

УДК 616:57.083.3

DOI: 10.14427/jipai.2018.1.34

Определение лизоцима с использованием пептидогликана из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus*

А.И. Гончарова, В.Ю. Земко, В.К. Окулич

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Lysozyme activity determination using peptidoglycan from the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*

A.I. Goncharova, V.Y. Ziamko, V.K. Okulich

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Разработан способ определения активности лизоцима в биологических жидкостях и оценена возможность применения данного метода для диагностики тяжелых бактериальных пневмоний, хронической обструктивной болезни легких и сиаладенитов. Метод основан на предварительном получении пептидогликана из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, меченого Конго красным, который используется в качестве субстрата для лизоцима.

Результаты. Установлено, что необходимо проводить инактивацию комплемента в биологических жидкостях его содержащих, для того чтобы исключить влияние этого фактора на определение активности лизоцима. Изучена активность лизоцима в сыворотке крови и мокроте у 43 пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией и у 13 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, а также в ротовой жидкости и сыворотке крови у 60 пациентов с сиаладенитом. Установлено достоверное снижение активности лизоцима в сыворотке крови пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией, выявлен достоверный более высокий уровень активности лизоцима в мокроте у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в сравнении с пациентами с тяжелой бактериальной пневмонией и повышение уровня активности лизоцима в ротовой жидкости при развитии воспалительного процесса в больших слюнных железах. Предложены диагностические критерии тяжелой бактериальной пневмонии, хронической обструктивной болезни легких и сиаладенита.

Ключевые слова

Пептидогликан, лизоцим, сыворотка крови, ротовая жидкость, мокрота, комплемент, тяжелая бактериальная пневмония, хроническая обструктивная болезнь легких, сиаладенит.

Summary

We created the method of evaluating lysozyme activity in biological fluids and estimated possibility of application such method for diagnosis heavy bacterial pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease and sialoadenitis. Method is based on preliminary preparation of peptidoglycan from the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, marked Congo red, which is used as a substrate for lysozyme.

Results. Taken place established necessity of inactivation complement in biological fluids containing it in order to exclude the influence of this factor in determining activity of lysozyme. Activity of lysozyme in blood serum and sputum among 43 patients and 13 patients with chronic obstructive pulmonary disease was studied, as well as 60 patients with sialoadenitis in oral liquid and blood serum. A significant decrease in lysozyme activity in the blood serum of patients with severe bacterial pneumonia was established, a significant higher activity level lysozyme in sputum among patients with chronic obstructive pulmonary disease compared patients with heavy bacterial pneumonia and increase in the level of lysozyme activity in oral liquid during the development of the inflammatory process in the large salivary glands. Diagnostic criteria for severe bacterial pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease and sialadenitis proposed.

Keywords

Peptidoglycan, lysozyme, blood serum, oral fluid, sputum, complement, heavy bacterial pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease, sialoadenitis.

Введение

В современных концепциях патогенеза воспалительных заболеваний значительное внимание уделяется неспецифическим гуморальным факторам системы иммунитета, к которым относятся, в том числе и лизоцим [1].

Лизоцим (мурамидаза) — антибактериальный агент, фермент класса гидролаз, разрушающий клеточные стенки бактерий путём гидролиза пептидогликана клеточной стенки бактерий, обеспечивает защиту макроорганизма от экзогенной и эндогенной микрофлоры. Главным образом, лизоцим получают из белка куриных яиц. Также аналогичные ферменты содержатся в организме животных, в первую очередь, в местах соприкосновения с окружающей средой — в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, слёзной жидкости, слюне, слизи носоглотки, грудном молоке, а также лейкоцитах [1].

Фермент гидролизует (1,4β)-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином, которые входят в состав пептидогликана. Особенно много пептидогликана содержится в клеточных стенках грамположительных бактерий (до 80 %), в то время как в клеточных стенках грамотрицательных бактерий содержится около 10%, поэтому лизоцим преимущественно действует на грамположительные бактерии [2, 3].

