitis* + *S. oralis*; *S. mitis* + *S. salivarius* и *S. oralis* + *A. viscosus*.

Определена способность формировать биоплёнку у 58 клинических изолятов, выделенных от пациентов с сиаладенитами. Среди изученных микроорганизмов все в 100% случаев в той или иной степени обладали способностью к формированию биопленки. Масса биопленки, образуемая микроорганизмами протоковой слюны, представлена в таблице 1. Наибольшей способностью к формированию микробной пленки среди часто встречающихся изолятов обладали представители вида *S. aureus* – 24,45; 20,27-49,29 мкг/лунку, что статистически достоверно отличалось от таковой способности у *S. epidermidis* – 16,65; 14,48-23,95 ($p < 0,01$), *S. mitis* – 14,6; 8,47-24,84 ($p < 0,05$) и *S. oralis* – 9,69; 8,64-23,72 ($p < 0,01$).

Изоляты *S. aureus* продемонстрировали следующую резистентность к антибиотикам: к имипенему 0% случаев, к меропенему (0%), к ванкомицину (0%), к ципрофлоксацину (0%), к цефепиму (20%), к цефтриаксону (30%), к тейкопланину (30%), к моксифлоксацину (45%). При сравнении МПК₉₀ *S. aureus* в составе биопленок по сравнению с плактонными формами к антибиотикам обнаружено, что МПК₉₀ выросла от 8,5 до 99 раз. МПК для изолятов *S. aureus* в составе биопленки возросла в 8,5 раз для моксифлоксацина, в 10 раз для тейкопланина, в 12 раз – для цефтриаксона, в 24 раза – для цефепима, в 25 раз – для меропенема, в 29 раз – для имипенема, в 99 раз – для ванкомицина. Наиболее эффективными (100% чувствительных изолятов) для планктонных форм оказались меропенем – МПК₉₀ – 2 мкг/мл, имипенем – 2,01 мкг/мл, ванкомицин – 2,6 мкг/мл и ципрофлоксацин – 1,48 мкг/мл. В то же время в составе биопленки относительную эф-

Таблица 1 – Масса биопленки, образуемая изолятами, выделенными у пациентов с сиаладенитами

Микроорганизмы	N	Масса биопленки, мкг/лунку (Me; LQ - UQ)	Достоверность значений
1. <i>S. aureus</i>	12	24,45; 20,27-49,29	$p_{1-2} < 0,01$
2. <i>S. epidermidis</i>	11	16,65; 14,48-23,95	$p_{1-3} < 0,01$
3. <i>S. oralis</i>	9	9,69; 8,64-23,72	$p_{1-4} < 0,01$
4. <i>S. mitis</i>	7	14,6; 8,47-24,84	$p_{1-5} < 0,01$
5. <i>Candida spp.</i>	5	12,95; 11,27-13,73	$p_{1-6} < 0,05$
6. <i>G. morbillorum</i>	4	8,14; 7,99-10,82	$p_{1-8} < 0,05$
7. <i>S. sanguinis</i>	4	11,24; 9,64-33,56	$p_{1-9} < 0,05$
8. <i>S. anginosus</i>	3	36,12; 29,29-37,78	$p_{2-3} < 0,01$
9. <i>E. cloacae</i>	2	9,67; 9,1-10,24	$p_{2-5} < 0,05$
			$p_{2-6} < 0,01$
			$p_{2-9} < 0,05$
			$p_{3-8} < 0,01$
			$p_{5-6} < 0,05$
			$p_{5-8} < 0,01$
			$p_{6-8} < 0,01$
			$p_{4-8} < 0,05$
			$p_{7-8} < 0,05$

Примечание: в остальных случаях различия между группами были недостоверны, $p > 0,05$.

Таблица 2 – Уровень эластазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами

№	Группы пациентов	N	Уровень эластазной активности, пкат (Me; LQ - UQ)
1	Группа сравнения	23	0,0007; 0,00024-0,00228
2	Сиаладенит (проба 1)	38	0,043; 0,027-0,058
3	Сиаладенит (проба 2)	23	0,018; 0,0041-0,042

Примечание: различия между группами достоверны ($p_{1-2} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$).

