

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.316-002: 579

ГОНЧАРОВА
Анна Игоревна

**МИКРООРГАНИЗМЫ, ОБРАЗУЮЩИЕ БИОПЛЕНКУ,
В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
БОЛЬШИХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск, 2020

Научная работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Научный руководитель:

Окулич Виталий Константинович,

кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры микробиологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Официальные оппоненты:

Полещук Николай Николаевич,

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории диагностики сочетанных бактериально-вирусных инфекций государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Коломиец Наталья Дмитриевна,

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 10 апреля 2020 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovnet@bsmu.by, тел. 277 16 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 года

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 03.18.04,
кандидат медицинских наук,
доцент



А.П. Музыченко

ВВЕДЕНИЕ

Сиаладенит остается нерешенной проблемой поражения больших слюнных желез, и с данной патологией к стоматологу обращаются от 4 до 7% пациентов хирургического профиля. У пациентов с сиаладенитами наиболее часто бактериологическим методом идентифицируют изоляты *S.epidermidis*, *S.aureus*, *E.coli*, представителей рода *Streptococcus* (*S. sanguis*, *S. milleri*, *S. intermedius*). Молекулярно-генетическое исследование является неотъемлемой частью комплекса диагностических процедур на современном этапе развития медицины. Неоспоримым преимуществом метода является возможность при минимальном количестве материала в кратчайшие сроки получить ответ об этиологии заболевания. Наиболее эффективным подходом для изучения патогенов при воспалительных процессах является применение комплексной диагностики, сочетающей бактериологическое исследование и метод ПЦР-диагностики. Необходимо учитывать, что бактерии в природе и в качестве патогенов редко встречаются в виде отдельных планктонных клеток и существуют в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок. Отличительной чертой бактерий, находящихся в составе биопленки, является повышенная резистентность к антибактериальным лекарственным средствам [White. R, 2014].

Врожденный иммунитет обеспечивает устойчивость к условно-патогенным микроорганизмам, если не возникает относительный иммунодефицит. Важнейшими клетками иммунной системы являются нейтрофилы, которые фагоцитируют и лизируют бактерии, однако их оценка при локальной инфекции представляет собой сложную задачу [Новиков Д.К., 2011]. При активации нейтрофилов микроорганизмами происходит выделение во внеклеточные пространства содержимого первичных и вторичных гранул, включая ферменты лизоцим, эластазу, миелопероксидазу, сериновые протеазы, кислые гидролазы. Лизоцим присутствует во всех жидкостях организма и представляет собой важный фактор бактерицидности. Оценка лизоцимной и протеолитической активности ротовой жидкости как фактора неспецифической резистентности позволяет изучить функциональное состояние слюнных желез и протективные свойства ротовой жидкости при патологических процессах в ротовой полости [Генералов И.И., 2012; Carpenter G.H., 2013].

Таким образом, актуальным и важным являются: изучение этиологической структуры сиаладенита с использованием генетического метода и оценкой способности микроорганизмов к образованию биопленки, с определением факторов неспецифической резистентности, включая уровень мурамидазы и протеолитической активности ротовой жидкости.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами

Работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» в рамках двух научно-исследовательских проектов БРФФИ: «Изучение патогенеза развития воспалительных заболеваний больших слюнных желез», № государственной регистрации 20131759, M13-M089, срок выполнения 2013-2015 гг. и «Иммунные механизмы развития воспалительных заболеваний больших слюнных желез», № государственной регистрации 20171195, M17-M139, сроки выполнения 2017-2019 гг.

Тема диссертационного исследования соответствует пункту 4 «Медицина и фармация» из перечня «Приоритетные направления научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг.», утверждённого Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г., № 190.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – оценить роль биопленкообразующих микроорганизмов в развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез с учетом неспецифической резистентности макроорганизма.

Задачи исследования:

1. Установить этиологическую структуру воспалительных заболеваний больших слюнных желез с использованием бактериологического и генетического методов диагностики.

2. Определить способность выделенных при сиаладените возбудителей представителей семейств: *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* и *Cryptococcaceae* к биопленкообразованию. Оценить наличие микробного матрикса как кофактора, повышающего резистентность к антибиотикам.

3. Разработать эффективный способ определения активности лизоцима в биологических жидкостях с использованием субстрата пептидогликана *Micrococcus lysodeikticus* и оценить его роль как фактора неспецифической резистентности у пациентов с сиаладенитом.

4. Установить критерии оценки эластазной и трипсиноподобной активностей ротовой жидкости для учета выраженности воспалительного процесса в больших слюнных железах.

Объект исследования: 86 пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез и 30 лиц без патологии слюнных желез в анамнезе, обследованных в отделении стоматологии УЗ «Витебская областная клиническая больница» и на базе кафедры челюстно-лицевой хирургии и

хирургической стоматологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», 70 изолятов, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитом на базе кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» и микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» в период с 2013 по 2018 гг.

Предмет исследования: микробиологические и иммунологические показатели, полученные при применении лабораторных и клинических методов исследования пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез.

Научная новизна

Установлена этиологическая структура воспалительных заболеваний больших слюнных желез (представители рода *Streptococcus* 45,8%; *Staphylococcus* – 32,9%; *Candida* – 7,1%; *Actinomyces* – 7,1%; *Gemella* – 4,3% и семейства *Enterobacteriaceae* 2,8%). Определена способность к формированию биопленки у 85% микроорганизмов, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитом. Наибольшая биопленкообразующая способность отмечена для изолятов *S. aureus*, что приводит к росту минимальной подавляющей концентрации антибиотиков для изолятов *S. aureus* в составе биопленки от 8,5 до 99 раз. Установлено, что снижение биопленкоцидной способности сыворотки крови пациентов с воспалительными процессами больших слюнных желез ниже 11,28 мкг/мл является одним из предрасполагающих факторов риска развития сиаладенита.

Разработан и запатентован способ определения лизоцима в биологических жидкостях с использованием субстрата пептидогликана культуры *Micrococcus lysodeikticus*, не требующий наличия живой культуры микроорганизма, способ обладает чувствительностью 60 мкг/мл, коэффициентом вариации 6,7% и общей воспроизводимостью 7,4 %. Выявлено, что концентрация лизоцима 1000 мкг/мл в ротовой жидкости, выделенной от пациентов с сиаладенитом, не обеспечивает защиту от возбудителей воспалительного процесса в слюнных железах.

В качестве дополнительных критериев для диагностики сиаладенита предложено использовать повышение уровня лизоцима выше 340 мкг/мл и эластазной активности ротовой жидкости выше 1,3 фкат.

Положения, выносимые на защиту

1. Основными этиологическими агентами у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями больших слюнных желез являются представители семейства *Streptococcaceae* (45,8%) и *Staphylococcaceae* (32,9%). Сочетание бактериологического метода с мультиплексной полимеразной

цепной реакцией в режиме реального времени увеличивает эффективность выявления возбудителей сиаладенита с 77,9% до 94,5% случаев, $p < 0,05$.