Определение содержания лизоцима в сыворотке, слюне и других биологических жидкостях при различных заболеваниях дает возможности для разработки новых методов диагностики и лечения. При лизисе грамотрицательных бактерий лизоцим действует совместно с системой комплемента. Система комплемента представляет собой комплекс сложных белков, постоянно присутствующих в крови. Это каскадная система протеолитических ферментов, предназначенная для гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов. Пептидогликан способен активировать комплемент по альтернативному пути. Альтернативный путь отличается тем, что срабатывает сразу же после появления антигенов без формирования специфического иммунного ответа, а его активаторами могут быть бактериальные полисахариды и липополисахариды, вирусные частицы, опухолевые клетки [4,5]. В клинической лабораторной практике определение уровня лизоцима в биологических жидкостях может быть полезно в качестве мониторинга течения инфекционных и воспалительных заболеваний. Лизоцим присутствует во всех жидкостях организма и является важным фактором

бактерицидности. Его содержание в сыворотке повышается при острых и хронических миело- и моноцитарных лейкозах, нейтрофильном лейкоцитозе, туберкулезе, саркоидозе, острой бактериальной инфекции и уменьшается при хронических бактериальных инфекциях, сепсисе, перитоните, а также при гипоплазии костного мозга. При хронических заболеваниях происходит увеличение синтеза лизоцима моноцитами крови и тканевыми макрофагами [6]. Расщепляя пептидогликан бактериальной стенки, лизоцим защищает слизистую оболочку полости рта от патогенных бактерий. Основным источником лизоцима в ротовой жидкости являются околоушные и поднижнечелюстные слюнные железы. Определение активности лизоцима в слюне позволяет оценить функциональное состояние слюнных желез и протективные свойства слюны при патологических процессах в ротовой полости [7]. Содержание фермента в секрете подчелюстных желез выше, чем в околоушных [8]. В ротовой жидкости лизоцима содержится больше, чем в большинстве других жидкостях человека. В литературе представлены данные определения лизоцима как активности фермента, так и определение его количества в биологических жидкостях, однако значения у разных авторов варьируют в широких пределах от 200 мкг/мл до 159000 мкг/мл [9, 10].

Существует ряд способов определения активности лизоцима. Нефелометрический способ определения активности лизоцима основан на определении просветления тест-культуры, для каждой постановки необходима суточная культура бактерий [11].

Существует автоматизированный микроспособ определения лизоцимной активности, основанный на изменении светопропускания *M. lysodeikticus*, данный способ является трудоемким из-за необходимости многократного количества измерений и могут возникнуть погрешности при внесении небольших объемов испытуемых образцов при постановке способа [11].

Также известен турбидиметрический способ определения активности лизоцима, основанный на способности лизоцима лизировать лиофилизированные тест-бактерии в одном и том же временном интервале [11]. Самый чувствительный метод для определения количества лизоцима иммуноферментный анализ, в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антиген [12].

Цель исследования: разработать способ определения активности лизоцима в биологических

жидкостях и оценить возможность применения данного метода для диагностики тяжелых бактериальных пневмоний, хронической обструктивной болезни легких и сиаладенитов.

Материалы и методы

Разработка метода. На первом этапе получили пептидогликан из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* как наиболее чувствительной к лизоциму по методике, предложенной Львовом В.Л., Пинегиным Б.В., Хаитовым Р.М. в нашей модификации [13]. 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. В таблице 1 представлены результаты обработки полученной суспензии:

Таблица 1. Действие ферментов на пептидогликан, полученный после обработки ультразвуком с последующей однократной отмывкой 0,9% раствором NaCl, меченный Конго красным