фektivность (55% чувствительных изолятов) сохраняет имипенем.

При исследовании способности сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus* установлено, что она была достоверно ($p < 0,05$) ниже у пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез (8,28; 6,48-10,67 мкг/мл, $n=44$), чем у лиц группы сравнения (12,53; 11,16-13,39 мкг/мл, $n=12$).

С целью оценки чувствительности и специфичности метода был проведен ROC-анализ полученных данных. Способность сывороток крови пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез к разрушению матрикса биопленки является одним из факторов гуморальной неспецифической резистентности, снижение которого $\leq 11,28$ мкг/мл способствует развитию инфекционного процесса в больших слюнных железах пациентов с сиаладенитами, Ч=81,8%, С=75%, ДЭ=67,3-91,8.

При сравнении уровня активности эластазы ротовой жидкости у пациентов (табл. 2)

с сиаладенитами с таковым в группе сравнения выявлена статистически достоверная более высокая активность фермента у пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез (0,043; 0,027-0,058 и 0,0007; 0,00024-0,00228, $p < 0,001$). После завершения курса лечения уровень активности эластазы ротовой жидкости у пациентов с патологией больших слюнных желез статистически значимо отличался от показателей в группе сравнения (0,018; 0,0041-0,042 и 0,0007; 0,00024-0,00228, $p < 0,05$).

Был проведен ROC-анализ полученных результатов эластазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами (табл. 3); чувствительность метода 100%; специфичность 100%, ДЭ=85,6-100%. Исходя из данных по Ч и С, ДЭ представляется целесообразным использовать определение уровня активности эластазы в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами в качестве дополнительного диагностического критерия развития сиаладенита, $D \geq 0,005$ пкат.

При изучении БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости (табл. 4) у пациентов с

Таблица 3 – ROC-анализ данных, полученных при исследовании эластазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами

Группы сравнения	Д, пкат	С, %	Ч, %	ДЭ, %
Сиаладенит /группа сравнения (ротовая жидкость)	$\geq 0,005$	100	100	85,6-100

Таблица 4 – Уровень БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами

№	Группы пациентов	N	Уровень БАПНА-амидазной активности, пкат (Me; LQ - UQ)
1	Группа сравнения	23	2,5; 2,28-3,05
2	Сиаладенит (проба 1)	43	6,36; 4,87-8,81
3	Сиаладенит (проба 2)	28	3,9; 2,39-5,26

Примечание: различия между группами достоверны ($p_{1,2} < 0,001$; $p_{2,3} < 0,001$; $p_{1,3} < 0,01$).

Таблица 5 – ROC-анализ данных, полученных при исследовании БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами

Группы сравнения	Д, мг/мл	С, %	Ч, %	ДЭ, %
Сиаладенит /группа сравнения	$\geq 3,911$	100	81,4	66,6 – 91,6
Сиаладенит проба 1/ сиаладенит проба 2	$\leq 4,94$	74,42	71,43	51,3 – 86,7

Таблица 6 – ROC-анализ данных, полученных при исследовании уровня IL-1 β в сыворотке крови пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез

Группы сравнения	Д, пг/мл	С, %	Ч, %	ДЭ, %
Сиаладенит (N=27) /группа сравнения (N=10)	$\geq 15,507$	100	44	24,4-65,1

Таблица 7 – ROC-анализ данных, полученных при исследовании sIgA в ротовой жидкости у пациентов с сиаладенитом

Группы сравнения	Д, мг/мл	С, %	Ч, %	ДЭ, %
Сиаладенит (N=43) / группа сравнения (N=23)	$\leq 0,16$	80,95	77,78	60,8 – 89,9

воспалительными заболеваниями больших слюнных желез она была статистически достоверно выше, чем в контрольной группе (6,36; 4,87-8,81 и 0,0007; 0,00024-0,00228, $p < 0,001$; соответственно). В период реконвалесценции наблюдали снижение уровня БАПНА-амидазной активности в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами, однако сохранялась статистически достоверная разница в показателях активности у лиц группы сравнения с таковыми у пациентов с сиаладенитами в день выписки из стационара.