2. Наибольшая биопленкообразующая способность отмечена для вида *Staphylococcus aureus* 24,45; 20,27 – 49,29 мкг/лунку, меньшая – для вида *Staphylococcus epidermidis* 16,65; 14,48 – 23,95; $p < 0,01$; *Streptococcus mitis* 14,6; 8,47 – 24,84; $p < 0,01$ и *Streptococcus oralis* 9,69; 8,64 – 23,72; $p < 0,01$. Для изолятов *S. aureus* в составе биопленки значительно (от 8,5 до 99 раз) возрастает минимальная подавляющая концентрация антибиотиков, что необходимо учитывать при назначении антибактериальной терапии.

3. Разработан способ определения лизоцима в биологических жидкостях, не требующий наличия живой культуры *Micrococcus lysodeikticus*. Способ основан на использовании субстрата пептидогликана, меченого Конго красным, позволяет оценить концентрацию лизоцима с чувствительностью ≥ 60 мкг/мл, с коэффициентом вариации 6,7% и общей воспроизводимостью 7,4 %. Уровень лизоцима > 340 мкг/мл может служить дополнительным диагностическим критерием развития сиаладенита с отношением шансов 8 (ДИ95% 2,64 – 24,98). Повышение уровня данного фермента в ротовой жидкости с 223,2; 97,93 – 303,42 до 559,71; 387,8 – 884,8 мкг/мл не обеспечивает защиту от биопленкообразующих возбудителей сиаладенита.

4. Установлено повышение уровня эластазы 4,5; 2,7 – 9,9 фкат и трипсиноподобной активности 6,36; 4,87 – 8,8 пкат ротовой жидкости при развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез. Определение повышенного уровня эластазы с отношением шансов 54 (ДИ95% 9,41 – 309,81) или трипсиноподобной с отношением шансов 16 (ДИ95% 3,38 – 80,05) активности – дополнительный диагностический критерий сиаладенита. Снижение sIgA $< 0,16$ мг/мл в ротовой жидкости и биопленкоцидной способности сыворотки крови $< 11,28$ мкг/мл являются информативными показателями риска развития сиаладенита.

Личный вклад соискателя ученой степени

Соискателем совместно с научным руководителем сформулированы цель и задачи исследования, определены методы и основные этапы выполнения работы. Диссертантом лично выполнены все экспериментальные исследования, проведен сравнительный анализ литературных источников, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе, статистическая обработка полученных данных. Лично автором обследовано 86 пациентов. Диссертант принимал непосредственное участие в составлении плана лечебных мероприятий, диагностике, лечении и профилактике пациентов с сиаладенитом. Непосредственно автором осуществлен забор, хранение и подготовка лабораторного материала к исследованию. Микробиологические исследования проведены на кафедре клинической микробиологии УО «Витебский

государственный медицинский университет» и в микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии». Самостоятельно написаны все разделы диссертации, совместно с научным руководителем выполнен анализ данных, сформулированы выводы и практические рекомендации. Личный вклад автора в подготовку статей, докладов и тезисов – до 90%, для патентов [29, 31] и инструкции по применению [33] – до 80%; для совместных публикаций [1,7,9-14,16], патента [30] и инструкции по применению [32] – от 30 до 50%. В опубликованных материалах диссертантом выполнен анализ литературы и собственных экспериментальных исследований, полностью проведена статистическая обработка данных. По результатам исследования разработаны и утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь две инструкции по применению: «Методы определения активности эластазы ротовой жидкости для диагностики гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области» [32] и «Метод определения активности лизоцима» [33].

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты научных исследований были представлены на международных научно-практических конференциях «Студенческая медицинская наука XXI века» (Витебск, 2014, 2016); итоговых научно-практических конференциях студентов и молодых учёных «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (Витебск, 2014, 2015, 2016, 2017); научной сессии сотрудников университета «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (Витебск, 2015); на международных научно-практических конференциях «День высокой стоматологии в Республике Беларусь» (Минск, 2017); Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения молодых ученых в медицине 2017» (Гродно, 2017); на I Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Современные достижения хирургической стоматологии», посвященной 15-летию кафедры хирургической стоматологии, приуроченной к 260-летию со дня основания Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, 2018); на 19-ом Международном конгрессе молодых ученых (Познань, Польша, 2019).

Результаты диссертационного исследования внедрены в работу учреждения здравоохранения «Витебская областная стоматологическая поликлиника», учреждения здравоохранения «Витебская областная клиническая больница», учреждения здравоохранения «Гомельская областная клиническая больница», учреждения здравоохранения «Брестская областная клиническая больница», учреждения здравоохранения «Могилевская областная больница», стоматологической клиники Карагандинского государственного

медицинского университета, государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Стоматологическая поликлиника №1» г. Рязань; в учебный процесс учреждения образования «Витебский государственный медицинский университет», учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», учреждения образования «Карагандинский государственный медицинский университет».

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», общим объемом 3,3 авторских листа; 1 статья в научном журнале; 18 статей в сборниках научных трудов и материалов конференций и 3 тезисов докладов; 2 патента на изобретение; патент на полезную модель; 2 инструкции по применению, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, главы аналитического обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, библиографического списка, включающего 171 использованный источник (50 русскоязычных, 121 на иностранном языке), списка работ соискателя, 3 приложений. Работа изложена на 128 страницах компьютерного текста, содержит 21 таблицу (объемом 5 страниц), 12 рисунков (объемом 6 страниц).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Было проведено обследование 86 пациентов с сиаладенитом. Пациенты находились на стационарном лечении в отделении стоматологии УЗ «Витебская областная клиническая больница» (УЗ «ВОКБ»). Критерии включения пациентов в исследование: пациенты обоих полов (мужчины, женщины), возраст 18–80 лет, сиаладенит, диагноз по МКБ-10 – K11.2. Критерии исключения из исследования: возраст менее 18 и более 80 лет, другие воспалительные или дегенеративные заболевания полости рта, беременность, наличие острых воспалительных заболеваний или обострений хронических сопутствующих соматических заболеваний, а также наличие соматических

заболеваний в стадии декомпенсации, онкологических заболеваний.

Средний возраст пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез составил $47,25 \pm 14,78$ лет, в демографической структуре преобладали мужчины, составившие – 54,65 %, женщины – 45,35 %. Длительность госпитализации пациентов от 3 до 13 дней, в среднем $6,46 \pm 2,46$ дня. Группу сравнения составили 30 человек без гнойно-воспалительных заболеваний и патологии слюнных желез, с отсутствием острых воспалительных заболеваний или обострений хронических сопутствующих соматических заболеваний.

Забор протоковой слюны для бактериологического исследования проводили из выводного протока большой слюнной железы на транспортную питательную среду в зависимости от локализации воспалительного процесса. Для определения уровня протеолитических ферментов и иммуноглобулинов, изучения способности к разрушению матрикса биопленки использовали ротовую жидкость и сыворотку крови. Сбор ротовой жидкости проводили за час до еды путем сплевывания пациентом в стерильную пробирку. Забор ротовой жидкости и сыворотки крови производился в день поступления в стационар до проведения антибактериальной терапии (проба 1) и в день завершения лечения (проба 2).