Ферменты (концентрация 1 мг/мл)	$M \pm m, E_{оп}$	Достоверность значений
Гиалуронидаза	0,042±0,01	$P_{1-4} < 0,05$ $P_{1-7} < 0,05$ $P_{1-8} < 0,05$ $P_{1-9} < 0,05$
Папаин	0,03±0,01	$P_{2-5} < 0,05$ $P_{2-8} < 0,05$ $P_{2-9} < 0,05$
Трипсин	0,05±0,007	$P_{3-5} < 0,05$ $P_{3-6} < 0,05$ $P_{3-7} < 0,05$ $P_{3-8} < 0,05$ $P_{3-9} < 0,05$
РНК-аза	0,03±0,008	$P_{4-5} < 0,05$ $P_{4-9} < 0,05$
Пероксидаза	0,09±0,007	–
Альфа-амилаза	0,07±0,01	$P_{6-2} < 0,05$ $P_{6-4} < 0,05$ $P_{6-9} < 0,05$
ДНК-аза	0,145±0,009	$P_{7-2} < 0,05$ $P_{7-4} < 0,05$ $P_{7-5} < 0,05$ $P_{7-6} < 0,05$ $P_{7-8} < 0,05$
Пепсин	0,093±0,008	$P_{8-4} < 0,05$ $P_{8-9} < 0,05$
Лизоцим	0,197±0,01	$P_{9-1} < 0,05$ $P_{9-2} < 0,05$ $P_{9-3} < 0,05$ $P_{9-4} < 0,05$ $P_{9-5} < 0,05$ $P_{9-6} < 0,05$ $P_{9-8} < 0,05$

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

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 результате 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, после чего проводить инкубацию в течение 10 минут при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$, центрифугировать 2 раза в течение 1 часа при 1,0 тыс. об/мин для удаления не связавшегося красителя. В результате получали очищенный субстрат пептидогликана, меченый Конго красным.

Оценку качества полученного субстрата проводили посредством конфокальной микроскопии. Для этого готовили препарат висючая 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°C до использования.

Для постановки метода выбраны эппендорфы, т.к. в них удобно проводить реакцию, и для их центрифугирования имеются специальные центрифуги. 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, мокрота, ротовая жидкость). Для сыворотки проводили дополнительную постановку второй ряд эппендорфов – 300 мкл ФБР, 100 мкл субстрата и 100 мкл сыворотки для проверки влияния компонента на суммарный уровень активности лизоцима (инактивация сыворотки посредством нагревания при температуре 56°C в течение 60 мин). 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. Подобрано оптимальное соотношение субстрата и изучаемого биологического объекта, содержащего фермент лизоцим и режим центрифугирования. Затем пробы извлекали из термо-

стата и центрифугировали в течение 7 мин (10 тыс. об/мин; MICRO 120) для сывороток и мокроты 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.

После построения калибровочного графика была получена формула для расчета активности лизоцима:

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

где: X – активность лизоцима, в мкг/мл;

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

$E_{\text{опк}}$ – оптическая плотность контроля.

Лабораторные испытания разработанного нами метода продемонстрировали, что коэффициент вариации (CV, %) и общая воспроизводимость составили 6,7% и 7,4 %, соответственно. Чувствительность данного метода по генно-инженерному лизоциму составила 60 мкг/мл, что достаточно для определения активности лизоцима в биологических жидкостях.

Для сравнения разработанного метода определения активности лизоцима с использованием пептидогликана из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* со стандартным была применена стандартная методика для определения активности антимикробных препаратов, основанная на диффузии в агар, в нашей модификации [14], с использованием разработанного и запатентованного штампа-репликатора [15] и культуры *Micrococcus lysodeikticus*.

При сравнении показателей активности лизоцима в сыворотке крови 25 лиц группы сравнения, полученных разработанным нами методом и методом диффузии в агар, установлено, что расхождение показателей (размахов), выраженное в процентах составило от 3% до 20% ($13 \pm 7\%$); статистически достоверных отличий с использованием парного критерия Вилкоксона выявлено не было ($p = 0,17$).