С целью оценки чувствительности и специфичности метода для диагностики сиаладенитов по уровню БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости и определения дополнительного критерия выздоровления пациентов был проведен ROC-анализ полученных данных (табл. 5) ($\text{Ч}=81,4\%$; $\text{С}=100\%$; $\text{ДЭ}=66,6-91,6\%$ и $\text{Ч}=71,43\%$;

$\text{С}=74,42\%$; $\text{ДЭ}=51,3-86,7\%$).

При оценке корреляционной зависимости между показателями эластазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами в день поступления в стационар и наличием лейкоцитоза установлена положительная корреляционная связь средней силы ($r=0,43$, $p < 0,05$). Таким образом, в процессе развития воспалительного процесса происходит миграция лейкоцитов в очаг воспаления и выделение из гранул моноцитов и нейтрофилов протеолитических ферментов, повышение активности которых мы и обнаружили в ротовой жидкости, данные показатели могут быть использованы в качестве дополнительных диагностических критериев, что и нашло отражение при проведении ROC-анализа.

Для оценки воспалительного процесса при сиаладенитах был изучен уровень провоспалительных

тельного цитокина IL-1 β в сыворотке крови пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез. В результате проведенного исследования установили, что средний уровень IL-1 β в сыворотке крови пациентов с сиаладенитами равен 16,25; 3,24-9,68 пг/мл, что статистически значимо отличается от содержания IL-1 β в сыворотке крови группы сравнения – 4,6; 2,49-9,56 пг/мл, $p < 0,05$. Определены диагностический критерий и диагностическая эффективность данного метода. ROC-анализ полученных результатов представлен в таблице 6.

Исходя из очень низкой чувствительности (44%) данный критерий нецелесообразно использовать в качестве диагностического критерия развития воспалительного процесса в больших слюнных железах. На основании проведенного ROC-анализа, исходя из данных относительно Ч, С и ДЭ наиболее значимым является применение в качестве дополнительного критерия развития сиаладенитов уровня активности эластазы выше 0,005 пкат.

Определение уровня sIgA в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами позволило получить следующие результаты: средний уровень sIgA в ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез составил 0,107; 0,066-0,151 мг/мл, что статистически значимо отличалось от содержания sIgA в ротовой жидкости лиц группы сравнения – 0,213; 0,165-0,289 мг/мл ($p < 0,01$).

В соответствии с данными, представленными в таблице 7, применение определения уровня sIgA в ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез в качестве диагностического критерия развития сиаладенитов сомнительно (Ч=77,78%; ДЭ=60,8-89,98%). В то же время снижение уровня sIgA $\leq 0,16$ мг/мл в ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез следует рассматривать как фактор риска развития гнойно-воспалительных заболеваний ротовой полости, что подтверждается при изучении взаимосвязи между уровнем sIgA в ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез и микробной этиологией воспалительного процесса в больших слюнных железах – установлена положительная корреляционная связь средней силы ($r=0,55$, $p < 0,001$).

Для изучения связи между микробиологическими и иммунологическими показателями,

характерными для развития воспалительных заболеваний больших слюнных желез, проводилась оценка корреляции между подтвержденной микробной этиологией воспалительного процесса и такими показателями, как эластазная и БАПНА-амидазная активности ротовой жидкости, уровень IL-1 β в сыворотке крови пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез.

При изучении взаимосвязи между уровнем эластазной, БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами и подтвержденной микробной этиологией воспалительного процесса в больших слюнных железах установлена положительная корреляционная связь средней силы ($r=0,58$, $p < 0,01$ и $r=0,60$, $p < 0,001$; соответственно); это связано с нетозом, в результате которого происходит выброс во внеклеточное пространство нейтрофилами «сетеподобных структур» и протеолитических ферментов из содержимого гранул.