Лабораторная и экспериментальная части исследования были проведены на кафедре клинической микробиологии УО «Витебского государственного медицинского университета» и в микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии».

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

Параллельно с бактериологическим методом исследования проводили мультиплексную ПЦР-диагностику в режиме реального времени. Для обнаружения генетических маркеров *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* использовали набор реагентов «Септоскрин» («Литех», Россия). Результат оценивали в программе Bio Rad CFX Manager 3.0. Определение способности микроорганизмов, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитом, к образованию биопленки проводили с использованием 96-луночного полистеролового планшета с окраской генцианвиолетом. Оценку эффективности использования антибиотиков проводили путем сравнения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибактериальных

препаратов для микроорганизмов в планктонной форме и в составе бактериальной пленки, используя метод серийных разведений. Чувствительность выделенного микроорганизма к антибактериальным препаратам анализировали, используя рекомендации Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (EUCAST 7.1). Для оценки способности сыворотки крови расщеплять экзополимерный матрикс биопленки применяли метод с использованием Конго красного. Для определения эластазной активности в биологических жидкостях использовалась модифицированная методика Бэйли Дж. С целью исследования трипсиноподобной протеолитической активности использовался хромогенный субстрат бензоил-аргинин-*p*-нитроанилид (БАПНА). Оценку sIgA проводили с помощью набора реагентов для количественного иммуноферментного анализа «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ». Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета «Statistica» (Version 10) и «MedCalc» (Version 11.6.1.0). При распределении признака, отличного от нормального, вычисляли медиану (Me), нижний 25-й (LQ) и верхний 75-й квартили (UQ); Me; LQ – UQ. Оценку статистической значимости различий между зависимыми группами проводили с помощью непараметрического теста Вилкоксона. Для оценки статистической значимости между несвязанными группами использовался критерий Манна-Уитни. Возможность использования методик для диагностики сиаладенита оценивали по отношению шансов (OR) и при проведении ROC-анализа полученных данных, при этом определяли область под ROC-кривой (AUC), чувствительность (Ч), специфичность (С).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Этиологическая структура сиаладенита

Изучена этиологическая структура возбудителей сиаладенита. При проведении бактериологического исследования у 67 (77,9%) пациентов с сиаладенитом выделено 70 изолятов. Отрицательные результаты посевов получены в 19 случаях (22,1%). Наиболее часто встречались представители рода *Streptococcus* – 32 микроорганизма (45,7%) 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 (2,9%) – представители семейства *Enterobacteriaceae*.

Среди представителей рода *Streptococcus* до вида было идентифицировано 24 изолята, среди которых наиболее часто встречались *S.oralis* – 9 изолятов (37,5%) и *S.mitis* – 7 изолятов (29,17%), *S.sanguinis* – 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.

В большинстве случаев выделялся только один вид бактерий – у 64 пациентов (95,5%), а в 3 случаях (4,5 %) микробная флора была представлена микробными ассоциациями: *S.aureus* + *S.mitis*, *S.aureus* + *S.anginosus*, *S.mitis* + *S.oralis*. 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*. Комплексная диагностика с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов увеличивает количество выявленных возбудителей на 16,6%. Таким образом, сочетание бактериологического и молекулярно-генетического методов позволяет более точно установить этиологическую структуру сиаладенита.

Влияние биопленкообразования на чувствительность к антибиотикам

Установлена способность формировать биопленку у 57 (85%) из 67 клинических изолятов, выделенных от пациентов с сиаладенитом (таблица 1).
Таблица 1. – Масса биопленки, образуемая изолятами, выделенными у пациентов с сиаладенитом

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; p ₁₋₃ <0,01; p ₁₋₄ <0,01; p ₁₋₅ <0,01 p ₁₋₆ <0,05; p ₁₋₈ <0,05 p ₁₋₉ <0,05; p ₂₋₃ <0,01 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
2. <i>S.epidermidis</i>	11	16,65; 14,48 – 23,95	
3. <i>S.oralis</i>	9	9,69; 8,64 – 23,72	
4. <i>S.mitis</i>	7	14,6; 8,47 – 24,84	
5. <i>Candida spp</i>	5	12,95; 11,27 – 13,73	
6. <i>G.morbilloorum</i>	3	8,14; 7,99 – 10,82	
7. <i>S.sangvinis</i>	4	11,24; 9,64 – 33,56	
8. <i>S.anginosus</i>	3	36,12; 29,29 – 37,78	
9. <i>E.cloacae</i>	2	9,67; 9,1 – 10,24	

Самой высокой способностью к формированию микробной пленки среди наиболее значимых патогенов обладают представители вида *S. aureus* – 24,45; 20,27 – 49,29 мкг/лунку, что статистически значимо 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<0,01) и *S.oralis* – 9,69; 8,64 – 23,72 (p<0,01).

Наиболее эффективными антимикробными препаратами для планктонных форм (таблица 2) являются меропенем МПК₉₀ – 2 мкг/мл, имипенем МПК₉₀ – 2,01 мкг/мл, ванкомицин МПК₉₀ – 2,6 мкг/мл (100% чувствительных изолятов).

Изоляты *S.aureus* продемонстрировали следующую резистентность к антибиотикам в планктонной форме: имипенему 0% случаев, меропенему 0%,

ванкомицину 0%, цефепиму 20%, цефтриаксону 30%, тейкопланину 30%, моксифлоксацину 45 %.

Таблица 2. – Чувствительность клинических изолятов *S.aureus* к антибиотикам в планктонной форме

Препарат	S, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Ме, МПК	Min/max	LQ; UQ
Имипенем	100	0	0,32	2,01	0,125	0,125/4	0,125;0,375
Меропенем	100	0	0,08	2	0,125	0,125/4	0,125; 0,375
Моксифлоксацин	55	45	1,36	7,56	1	0,5/16	1;8
Цефтриаксон	70	30	3,2	12,13	4	1/16	2,5; 7
Цефепим	80	20	0,014	10,5	1	1/4	1;1
Ванкомицин	100	0	1,17	2,6	2	0,5/2	1;2
Тейкопланин	70	30	1,1	17,24	1	0,5/128	0,75;4,5

При оценке минимальной подавляющей концентрации *S.aureus* в составе биопленок по сравнению с планктонными формами к антибиотикам обнаружено, что МПК₉₀ выросла от 8,5 до 99 раз (таблица 3).

Таблица 3. – Чувствительность клинических изолятов *S.aureus* в составе биопленки

Препарат	S, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Ме, МПК	Min/max	LQ; UQ
Имипенем	55	45	2,8	57,5	4	0,125/128	1;24
Меропенем	20	80	10,7	50	16	2/128	16;32
Моксифлоксацин*	0	100	64	64	64	64	64
Цефтриаксон	10	90	25,2	147	32	4/256	16;112
Цефепим*	0	100	256	256	256	256	256
Ванкомицин*	0	100	256	256	256	256	256
Тейкопланин	15	85	19,3	171	32	2/256	20;256

Примечание: МПК не определен, так как превышал максимальное разведение.

