

А. А. Кабанова, В. К. Окулич,
А. И. Гончарова, А. К. Усович, А. Г. Денисенко

ЭЛАСТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРОЦЕССАМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ¹

Аннотация.

Актуальность и цели: изучение активности эластазы ротовой жидкости пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области.

Материалы и методы. Обследовано 45 пациентов с одонтогенными и не-одонтогенными гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области, а также 22 донора. С помощью модифицированного метода Гюн-Хван и Ким Хен изучалась активность фермента эластазы ротовой жидкости.

Результаты. Установлено, что активность эластазы ротовой жидкости повышается при развитии воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области одонтогенного и неодонтогенного характера, а при купировании острых воспалительных процессов активность данного фермента снижается до показателей здоровых лиц. Активность эластазы ротовой жидкости у пациентов с распространенными одонтогенными гнойно-воспалительными процессами выше, чем при развитии воспаления в пределах одного клетчаточного пространства.

Выводы. Дальнейшее изучение активности эластазы ротовой жидкости при развитии гнойно-воспалительных процессов челюстно-лицевой области позволит разработать неинвазивные диагностические тесты для повышения качества оказания медицинской помощи данной категории пациентов.

Ключевые слова: эластаза, ротовая жидкость, гнойно-воспалительные заболевания, челюстно-лицевая область.

А. А. Kabanova, V. K. Okulich,
A. I. Goncharova, A. K. Usovich, A. G. Denisenko

ELASTASE ACTIVITY OF THE ORAL FLUID OF PATIENTS WITH PYOINFLAMMATORY PROCESSES IN MAXILLOFACIAL AREA

Abstract.

Background. The article aims at studying elastase activity of the oral fluid of patients with pyoinflammatory diseases of maxillofacial area. *Materials and methods.* Complex examination of 45 patients with pyoinflammatory processes of the maxillofacial area and 22 healthy people was carried out. Using the modified method of Kyung-Hwan and Kim Hyong the activity of the enzyme elastase of oral fluid was studied.

¹ Работа выполнена в рамках темы НИР стоматологического факультета Витебского государственного медицинского университета «Разработка методов профилактики, диагностики и лечения отдельных стоматологических заболеваний», № 20130236 от 25.03.2013; а также НИР «Изучение патогенеза развития воспалительных заболеваний больших слюнных желез», договор с БРФФИ № M13M-089 от 16.04.2013, № 20131759 от 08.08.2013.

Results. The authors determined that the activity of the oral fluid elastase increases with development of odontogenic and nonodontogenic inflammatory diseases of maxillofacial area, and the relief of the acute inflammatory processes causes normalization of enzyme activity. Patients with extensive inflammatory processes have a higher elastase activity than patients with local processes.

Summary. Further study of the oral fluid elastase activity of the patients with inflammatory processes of the maxillofacial area will lead to development of noninvasive diagnostic tests.

Key words: elastase, oral fluid, pyoinflammatory processes, maxillofacial area

Введение

Гнойно-воспалительные заболевания составляют основную группу наиболее часто встречающихся заболеваний челюстно-лицевой области. Актуальность проблемы профилактики, диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний остается высокой [1]. Лечение пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области на современном этапе представляет собой сложную и далеко не решенную проблему как в Республике Беларусь, так и во всем мире. Это объясняется ростом числа возникновения воспалительных процессов, увеличением количества случаев тяжелого течения инфекции с распространением процесса на несколько анатомических областей и развитием таких грозных осложнений, как сепсис, медиастинит, септический шок, асфиксия [2, 3]. Все чаще отмечается атипичное клиническое течение данных заболеваний [4]. Существует необходимость дальнейшего изучения этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области.

Ферменты присутствуют во всех живых клетках. Они выступают в роли катализаторов практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах. К 2013 г. было описано более 5000 различных ферментов. Они играют важнейшую роль во всех процессах жизнедеятельности, направляя и регулируя обмен веществ организма.

В последние десятилетия множество научных разработок посвящается изучению такого фермента, как эластаза. Тематика данных работ достаточно разнообразна, так как указанный фермент имеет несколько типов, которые участвуют в различных процессах живых организмов. У человека вырабатывается два типа эластазы: панкреатическая (эластаза-1) с оптимумом pH 8,8, которая является абсолютно специфичным ферментом поджелудочной железы, и нейтрофильная – с оптимумом pH 7,4. Она концентрируется в азурофильных цитоплазматических гранулах полиморфноядерных лейкоцитов. Синтез нейтрофильной эластазы происходит на стадии роста гранулоцита, а в кровотоке поступают клетки с уже готовыми ферментами. Наибольшее количество нейтрофильной эластазы определяется в нейтрофилах. Незначительные концентрации определяются в моноцитах и Т-лимфоцитах.

Нейтрофильная эластаза участвует в естественной деградации матричных белков – эластина, коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов. Кроме того, нейтрофильная эластаза расщепляет многие растворимые протеины – иммуноглобулины, факторы коагуляции, компоненты комплемента и многие протеазные ингибиторы [5].