На разработанный нами метод получено уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение «Способ определения активности лизоцима в биологической среде» от 19.12.2016 №а20160477.

С целью иллюстрации возможности использования предложенного метода определения активности лизоцима в сыворотке крови и мокроте была взята группа пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией и хронической obstructивной болезнью легких (ХОБЛ), в ротовой жидкости – группа пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез.

Для определения активности лизоцима в сыворотке крови в исследование включены 43 пациента с тяжелой бактериальной пневмонией, которая классифицируется по МКБ-10 как пневмония, не классифицируемая в других рубриках (J 15) из отделения реанимации и интенсивной терапии и 60 пациентов с сиаладенитами отделения челюстно-лицевой хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница».

Критерием отбора пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией были: продленная искусственная вентиляция легких в течение 5 и более суток, а также наличие рентгенологически подтвержденной нижнедолевой или полисегментарной пневмонии. Средний возраст пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией составил $54,8 \pm 17,8$ лет, в демографической структуре преобладали мужчины, составившие – 72,1%, женщины – 27,9%. Длительность госпитализации составила от 10 до 59 дней, в среднем 44,5 дня. Причины проведения искусственной вентиляции легких: гнойно-воспалительные заболевания абдоминальной области и малого таза, патология органов брюшной полости (ЖКБ, острый панкреатит), черепно-мозговые и сочетанные травмы, ОНМК, гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области, гнойно-воспалительные заболевания торакальной области, гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей, сепсис.

У пациентов тяжелая бактериальная пневмония развивалась в среднем на $6,0 \pm 5,25$ сутки. Ранние пневмонии, возникшие в течение первых 5 суток после интубации трахеи составили 52,7% тяжелых бактериальных пневмоний. В группу сравнения включены 43 практически здоровых человека, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами исследуемых групп.

Кровь забирали натощак с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугировали со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 10 минут; сыворотка отбирали, замораживали и хранили при -25°C .

Перед проведением лечебных мероприятий проводили забор ротовой жидкости за час до еды в стерильные пробирки. У пациентов с сиаладе-

нитами 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.

Для исследования активности лизоцима в мокроте использовали 18 образцов мокроты пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией и 13 образцов мокроты пациентов с ХОБЛ. Забор мокроты производили с 8 до 9 часов методом эндотрахеальной аспирации. Пробы замораживали и хранили при -25°C .

Для исследования активности лизоцима в ротовой жидкости обследовали 60 пациентов с сиаладенитами. Пациенты находились на стационарном лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница». Группу сравнения составили 20 человек без гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области и патологии слюнных желез. Средний возраст пациентов с воспалительными заболеваниями больших слюнных желез составил $47,25 \pm 14,78$ лет, в демографической структуре преобладали мужчины, составившие 55%. Длительность госпитализации составила от 3 до 13 дней, в среднем – $6,46 \pm 2,46$ дня.

В работе были использованы следующие реактивы: гиалуронидаза (почечная человека) 254 акт., производство РеаХим; папаин (Carica papaya) 12 000 Units/g, производство Ferak Berlin; трипсин поджел. железы КРС 8,2 Units/mg, производство Boehringer Mannheim GmbH Germany; РНК-аза (поджел. железы КРС) 25000 акт., производство РеаХим; пероксидаза хрена, 250 Units/mg, производство Serva; альфа-амилаза поджел. железы КРС; ДНК-аза II – типа (человека), 4250 акт., производство Sigma; пепсин человека, производство СПОФА, Чехия; лизоцим человека рекомбинантный экспрессированный в клетках риса $\geq 100\ 000$ Unit/mg, производство Sigma; Fluorescein 5(6)-isothiocyanate (FITC), производство Sigma; Конго красный, производство ROTH; штамм *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программ Microsoft Excel 2007, MedCalc v7.6.0.0., 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 (p 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). Корреляционный анализ проводился непараметрическим методом Спирмена. Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты активности лизоцима в сыворотке крови пациентов представлены в таблице 2.