Минимальная подавляющая концентрация антибиотика для 90% исследованных изолятов *S. aureus*, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитом, в составе биопленки возросла от 7,56 мкг/мл до 64 мкг/мл для моксифлоксацина; от 17,24 мкг/мл до 171 мкг/мл для тейкопланина; от 12,13 мкг/мл до 147 мкг/мл для цефтриаксона; от 10,5 мкг/мл до 256 мкг/мл для цефепима; от 2 мкг/мл до 50 мкг/мл для меропенема; от 2,01 мкг/мл до 57,5 мкг/мл для имипенема и от 2,6 мкг/мл до 256 мкг/мл для ванкомицина. Таким образом, в составе биопленки резко увеличивается резистентность к различным антибиотикам.

Разработка способа определения активности лизоцима. Фермент лизоцим как фактор неспецифической резистентности в развитии сиаладенита

Разработан способ определения активности лизоцима в биологических средах с использованием субстрата пептидогликана из культуры *Micrococcus lysodeikticus*, меченого Конго красным, диагностическая чувствительность

которого 60 мкг/мл, коэффициент вариации 6,7% и общая воспроизводимость 7,4 %. Способ не требует наличия живой культуры *Micrococcus lysodeikticus*.

На первом этапе получали пептидогликан из клеточной стенки *Micrococcus lysodeikticus* как наиболее чувствительного к лизоциму по методике, предложенной Львовом В.Л., Пинегиным Б.В., Хаитовым Р.М. в нашей модификации [31, 33]. Для улучшения доступности частиц для фермента суспензию пептидогликана, полученную после диализа, разбивали ультразвуковым генератором УЗГ 55-22 мощностью 0,1-10 кВт, частотой 20-40 кГц в течение 60 мин (режим для получения однородных частиц), с последующим однократным центрифугированием в течение 30 минут при 1,5 тыс. об/мин и отмывкой 0,9% раствором NaCl. Для проведения данного эксперимента полученную суспензию пептидогликана метили 2%-ым раствором Конго красного в соотношении 20 мкл на 1 мл суспензии. Для того, чтобы максимально очистить пептидогликан от других примесей бактериальной клетки, его обрабатывали различными ферментами: гиалуронидазой, папаином, трипсином, РНК-азой, пероксидазой, альфа-амилазой, ДНК-азой II-типа; пепсином, а в качестве положительного контроля использовали лизоцим. При обработке неочищенного пептидогликана ДНК-азой наблюдалось расщепление субстрата с выделением максимального количества Конго красного, которое определяли по увеличению оптической плотности ($p < 0,05$). В методику получения пептидогликана внесены изменения, а именно, полученную суспензию с целью очистки пептидогликана от примесей ДНК необходимо обрабатывать ферментом ДНК-азой в концентрации 1,7 мг/мл. В результате получали очищенный субстрат пептидогликана, меченый Конго красным.

Оценку качества полученного субстрата проводили посредством конфокальной микроскопии. Для этого готовили препарат «висячая капля» и немедленно проводили послойное сканирование на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE. Диаметр частиц по аналогии с другими субстратами, мечеными Конго красным, составляет от 2 до 9 мкм, т.к. частицы данного размера обеспечивают максимальную доступность для фермента и легко осаждаются при центрифугировании. Субстрат хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования.

Нами предложен и запатентован метод определения активности лизоцима в биологических жидкостях. В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 300 мкл 0,06 М фосфатного буферного раствора (ФБР) pH 6,0; 100 мкл субстрата и 100 мкл биологического объекта (сыворотка, ротовая жидкость). Для сыворотки эксперимент проводили с использованием дополнительного ряда эппендорфов – 300 мкл ФБР, 100 мкл субстрата и 100

мкл сыворотки после инактивации. Опытная проба содержала 300 мкл ФБР, 100 мкл субстрата и 100 мкл сыворотки или ротовой жидкости. Контролем служили пробы, содержащие фосфатный буферный раствор pH 6,0 в количестве 300 мкл, 100 мкл 0,9% раствора NaCl и 100 мкл биологического объекта. Далее проводили инкубацию проб в термостате при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 7 мин (10 тыс. об/мин; MICRO 120) для сывороток и 500 об/мин в течение 10 секунд для проб с ротовой жидкостью для осаждения оставшегося неразрушенного субстрата. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм определяли оптическую плотность в лунках. Промежуточный результат выражали в единицах оптической плотности и рассчитывали как разность оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета итогового результата активности лизоцима в мкг/мл была использована формула, полученная после проведения корреляционно-регрессионного анализа. Построен подобранный калибровочный график по разведенному лизоциму (*Lysozyme from human neutrophils* производство Sigma), в котором отражена зависимость концентрации лизоцима от оптической плотности Конго красного.

В результате формула для расчета активности лизоцима имеет следующий вид:

$$X = 7318,72 * (A_{\text{опп}} - A_{\text{опк}})^{2,26},$$

где X – активность лизоцима, в мкг/мл;

$A_{\text{опп}}$ – оптическая плотность пробы;

$A_{\text{опк}}$ – оптическая плотность контроля

При сравнении разработанного способа определения активности лизоцима со стандартным методом диффузии в агар и иммуноферментным методом статистически значимых отличий выявлено не было, $p > 0,05$.

Установлено значимое повышение уровня активности лизоцима в ротовой жидкости при развитии воспалительного процесса в больших слюнных железах (559,71; 387,8 – 884,8 мкг/мл). В период реконвалесценции активность лизоцима в ротовой жидкости нормализуется и составляет 286,83; 204,69 – 334,35 мкг/мл, однако сохраняется статистически значимое отличие показателя активности лизоцима от лиц группы сравнения (223,198; 97,93 – 303,42 мкг/мл; $p < 0,05$). Определение уровня активности лизоцима в ротовой жидкости пациентов можно использовать в качестве дополнительного диагностического

критерия развития сиаладенита, учитывая высокое отношение шансов 8 (ДИ95% 2,64 – 24,98), специфичность 90% (ДИ95% 68,3 – 98,8) и чувствительность 76,9% (ДИ95% 60,7 – 88,9) теста в сравнении с уже известными в клинической и лабораторной практике, такими как определение количества лейкоцитов, нейтрофилов и СОЭ.

Установлена бактериостатическая активность лизоцима против стандартных штаммов и изолятов, выделенных от пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез. Продуцируемый высокий уровень лизоцима 1000 мкг/мл эффективен только против стандартного штамма *M.lysodeikticus* и изолята *S.aureus*, выделенного из протоковой слюны пациента. В то же время, данная концентрация лизоцима была неэффективна против изолятов стрептококков, наиболее часто выделяемых у пациентов с сиаладенитом. Концентрация лизоцима 600 мкг/мл, близкая к медианному значению активности лизоцима ротовой жидкости пациентов с сиаладенитом, эффективна только в отношении *M.lysodeikticus* и не подавляет рост *S.aureus* ATCC 29213, *S.pneumonia* ATCC 49619 и *S.agalactiae* ATCC 13813 и изолятов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.oralis*, *S.mitis*, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитом.