При анализе связи между уровнем IL-1 β в сыворотке крови пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез и подтвержденной микробной природой воспалительного процесса в больших слюнных железах была выявлена положительная корреляционная связь средней силы ($r=0,46$, $p < 0,05$). IL-1 β является одним из ключевых медиаторов, обеспечивающих защитные реакции организма, цитокином, продуцируемым преимущественно моноцитарно-макрофагальной системой. Увеличение концентрации IL-1 β говорит об активации моноцитов и макрофагов, а также об усилении активности клеточного и гуморального иммунитета. Данный цитокин обеспечивает инициацию вовлечения в воспалительную реакцию различных клеток иммунной системы.

Заключение

1. В 77,9% случаев подтверждено значение микробного фактора сиаладенитов, в этиологической структуре преобладали представители рода *Streptococcus* (45,8%) и представители рода *Staphylococcus* (32,9%).

2. Все выделенные в исследовании изоляты обладали способностью образовывать микробную пленку. Наибольшей способностью к формированию микробной пленки среди наиболее важных патогенов обладали представители вида *S. aureus* – 24,45; 20,27-49,29 мкг/лунку.

3. Минимальная подавляющая концентрация антибактериальных препаратов *S. aureus* в составе биопленки возрастает от 8,5 до 99 раз по сравнению с МПК планктонных форм. Установлено, что наиболее эффективными в отношении *S. aureus* являются имипенем, меропенем, ванкомицин и ципрофлоксацин.

4. Предрасполагающим фактором риска развития сиаладенитов является снижение уровня sIgA в ротовой жидкости $\leq 0,16$ мг/мл. Наряду с этим установлен новый фактор риска развития воспалительных заболеваний больших слюнных желез, такой как низкая способность расщеплять матрикс биопленки – $\leq 11,28$ мкг/мл.

5. Предложено использовать определение уровня активности эластазы в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитами (выше 0,005 пкат) в качестве дополнительного диагностического критерия сиаладенитов.

Работа выполнена в рамках темы НИР «Иммунные механизмы развития воспалительных заболеваний больших слюнных желез», договор с БРФФИ № М17М-139 от 18.04.2017.

Литература

1. Слюнные железы: биохимия, физиология, клинические аспекты / Л. М. Тарасенко [и др.]. – Томск : Изд-во науч.-тех. лит., 2002. – 124 с.
2. Woof, J. M. The function of immunoglobulin A in immunity / J. M. Woof, M. A. Kerr / J. Pathol. – 2006 Jan. – Vol. 208, N 2. – P. 270–282.
3. Wines, B. D. IgA receptors in health and disease / B. D. Wines, P. M. Hogarth // Tissue Antigens. – 2006 Aug. – Vol. 68, N 2. – P. 103–114.
4. Effect of ambient humidity on the strength of the adhesion

- force of single yeast cell inside environmental-SEM / Y. Shen [et al.] // Ultramicroscopy. – 2011 Jul. – Vol. 111, N 8. – P. 1176–1183.
5. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues / S. A. Rice [et al.] // J. Bacteriol. – 2005 May. – Vol. 187, N 10. – P. 3477–3485.
6. Brinkmann, V. Beneficial suicide: why neutrophils die to, make NETs / V. Brinkmann, A. Zychlinsky // Nat. Rev. Microbiol. – 2007 Aug. – Vol. 5, N 8. – P. 577–582.
7. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // Science. – 2004 Mar. – Vol. 303, N 5663. – P. 1532–1535.
8. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps / S. Yousefi [et al.] // Cell. Death. Differ. – 2009 Nov. – Vol. 16, N 11. – P. 1438–1444.
9. Пинегин, Б. В. Принципы применения иммуномодуляторов в комплексном лечении инфекционных процессов / Б. В. Пинегин // Лечащий врач. – 2000. – № 8. – С. 34–38.
10. Fever of recombinant human interferon-alpha is mediated by opioid domain interaction with opioid receptor inducing prostaglandin E2 / Y. Wang [et al.] // J. Neuroimmunol. – 2004 Nov. – Vol. 156, N 1/2. – P. 107–112.
11. Fields Virology / B. N. Fields [et al.]. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – 3087 p.
12. Окулич, В. К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В. К. Окулич, А. А. Кабанова, Ф. В. Плотноков. – Витебск : ВГМУ, 2017. – 300 с.
13. Метод определения активности эластазы ротовой жидкости для диагностики гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области : инструкция по применению № 022-0415 : утв. М-ом здравоохранения Респ. Беларусь 23 дек. 2015 г. / Витеб. гос. мед. ун-т ; авт.-сост.: А. А. Кабанова [и др.]. – Витебск, 2015. – 5 с.
14. Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов класса G : инструкция по применению № 6-0101 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 17 мая 2002 г. / Витеб. гос. мед. ун-т ; авт.-сост.: В. К. Окулич [и др.]. – Витебск, 2002. – 8 с.