В результате исследования было установлено, что суммарный уровень активности лизоцима и комплемента у пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией оказался достоверно ниже (246,7; 141,2 – 298,7 мкг/мл), чем в группе сравнения (445,5; 350,1 – 816,1 мкг/мл). Вероятно, это связано с истощением защитных механизмов макроорганизма на фоне тяжелого воспалительного процесса, присоединения сопутствующей патологии, с поражением, чаще всего органов дыхания. У пациентов с сиаладенитами суммарный уровень активности лизоцима статистически достоверно не отличался от уровня активности лизоцима в сыворотке контрольной группы (461,37; 26,7 – 903,86 и

445,5; 350,1 – 816,1 мкг/мл соответственно). После инактивации комплемента как у пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией (116,0; 56,5-160,1 мкг/мл) и сиаладенитами (262,77; 242,82 – 515,2), так и в группе сравнения (246,0; 183,6 – 305,7 мкг/мл) происходит статистически значимое снижение лизоцимной активности сыворотки крови. Это указывает на то, что часть лизоцимной активности сыворотки (примерно 46%) обусловлена активацией комплемента по альтернативному пути. В то же время, большая часть активности принадлежит лизоциму, так как разница между группой сравнения и пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией после инактивации комплемента сохраняется ($p < 0,05$). Таким образом, для более точного определения активности лизоцима в биологических жидкостях, которые содержат комплемент, необходимо проводить инактивацию комплемента.

Определены диагностический критерий (Д) и диагностическая эффективность (ДЭ) данного метода. ROC-анализ полученных результатов представлен в таблице 3.

Применение ROC-анализа в ходе исследования позволило отнести обследованных нами пациентов с уровнем активности лизоцима в

Таблица 2. Уровень активности лизоцима в сыворотке крови до и после инактивации комплемента

N	Группа пациентов	N	Активность нативной сыворотки крови, мкг/мл. Me; LQ - UQ	Активность инактивированной сыворотки крови, мкг/мл. Me; LQ - UQ	Снижение активности сыворотки после инактивации комплемента, %
1	Группа сравнения	43	445,5; 350,1 – 816,1	246,0; 183,6 – 305,7	44,74
2	Пациенты с тяжелой бактериальной пневмонией	46	246,7; 141,2 – 298,7	116,0; 56,5 – 160,1	47,15
3	Пациенты с сиаладенитами	40	461,37; 26,7 – 903,86	262,77; 242,82 – 515,2	47,3

Примечание: различия между группами пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией и группой сравнения до и после инактивации комплемента достоверны ($p < 0,05$), между группой сравнения и пациентами с сиаладенитами статистически достоверных отличий не выявлено ($p > 0,05$).

Таблица 3. ROC-анализ данных, полученных при исследовании уровня активности лизоцима в биологических жидкостях пациентов

Группы сравнения	Д, мкг/мл	ДС, %	ДЧ, %	ДЭ, %
Тяжелая бактериальная пневмония/группа сравнения (сыворотка крови)	$\leq 175,26$	70,9	93,3	81,7 - 98,6
Тяжелая бактериальная пневмония/хроническая обструктивная болезнь легких (мокрота)	$\leq 106,37$	83,3	73,7	48,8 - 97,9
Сиаладенит проба 1/контрольная (ротовая жидкость)	$> 340,53$	76,9	90,0	68,3 - 98,8

сыворотке крови $\leq 175,26$ мкг/мл к группе пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией и использовать уровень активности лизоцима в сыворотке крови данной группы пациентов в качестве дополнительного диагностического критерия тяжелой бактериальной пневмонии.

Данные об активности лизоцима в мокроте пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией и пациентов с ХОБЛ представлены в таблице 4.

ROC-анализ полученных результатов представлен в таблице 3.