Неспецифические факторы резистентности ротовой полости при сиаладените

Изучена эластазная и БАПНА-амидазная активность, определен уровень sIgA ротовой жидкости, выделенной от пациентов с сиаладенитом. Установлено значимое ($p < 0,01$) повышение уровня активности эластазы в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитом в день поступления в стационар – 4,5; 2,7 – 9,9 фкат. Повышение активности эластазы в ротовой жидкости пациентов (выше 1,3 фкат) определено в качестве дополнительного диагностического критерия наличия воспаления в слюнных железах с чувствительностью 94,74% (ДИ95% 82,2 – 99,2) и специфичностью 78,95% (ДИ95% 54,4 – 93,8); отношение шансов – 54 (ДИ95% 9,41 – 309,81). В период ремиссии активность эластазы в ротовой жидкости снижается и составляет 1,7; 0,6 – 2,6 фкат, однако сохраняется отличие показателя активности эластазы от такового показателя у лиц группы сравнения 0,9; 0,2 – 1,3; $p < 0,01$. Снижение эластазной активности $< 2,9$ фкат с чувствительностью 73,68% (ДИ95% 56,9 – 86,6) и специфичностью 73,68 % (ДИ95% 56,9 – 86,6) – критерий выздоровления.

Установлено достоверное повышение БАПНА-амидазной активности в ротовой жидкости при развитии воспалительного процесса в больших слюнных железах (6,36; 4,87– 8,8 пкат). Повышение БАПНА-амидазной активности в ротовой жидкости выше 3,27 пкат – дополнительный критерий наличия сиаладенита с чувствительностью 86,05% (ДИ95% 72,1 – 94,7) и

специфичностью 81,82% (ДИ95% 48,2 – 97,2); отношение шансов – 16 (ДИ95% 3,38 – 80,05). В период ремиссии отмечено снижение БАПНА-амидазной активности в ротовой жидкости до уровня 3,9; 2,39 – 5,26 пкат, однако сохраняется отличие показателя БАПНА-амидазной активности от лиц из группы сравнения 2,5; 2,28-3,05 пкат ($p < 0,01$).

Уровень sIgA составил 0,107; 0,066 – 0,151 мг/мл, тогда как у лиц из группы сравнения данный показатель равнялся 0,213; 0,165 – 0,289 мг/мл ($p < 0,01$). 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. Установлена корреляционная связь средней силы: между микробной этиологией воспалительного процесса в больших слюнных железах с повышением уровня эластазной и БАПНА-амидазной активности ротовой жидкости, пониженным уровнем sIgA в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитом ($r = 0,58$, $p < 0,01$; $r = 0,60$, $p < 0,001$; $r = -0,55$, $p < 0,001$; соответственно).

Изучена способность сыворотки крови пациентов с сиаладенитами разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus* (биопенкоцидная способность). При исследовании биопенкоцидной способности сывороток крови пациентов с сиаладенитом и лиц из группы сравнения установлено, что она была значимо ($p < 0,05$) ниже у пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез (8,28; 6,48-10,67 мкг/мл), чем у лиц группы сравнения (12,53; 11,16-13,39 мкг/мл). 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 – один из факторов риска развития инфекционного процесса в больших слюнных железах пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Микробиологическое исследование в сочетании с генетическим анализом позволяет установить этиологическую структуру воспалительных заболеваний больших слюнных желез: представители рода *Streptococcus* выделялись в 45,8%; *Staphylococcus* – 32,9%; *Candida* – 7,1%; *Actinomyces* – 7,1%; *Gemella* – 4,3% и семейства *Enterobacteriaceae* 2,8%; исключить контаминацию и обнаружить микроорганизмы в большем проценте случаев по сравнению с использованием только бактериологического метода [3, 4, 6, 18].

2. Возбудители сиаладенита в 85% случаев образуют биопленку. Самой высокой способностью к формированию микробной пленки среди наиболее значимых патогенов обладает вид *Staphylococcus aureus* – 24,45; 20,27 – 49,29 мкг/лунку, что отличает его от таковой у *Staphylococcus epidermidis* 16,65; 14,48 – 23,95 ($p < 0,01$); *Streptococcus mitis* 14,6; 8,47 – 24,84 ($p < 0,01$) и *Streptococcus oralis* 9,69; 8,64 – 23,72 ($p < 0,01$) [3, 4].

3. Установлено резкое повышение антибиотикорезистентности для изолятов *S. aureus* в составе биопленки. Наиболее эффективными антибиотиками для планктонных форм *S. aureus* (100% чувствительных изолятов) являются: меропенем МПК₉₀ – 2 мкг/мл, имипенем МПК₉₀ – 2,01 мкг/мл, ванкомицин МПК₉₀ – 2,6 мкг/мл. Минимальная подавляющая концентрация антибиотика для 90% исследованных изолятов *S. aureus*, выделенных из протоковой слюны пациентов с сиаладенитом, в составе биопленки возрастает от 7,56 мкг/мл до 64 мкг/мл для моксифлоксацина; от 17,24 мкг/мл до 171 мкг/мл для тейкопланина; от 12,13 мкг/мл до 147 мкг/мл для цефтриаксона; от 10,5 мкг/мл до 256 мкг/мл для цефепима; от 2 мкг/мл до 50 мкг/мл для меропенема; от 2,01 мкг/мл до 57,5 мкг/мл для имипенема и от 2,6 мкг/мл до 256 мкг/мл для ванкомицина [3, 4].

4. Установлено значимое повышение уровня активности лизоцима в ротовой жидкости при развитии воспалительного процесса в больших слюнных железах 559,71; 387,8 – 884,8 мкг/мл. В период реконвалесценции активность лизоцима в ротовой жидкости нормализуется и составляет 286,83; 204,69 – 334,35 мкг/мл, однако сохраняется статистически значимое отличие от лиц группы сравнения 223,2; 97,93 – 303,42 ($p < 0,05$). Определен дополнительный диагностический критерий сиаладенита: уровень активности лизоцима в ротовой жидкости пациентов выше 340 мкг/мл – инфекционный процесс в больших слюнных железах, с чувствительностью 90% (ДИ 95% 68,3 – 98,8) и специфичностью 76,9% (ДИ 95% 60,7 – 88,9) [2, 6, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 33].

5. Установлено, что у пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез биопленкоцидная способность сывороток крови в отношении матрикса значимо ($p < 0,05$) ниже, чем у лиц без гнойно-воспалительных заболеваний и патологии слюнных желез 8,28; 6,48 – 10,67 мкг/мл и 12,53; 11,16 – 13,39 мкг/мл, соответственно. Показатель биопленкоцидной способности сыворотки крови пациентов с сиаладенитом $< 11,28$ мкг/мл и sIgA $< 0,16$ мг/мл в ротовой жидкости являются факторами риска развития воспалительного процесса в больших слюнных железах [3, 5, 15, 23, 24].

6. Выявлено повышение уровня активности эластазы в ротовой жидкости при развитии воспалительного процесса в больших слюнных железах

4,5; 2,7 – 9,9 фкат при сравнении с лицами контрольной группы 0,9; 0,2 – 1,3 фкат ($p < 0,01$). Уровень активности эластазы в ротовой жидкости выше 1,3 фкат с чувствительностью 94,74% (ДИ 95% 82,2 – 99,2) и специфичностью 78,95% (ДИ 95% 54,4 – 93,8) служит дополнительным диагностическим критерием наличия сиаладенита [1, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 30, 32].