Поступила 10.05.2018 г.

Принята в печать 31.05.2018 г.

References

1. Tarasenko LM, Sukhanova GA, Mishchenko VP, Neporada KS. Salivary glands: biochemistry, physiology, clinical aspects. Tomsk, RF: Izd-vo nauch-tekh lit; 2002. 124 p. (In Russ.)
2. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. J Pathol. 2006 Jan;208(2):270-82. doi: 10.1002/path.1877
3. Wines BD, Hogarth PM. IgA receptors in health and disease. Tissue Antigens. 2006 Aug;68(2):103-14. doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00613.x
4. Shen Y, Nakajima M, Ahmad MR, Kojima S, Homma M, Fukuda T. Effect of ambient humidity on the strength of the adhesion force of single yeast cell inside environmental-SEM. Ultramicroscopy. 2011 Jul;111(8):1176-83. doi: 10.1016/j.ultramic.2011.02.008
5. Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW, Kjelleberg S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. J Bacteriol. 2005 May;187(10):3477-85. doi: 10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005
6. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to, make NETs. Nat Rev Microbiol. 2007 Aug;5(8):577-82. doi: 10.1038/nrmicro1710
7. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004 Mar;303(5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385
8. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. 2009

- Nov;16(11):1438-44. doi: 10.1038/cdd.2009.96
9. Pinegin BV. Principles of application of immunomodulators in complex treatment of infectious processes. *Lechashchii Vrach*. 2000;(8):34-8. (In Russ.)
 10. Wang YX, Xu WG, Sun XJ, Chen YZ, Liu XY, Tang H, et al. Fever of recombinant human interferon-alpha is mediated by opioid domain interaction with opioid receptor inducing prostaglandin E2. *J Neuroimmunol*. 2004 Nov;156(1-2):107-12. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.07.013
 11. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. 3087 p.
 12. Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Microbial biofilms in clinical Microbiology and antibacterial therapy. Vitebsk, RB: VGMU; 2017. 300 p. (In Russ.)
 13. Kabanova AA, Okulich VK, Goncharova AI, Kolchanova NE, Korneeva DE, avt-sost; Viteb Gos Med Un-t. Method of determining the activity of elastase of oral fluid for the diagnosis of purulent-inflammatory diseases of the maxillofacial region: instruktsiia po primeneniui № 022-0415: utv M-om zdavookhraneniia Resp Belarus' 23 dek 2015 g. Vitebsk, RB; 2015. 5 p. (In Russ.)
 14. Okulich VK, Kosinets AN, Sen'kovich SA, Konopel'ko EA, avt-sost; Viteb Gos Med Un-t. Definition BAPNA-amidase of microbial activity, serum and immunoglobulin G: instruktsiia po primeneniui № 6-0101: utv M-vom zdavookhraneniia Resp Belarus' 17 maia 2002 g. Vitebsk, RB; 2002. 8 p. (In Russ.)

Submitted 10.05.2018

Accepted 31.05.2018

Сведения об авторах:

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

Information about authors:

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

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, 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, 210023, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Clinical Microbiology. E-mail: anna2569@yandex.ru – Anna I. Goncharova.