Анализ результатов с применением ROC-анализа позволило отнести обследованных нами пациентов с уровнем активности лизоцима в мокроте $\leq 106,37$ мкг/мл к группе пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией и использовать уровень активности лизоцима в мокроте данной группы пациентов в качестве дополнительного диагностического критерия тяжелой бактериальной пневмонии.

В результате исследования выявлен достоверный более высокий уровень активности лизоцима в мокроте у пациентов с ХОБЛ (286,32; 141,28 – 556,69 мкг/мл) в сравнении с пациентами с тяжелой бактериальной пневмонией (71,13; 38,62 – 115,17 мкг/мл; $p < 0,05$).

Результаты исследования активности лизоцима в ротовой жидкости представлены в таблице 5.

В результате исследования было установлено, что у пациентов с сиаладенитами (559,71; 387,8 – 884,8 мкг/мл) показатель активности лизоцима в ротовой жидкости достоверно выше, чем в группе сравнения (223,198; 97,93 – 303,42 мкг/мл). В период реконвалесценции уровень активности

лизоцима в ротовой жидкости нормализуется (286,83; 204,69 – 334,35 мкг/мл).

ROC-анализ полученных результатов представлен в таблице 3.

Анализ результатов с применением ROC-анализа позволил отнести обследованных нами пациентов с уровнем активности лизоцима в ротовой жидкости выше 340 мкг/мл к группе пациентов с диагнозом сиаладенит и использовать определение активности данного фермента в ротовой жидкости пациентов в качестве дополнительного диагностического критерия воспалительных заболеваний больших слюнных желез.

Выводы

1. Разработан способ определения активности лизоцима в биологических средах с использованием субстрата пептидогликана из культуры *Micrococcus lysodeikticus*, меченого Конго красным, диагностическая чувствительность которого составляет 60 мкг/мл, коэффициент вариации и общая воспроизводимость составили 6,7% и 7,4 %, соответственно; при сравнении со стандартным методом диффузии в агар статистически значимых отличий выявлено не было, $p > 0,05$.
2. Установлено, что необходимо проводить инактивацию комплемента в биологических жидкостях его содержащих, например сыворотке крови, для того, чтобы исключить влияние данного фактора на определение активности лизоцима.
3. При гнойно-воспалительных заболеваниях – тяжелой бактериальной пневмония, наблюдается статистически значимое снижение актив-

Таблица 4. Уровень активности лизоцима в мокроте пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией

N	Группы пациентов	N	Уровень активности лизоцима, мкг/мл Me, LQ – UQ
1	ХОБЛ	13	286,32; 141,28 – 556,69
2	Тяжелая бактериальная пневмония	18	71,13; 38,62 – 115,17

Примечание: различия между группами достоверны ($p < 0,05$)

Таблица 5. Уровень активности лизоцима в ротовой жидкости пациентов с сиаладенитом

N	Группы пациентов	N	Уровень активности лизоцима, мкг/мл Me; LQ – UQ
1	Группа сравнения	20	223,198; 97,93 – 303,42
2	Сиаладенит (проба 1)	60	559,71; 387,8 – 884,8
3	Сиаладенит (проба 2)	60	286,83; 204,69 – 334,35

Примечание: различия между группами достоверны ($p_{1,2} < 0,01$; $p_{2,3} < 0,01$; $p_{1,3} < 0,05$)

ности лизоцима в сыворотке крови пациентов (116,0; 56,5 – 160,1 мкг/мл) в отличие от такого показателя у группы сравнения (246,0; 183,6 – 305,7 мкг/мл). Уровень активности лизоцима в сыворотке крови у пациентов (ниже 175,26 мкг/мл) может служить дополнительным диагностическим критерием тяжелой бактериальной пневмонии.