7. Определено, что БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости у пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез была статистически значимо выше, чем в контрольной группе 6,36; 4,87 – 8,8 и 2,5; 2,28 – 3,05 пкат ($p < 0,01$); соответственно. Уровень БАПНА-амидазной активности в ротовой жидкости выше 3,27 пкат с чувствительностью 86,05% (ДИ 95% 72,1 – 94,7) и специфичностью 81,82% (ДИ 95% 48,2 – 97,2) – дополнительный диагностический критерий развития воспаления в слюнных железах [1, 8, 11, 14].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. При обследовании пациентов с сиаладенитом рекомендовано проводить комплексное клинико-лабораторное исследование, а вместо развернутого анализа крови исследовать ротовую жидкость на уровень эластазной активности, учитывая низкую себестоимость – 0,51 рубль/анализ. На основании данных лабораторных исследований проводить уточнение диагноза и оценку динамики воспалительного процесса в слюнных железах. Уровень активности эластазы ротовой жидкости выше 1,3 фкат соответствует группе пациентов с сиаладенитом [32].

2. Снижение биопленкоцидной способности сыворотки крови пациентов с сиаладенитом $< 11,28$ мкг/мл – фактор риска развития сиаладенита.

3. Уровень лизоцима в ротовой жидкости выше 340 мкг/мл – показатель наличия локального воспалительного процесса в слюнной железе [33].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Кабанова, А. А. БАПНА-амидазная и эластазная активность ротовой жидкости пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области / А. А. Кабанова, А. И. Гончарова, С. А. Кабанова // Стоматолог. – 2014. – № 2 (13). – С. 7–10.
2. Гончарова, А. И. Определение лизоцима с использованием пептидогликана из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* / А. И. Гончарова, В. Ю. Земко, В. К. Окулич // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2018. – № 1. – С. 48–55.
3. 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.
4. Окулич, В. К. Микроорганизмы, образующие биопленку в патогенезе сиаладенитов / В. К. Окулич, А. И. Гончарова // Стоматолог. – 2018. – № 4 (31). – С. 29–34.
5. Гончарова, А. И. Иммунологические особенности течения воспалительных заболеваний больших слюнных желез / А. И. Гончарова, В. К. Окулич // Стоматология. Эстетика. Инновации. – 2018. – Т. 2, № 1. – С. 49–54.
6. Антимикробная активность лизоцима как фактора неспецифической резистентности / А. И. Гончарова, В. К. Окулич, В. Ю. Земко, С. А. Сенькович // Вестн. ВГМУ. – 2019. – Т. 18, № 4. – С. 40–45.

Статьи в научных журналах

7. Эластазная активность ротовой жидкости пациентов с гнойно-воспалительными процессами челюстно-лицевой области / А. А. Кабанова, В. К. Окулич, А. И. Гончарова, А. К. Усович, А. Г. Денисенко // Изв. высш. учеб. заведений. Поволж. регион. Мед. науки. – 2014. – № 2 (30). – С. 68–75.

Статьи в сборниках научных трудов и материалах конференций

8. Гончарова, А. И. Эластазная и БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области [Электронный ресурс] / А. И. Гончарова, М. А. Савкина, В. К. Окулич // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Вып. 6 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. – Минск: ГУ РНМБ, 2013. – С. 144–147. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). – Загл. с этикетки диска.
9. Изучение активности эластазы у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области [Электронный ресурс] / М. А. Савкина, А. А. Кабанова, А. И. Гончарова, Ю. В. Прохор // Актуальные

вопросы современной медицины и фармации: материалы 65-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, 24–25 апр. 2013 г. / М-во здравоохранения Республики Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т ; редкол.: С. А. Сушков [и др.]. – Витебск: ВГМУ, 2013. – С. 527–529. – Режим доступа: <https://elib.vsmu.by/handle/123/11007>

10. Савкина, М. А. Активность эластазы ротовой жидкости и лейкоцитарные индексы интоксикации пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области [Электронный ресурс] / М. А. Савкина, А. И. Гончарова, А. А. Кабанова // Студенческая медицинская наука XXI века: материалы XIII междунар. науч.-практ. конф., 14–15 нояб. 2013 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т; [редкол.: С. А. Сушков (председатель) и др.]. – Витебск: ВГМУ, 2013. – С. 320–322. – Режим доступа: <https://elib.vsmu.by/handle/123/11013>

11. БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости у пациентов с воспалительными заболеваниями слюнных желез [Электронный ресурс] / М. А. Савкина, Д. Е. Корнеева, А. И. Гончарова, А. А. Кабанова, Н. Э. Колчанова // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 66-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 17–18 апр. 2014 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т ; [редкол.: С. А. Сушков (председатель) и др.]. – Витебск: ВГМУ, 2014. – С. 289–290. – Режим доступа: <https://elib.vsmu.by/handle/123/10997>

12. Активность эластазы ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями слюнных желез [Электронный ресурс] / А. И. Гончарова [и др.] // Актуальные вопросы современной медицины и фармации : материалы 66-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 17–18 апр. 2014 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т ; [редкол.: С. А. Сушков (председатель) и др.]. – Витебск: ВГМУ, 2014. – С. 290–292. – Режим доступа: <https://elib.vsmu.by/handle/123/10997>

13. Эластаза ротовой жидкости как показатель воспалительного процесса челюстно-лицевой области / А. А. Кабанова, А. И. Гончарова, В. К. Окулич, С. А. Кабанова // Интегративная медицина в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии: сб. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Паринские чтения 2014» (Минск, 10–11 апр. 2014 г.) / под общ. ред. И. О. Походенько-Чудаковой; редкол.: Д. С. Аветиков [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014. – С. 257–258.

14. БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области / А. А. Кабанова А. И. Гончарова, В. К. Окулич, С. А. Кабанова // Интегративная медицина в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии: сб. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Паринские чтения 2014» (Минск, 10–11 апр. 2014

г.) / под общ. ред. И. О. Походенько-Чудаковой ; редкол.: Д. С. Аветиков [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014. – С. 258–260.

15. Корнеева, Д. Е. Содержание иммуноглобулинов G, M и A в ротовой жидкости у пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез [Электронный ресурс] / Д. Е. Корнеева, А. И. Гончарова // Студенческая медицинская наука XXI века: материалы XIV междунар. науч.-практ. конф., 23–24 окт. 2014 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т; [редкол.: С. А. Сушков (председатель) и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2014. – С. 226–227. – Режим доступа: <https://elib.vsmu.by/handle/123/11014>

16. Использование определения эластазной активности в ротовой жидкости пациентов для дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области [Электронный ресурс] / Н. Э. Колчанова, А. И. Гончарова, А. А. Кабанова, А. Корнилов, Д. Е. Корнеева, А. П. Таранко // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 70-й науч. сес. сотр. ун-та, 28–29 янв. 2015 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т ; [ред.: В. П. Дейкало, С. А. Сушков]. – Витебск : ВГМУ, 2015. – С. 59–61. – Режим доступа: <http://elib.vsmu.by/handle/123/2812>

17. Корнеева, Д. Е. Оценка эластазной активности ротовой жидкости пациентов с сиалоаденитами [Электронный ресурс] / Д. Е. Корнеева, А. И. Гончарова, В. К. Окулич // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Вып. 8 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л. П. Титова. – Минск: ГУ РНМБ, 2015. – С. 106–109. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). – Загл. с этикетки диска.

18. Корнеева, Д. Е. Оценка микробного пейзажа протоковой слюны пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез [Электронный ресурс] / Д. Е. Корнеева, А. И. Гончарова // Студенческая медицинская наука XXI века: материалы XV междунар. науч.-практ. конф., 4–5 нояб. 2015 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т; [редкол.: А. Т. Щастный (председатель) и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2015. – С. 408–409. – Режим доступа: <https://elib.vsmu.by/handle/123/11015>

19. Корнеева, Д. Е. Оценка лизоцимной активности сыворотки крови пациентов с сиалоаденитами [Электронный ресурс] / Д. Е. Корнеева, В. Ю. Земко, А. И. Гончарова // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 68-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 20–21 апр. 2016 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т; [редкол.: С. А. Сушков (председатель) и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2016. – С. 429–430. – Режим доступа: <http://elib.vsmu.by/handle/123/10999>

20. Корнеева, Д. Е. Активность лизоцима в ротовой жидкости пациентов с сиалоаденитами [Электронный ресурс] / Д. Е. Корнеева, В. Ю. Земко, А. И. Гончарова // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 68-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 20–21 апр. 2016 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т; [редкол.: С. А. Сушков (председатель) и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2016. – С. 427–429. – Режим доступа: <http://elib.vsmu.by/handle/123/10999>

21. Гончарова, А. И. Лизоцимная активность сыворотки крови пациентов с сиалоаденитами / А. И. Гончарова, В. Ю. Земко, В. К. Окулич // Обеспечение демографической безопасности при решении актуальных вопросов хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии: сб. тр. Нац. конгр. с междунар. участием «Паринские чтения 2016» (Минск, 5–6 мая 2016 г.) / под общ. ред. И. О. Походенько-Чудаковой; редкол.: Д. С. Аветиков [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2016. – С. 239–241.

22. Гончарова, А. И. Оценка лизоцимной активности в биологических жидкостях пациентов с сиалоаденитами / А. И. Гончарова В. Ю. Земко, В. К. Окулич // Научные стремления: сб. материалов VI Междунар. науч.-практ. молодеж. конф. – Минск: Энциклопедикс, 2016. – С. 44–46.

23. Гончарова, А. И. Изменения показателей уровня секреторного иммуноглобулина А в ротовой жидкости пациентов с сиалоаденитами [Электронный ресурс] / А. И. Гончарова, Д. Е. Асветимская, И. С. Загадский // Студенческая медицинская наука XXI века. I Форум молодежных научных обществ: материалы XVI междунар. конф. студентов и молодых ученых и I Форума молодеж. науч. о-в, Витебск, 2–3 нояб. 2016 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т; [редкол.: А. Т. Щастный (председатель) и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2016. – С. 526–527. – Режим доступа: <http://elib.vsmu.by/handle/123/11016>

24. Гончарова, А. И. Оценка содержания интерлейкина 1-бета в сыворотке крови пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез [Электронный ресурс] / А. И. Гончарова, Д. Е. Асветимская // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 69-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 19–20 апр. 2017 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УО «Витебский гос. ордена Дружбы народов мед. ун-т»; [редкол.: А. Т. Щастный и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2017. – С. 566–567. – Режим доступа: <https://elib.vsmu.by/handle/123/19791>

25. Гончарова, А. И. Оценка местного специфического и неспецифического иммунитета ротовой полости пациентов с сиалоаденитами [Электронный ресурс] / А. И. Гончарова, В. К. Окулич // Современные достижения молодых ученых в медицине: сб. ст. IV Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Гродно, 24 нояб. 2017 г. / М-во здравоохранения Респ.

Беларусь, Гродненский гос. мед. ун-т; редкол.: В. А. Снежицкий (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 66–69. – Режим доступа: <http://elib.grsmu.by/handle/files/4787>

Тезисы докладов

26. Гончарова, А. И. Определение неспецифического иммунитета ротовой полости с использованием субстрата из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* / А. И. Гончарова, В. Ю. Земко, В. К. Окулич // Современные достижения хирургической стоматологии: тез. докл. I Всерос. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых (с междунар. участием), посвящ. 15-летию каф. хирург. стоматологии, приуроченной к 260-летию со дня основания Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Ун-т), Москва, 15 окт. 2018 г. / под ред. проф. С. В. Тарасенко. – Москва: Изд-во Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, 2018. – С. 20.

27. Гончарова, А. И. Оценка неспецифического иммунитета ротовой полости пациентов с сиаденитами / А. И. Гончарова, В. Ю. Земко, В. К. Окулич // Стоматологическое образование XXI века: сб. тез. юбилейн. науч.-практ. конф. стоматологов и челюстно-лицевых хирургов, посвящ. 120-летию стоматол. образования в Рос. Федерации. – Санкт-Петербург: Человек, 2019. – С. 20–21.

28. Goncharova, A. I. Evaluation of lysozyme activity in biological fluids of patients with sialadenitis / A. I. Goncharova, V. K. Okulich, V. Y. Ziamko // 19th International Congress of Young Medical Scientists, Poznan, May 30 – June 1 st 2019 year. – Poznan, 2019. – P. 57.

Патенты

29. Устройство для формирования лунок в агаре: пат. 10856 Респ. Беларусь: МПК С 12М 1/00 / Окулич В. К., Погоцкий А. К., Погоцкая А. А., Гончарова А.И.; заявитель и патентообладатель Витебский гос. мед. ун-т. – № и 20150156; заявл. 11.05.15; Афіц. бюл. № 6. – С. 107.

30. Способ дифференциальной диагностики воспалительного заболевания челюстно-лицевой области: пат. 22616 Респ. Беларусь: МПК А 61В 10/00, G 01N 33/48 / Окулич В. К., Кабанова А. А., Колчанова Н. Э., Гончарова А. И.; заявитель и патентообладатель Витебский гос. мед. ун-т. – № а 20170012 ; заявл. 13.01.17; опубл. 30.06.19, Афіц. бюл. № 2. – С. 20–21.

31. Способ определения активности лизоцима в биологической среде: пат. Респ. Беларусь: МКП С 12N 9/36, С 12Q 1/06, G 01N 33/48 / Земко В. Ю., Гончарова А. И., Окулич В. К. ; заявитель и патентообладатель Витебский гос. мед. ун-т. – № а 20160477 ; заявл. 19.12.16; Афіц. бюл. № 6. – С. 96.

Инструкции по применению

32. Метод определения активности эластазы ротовой жидкости для диагностики гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области:

инструкция по применению № 022-0415: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь от 23.12.2015 г. / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, А. А. Кабанова, А. И. Гончарова, Д. Е. Корнеева; разработчик Витебский гос. мед. ун-т. – Витебск, 2015. – 5 с.