4. Выявлено достоверное повышение уровня активности лизоцима в мокроте у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в сравнении с группой с тяжелой бактериальной пневмонией (286,32; 141,28 – 556,69 мкг/мл и 71,13; 38,62 – 115,17 мкг/мл; $p < 0,05$, соответственно). Уровень активности лизоцима в мокроте у пациентов (ниже 106,37 мкг/мл) можно использовать в качестве дополнитель-

ного диагностического критерия тяжелой бактериальной пневмонии.

5. Установлено достоверное 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 (286,83; 204,69 – 334,35 мкг/мл). При развитии гнойно-воспалительных процессов слюнных желез в период обострения заболевания наблюдается более высокий уровень активности лизоцима. Предложено использовать определение уровня активности лизоцима в ротовой жидкости пациентов (выше 340 мкг/мл) в качестве дополнительного диагностического критерия обострения хронического сиаденита.

Литература

1. Баскова И.П., Кострюкова Е.С., Власова М.А. Биохимия. 2008; Том 73, выпуск 3: 388-394.
2. Wiesner J., Vilcinskas A. Antimicrobial peptides. The ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010; 1: 440-464.
3. Brodgen K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3: 238-250.
4. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Издательский центр "Академия", 2005: 238-239.
5. Janeway C.A. Immunobiology. Garland Publishing, 2001:732с.
6. Ковалев Н.А., Красочко П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека. Минск: Беларус.навука, 2012: 216 с.
7. Назаренко Г. И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных. — Медицина, 2005: 543с.
8. Veerman E.C., van den Keybus P.A., Vissink A., Nieuw Amerongen A.V. Human glandular salivas: Their separate collection and analysis. *Eur. J. Oral Sci.* 1996; 104:346-352.
9. Ричард Дж. Микробиология и иммунология для стоматологов. - Тверь, 2010: 250-251.
10. Зеленова Е.Г., Салина Е.В., Заславская М.И., Рассанов С.П. Микрофлора полости рта: норма и патология. - Нижний Новгород, 2004:158с.
11. Марьянская И.В. Автоматизированный микрометод определения лизоцимной активности. Клиническая лабораторная диагностика. 1995; 4: 31-33.
12. Ищенко У.В., Юпатова Т.Г. Влияние водного экстракта табака сигарет на уровень лизоцима и лактоферрина в ротовой жидкости. Иммунопатол., алергол., инфектол. 2017; 3: 37-43.
13. Хаитов Р.М., Львов В.Л., Пинегин Б.В. Способ производства фармакологически приемлемой смеси веществ, содержащей низкомолекулярные компоненты пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий и обладающей иммуностимулирующей активностью. Патент №2478644 от 10.04.2013.
14. Захаренко А.Г., Данющенко Н.М., Окулич В.К. Определение концентраций макролидов и доксициклина в крови и сперме больных с урогенитальным хламидиозом и их влияние на ДНК сперматозоидов. Иммунопатол., алергол., инфектол. 2007; 1: 42-47.
15. Окулич В.К., Погоцкий А.К., Погоцкая А.А, Гончарова А.И. Устройство для формирования лунок в агаре С12 (51) МПК С 12М 1/00 (2006.01) (11) 10856 U (21) и 20150156 (22) УО «Витебский государственный медицинский университет» (BY) 71 Заявл. 11.05.2015г. – № 10856. Афіцыйны бюлетэнь. Вынаходства, карысныя мадэлі, прамысловыя ўзоры. – 2015, 6:107.

Сведения об авторах:

Гончарова А.И., – аспирант кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
 Земко В.Ю., аспирант кафедры анестезиологии и реаниматологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
 Окулич В.К. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».
 Официальное название учреждения: УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь
 Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра клинической микробиологии.
 e-mail: torinet@tut.by – Земко Виктория Юрьевна
 Работа выполнена в рамках темы НИР «Иммунные механизмы развития воспалительных заболеваний больших слюнных желез» договор с БРФФИ № М17М-139 от 18.04.2017

Поступила 27.02.2018 г.