33. Метод определения активности лизоцима: инструкция по применению № 065-0618: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь от 14.12.2018 г. / В. К. Окулич, В. Ю. Земко, А. И. Гончарова, А. М. Дзядзько; разработчик Витебский гос. мед. ун-т. – Витебск, 2018. – 6 с.

РЭЗІЮМЭ

Ганчарова Ганна Ігараўна

Мікраарганізмы, якія ўтвараюць біяпленкі, у развіцці запаленчых захворванняў вялікіх слінных залоз

Ключавыя словы: сіаладэнит, ротавае вадкасць, эластаза, біяпленкаўтварэнне, лізацым.

Мэта працы: ацаніць ролю біяпленкаўтвораных мікраарганізмаў у развіцці запаленчых захворванняў вялікіх слінных залоз з улікам неспецыфічнай рэзістэнтнасці макраарганізма.

Метады даследавання: бактэрыялагічныя, імуналагічныя, клінічныя, лабараторныя, інструментальныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: выяўлена этыялагічная структура сіаладэнита бактэрыялагічным метадам з мультыплекснай палімеразнай ланцуговай рэакцыяй ў рэжыме рэальнага часу. Вывучана здольнасць у 85% мікраарганізмаў, выдзеленых з пратокавай сліны пацыентаў з запаленчымі захворваннямі вялікіх слінных залоз, фарміраваць біяпленкі, вызначана адчувальнасць выдзеленых бактэрыяў да антыбіётыкаў у складзе біяпленкі. Ацэнена здольнасць сывороткі крыві пацыентаў з сіаладэнітам разбураць матрыкс біяпленкі. Устаноўлена, што зніжэнне біяпленкацыднай здольнасці сывороткі крыві пацыентаў з запаленчымі працэсамі вялікіх слінных залоз $\leq 11,28$ мкг/мл з'яўляецца прадмеркаваным фактарам рызыкі развіцця дадзенай паталогіі.

Распрацаваны і запатэнтаваны спосаб вызначэння лізацыма ў біялагічных вадкасцях з выкарыстаннем субстрата пептыдаглікана культуры *Micrococcus lysodeikticus*, які не патрабуе наяўнасці жывой культуры мікраарганізма, спосаб валодае адчувальнасцю 60 мкг/мл. Удакладнена роля лізацыму як фактара неспецыфічнай рэзістэнтнасці ў развіцці запаленчых захворванняў вялікіх слінных залоз. У якасці дадатковых крытэрыяў для дыягностыкі сіаладэнита прапанавана выкарыстоўваць павышэнне ўзроўню лізацыму >340 мкг/мл і эластазнай актыўнасці ротавай вадкасці $>1,3$ фкат.

Рэкамендацыі па выкарыстанню: атрыманыя вынікі могуць быць выкарыстаны ў мікрабіялагічных лабараторыях і лекарамі-стаматолагамі-хірургамі для дыягностыкі пацыентаў з сіаладэнітам.

Вобласць ужывання: клінічная мікрабіялогія, стаматалогія.

РЕЗЮМЕ

Гончарова Анна Игоревна

Микроорганизмы, образующие биопленку, в развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез

Ключевые слова: сиаладенит, ротовая жидкость, эластаза, биопленкообразование, лизоцим.

Цель работы: оценить роль биопленкообразующих микроорганизмов в развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез с учетом неспецифической резистентности макроорганизма.

Методы исследования: бактериологические, иммунологические, клинические, лабораторные, инструментальные, статистические.

Полученные результаты и их новизна: установлена этиологическая структура сиаладенита бактериологическим методом с мультиплексной полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени. Изучена способность у 85% микроорганизмов, выделенных из протоковой слюны пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез, формировать биопленку, определена чувствительность выделенных бактерий к антибиотикам в составе биопленки. Оценена способность сыворотки крови пациентов с сиаладенитом разрушать матрикс биопленки. Установлено, что снижение биопленкоцидной способности сыворотки крови пациентов с воспалительными процессами больших слюнных желез $< 11,28$ мкг/мл является предрасполагающим фактором риска развития данной патологии.

Разработан и запатентован способ определения лизоцима в биологических жидкостях с использованием субстрата пептидогликана культуры *Micrococcus lysodeikticus*, не требующий наличия живой культуры микроорганизма, способ обладает чувствительностью 60 мкг/мл. Уточнена роль лизоцима как фактора неспецифической резистентности в развитии воспалительных заболеваний больших слюнных желез. В качестве дополнительных критериев для диагностики сиаладенита предложено использовать повышение уровня лизоцима >340 мкг/мл и эластазной активности ротовой жидкости $>1,3$ фкат.

Рекомендации по использованию: полученные данные могут быть использованы в микробиологических лабораториях и врачами-стоматологами-хирургами для диагностики пациентов с сиаладенитом.

Область применения: клиническая микробиология, стоматология.

ABSTRACT

Hancharova Hanna

Microorganisms that form a biofilm, in the development of large salivary glands inflammatory diseases

Keywords: sialadenitis, oral fluid, elastase, biofilm formation, lysozyme.

Aim of the study: to estimate the role of microorganisms isolated from the channel saliva, which have the ability to form biofilm, in the development of inflammatory diseases of large salivary glands, taking into account non-specific resistance of the macroorganism.

Research methods: bacteriological, immunological, clinical, laboratory, instrumental, statistical.

Results and their novelty: The etiological structure of sialadenitis by the bacteriological method with a multiplex polymerase chain reaction in real time has been established. Studied the ability of 85% patients with inflammatory diseases of the large salivary glands of microorganisms to form a biofilm, and the sensitivity of the bacteria to antibiotics in the biofilm was determined. The ability of the serum of patients with sialadenitis to destroy the biofilm matrix was evaluated. It has been established that a decrease in the biofilmocidal ability of the blood serum of patients with inflammatory processes of the large salivary glands $< 11.28 \mu\text{g} / \text{ml}$ is a predisposing risk factor for the development of this pathology.

A method has been developed and patented for determining lysozyme in biological fluids using a peptidoglycan substrate of *Micrococcus lysodeikticus* culture, which does not require a live microorganism culture, the method has a sensitivity of $60 \mu\text{g} / \text{ml}$. The role of lysozyme as a factor of nonspecific resistance in the development of inflammatory diseases of the large salivary glands is clarified. As additional criteria for the diagnosis of sialadenitis, it is proposed to use an increase in the level of lysozyme $> 340 \mu\text{g} / \text{ml}$ and elastase activity of the oral fluid $> 1, 3$ pentocalls.

Recommendations: the obtained data can be used for diagnosis in microbiological laboratories and dental surgeons for the treatment of patients with sialadenitis.

Field of application: clinical microbiology, dentistry.

Подписано в печать «___» февраля 2020 г. Формат 60×84/16.
Бумага типографская №2. Гарнитура Times Усл. печ. листов ____
Тираж 60 экз. Заказ № ____
Издательство УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет».
ЛП №02330/453 от 30.12.2013 г.
Отпечатано на ризографе УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»,
210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27