Весьма важным представляется значение нейтрофильной эластазы как регулятора воспаления, причем в разных ситуациях она может выступать и

как провоспалительный, и как противовоспалительный агент. Известна протеолитическая активность нейтрофильной эластазы в отношении многих растворимых протеинов, в том числе цитокинов воспаления [6]. Описана способность нейтрофильной эластазы *in vitro* блокировать 1-й и 3-й рецепторы комплемента, что снижает миграцию Т-лимфоцитов и нейтрофилов в очаг воспаления, подавляет их адгезивные свойства. Нейтрофильная эластаза расщепляет рецепторы липополисахаридов (ЛПС) CD14, что приводит к уменьшению экспрессии IL-8 и TNF α в ответ на стимуляцию ЛПС [5]. Как известно, ЛПС являются главными компонентами бактериальной стенки грамотрицательных бактерий. Таким образом, нейтрофильная эластаза снижает воспалительный ответ на внедрение микроорганизмов.

Противоположным противовоспалительным эффектом нейтрофильной эластазы является ее способность усиливать воспалительные реакции. Описано индуцирующее влияние нейтрофильной эластазы на продукцию IL-6, IL-8, колониестимулирующего фактора [5]. Фермент выступает как активный компонент иммунитета, участвуя в расщеплении белковых компонентов бактериальной стенки. При длительной секреции эластаза, секретлируемая в очагах воспаления, может вызывать серьезные повреждения тканей. Считается, что эта протеиназа играет важную роль в развитии разнообразных воспалительных нарушений, включая эмфизему легких, сепсис, артриты, нефриты и некоторые заболевания кожи.

Представляя собой небольшой катионный пептид, который образует в мембранах бактерий ионные каналы, нейтрофильная эластаза выступает как активный компонент антимикробного иммунитета. Подобные вещества в организме человека называются дефензинами.

Синтезировать эластазу также могут и микроорганизмы. Выделяясь в окружающую среду, она расщепляет крупные молекулы до мономеров и димеров, способных проникнуть внутрь клетки, таким образом обеспечивая бактерию источниками углерода и энергии. Также эластаза играет роль фактора агрессии и инвазии и помогает микроорганизмам преодолевать защитные барьеры макроорганизма [7].

Ферментативный спектр, который частично определяет особенности патогенеза заболеваний, вызванных различными микроорганизмами, является таксономическим признаком, что, в свою очередь, помогает в идентификации микроорганизма. Не все они могут синтезировать эластазу, и, например, только некоторые штаммы синегнойной палочки (IFO 3455, TM13, TM14, TM 49, TM 97) продуцируют данный фермент [8].

В последние годы в медицине актуальным направлением является изучение возможности использования альтернативных биологических жидкостей с целью диагностики ранних форм заболеваний. Ротовая жидкость является удобным объектом неинвазивных исследований, четко реагирующим на влияние среды и отражающим общее состояние человека. Ротовая жидкость выступает в качестве маркера патологических изменений в челюстно-лицевой области и в организме в целом.

Таким образом, изучение активности эластазы ротовой жидкости пациентов с гнойно-воспалительными процессами челюстно-лицевой области позволит выявить новые патогенетические механизмы развития заболевания.

Цель исследования – изучить эластазную активность ротовой жидкости пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области.

Материалы и методы

Проведено комплексное обследование и лечение двух групп пациентов: 20 пациентов с острым сиалоаденитом и 25 пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом нижней челюсти, осложненным флегмоной прилежащих клетчаточных пространств, а также 22 донора. Пациенты с флегмонами также были разделены на группы в зависимости от распространенности гнойно-воспалительного процесса: пациенты с флегмонами одного клетчаточного пространства (15 человек) и пациенты с флегмонами нескольких клетчаточных пространств (10 человек). Пациенты находились на стационарном лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница». Всем пациентам с острым одонтогенным остеомиелитом нижней челюсти, осложненным флегмоной прилежащих клетчаточных пространств, в день поступления проводилась хирургическая обработка гнойного очага, назначалась комплексная противовоспалительная терапия с обязательным включением антибактериальных, десенсибилизирующих и дезинтоксикационных лекарственных средств. Пациентам с острым сиалоаденитом проводилась хирургическая обработка гнойного очага по показаниям, назначался комплекс лечебных мероприятий. По завершении стационарного курса лечения пациенты были выписаны. В день госпитализации (проба 1) перед проведением лечебных мероприятий и в день выписки из стационара (проба 2) производился забор ротовой жидкости натошак в стерильные пробирки. Определение активности эластазы в ротовой жидкости проводили по модифицированной нами методике, предложенной Гюн-Хван и Ким Хен [9].

Для определения эластазной активности пробы, содержащие ротовую жидкость, перед использованием осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10 тыс. об/мин; центрифуга MICRO 120). Для постановки метода использовали эластин-конго красный (диаметр частиц 37–75 микрон, производство Sigma) в концентрации 0,8 мг на 1 мл буфера как субстрат для фермента, ротовой жидкости и буферного раствора (0,2 М солянокислый трис-буфер) с рН 7,4, так как у нейтрофильной эластазы оптимум рН 7,4. Эластаза расщепляла эластин, и конго красный переходил в раствор, изменяя его цвет с бесцветного на красный с максимальным спектром поглощения 495. Для удобства постановки вместо пробирок использовались эппендорфы. В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 400 мкл раствора эластин-конго красного на трис-НСl буфере рН 7,4 и 100 мкл ротовой жидкости. Контролем служили пробы, содержащие буферный раствор с соответствующим рН в количестве 400 мкл и 100 мкл ротовой жидкости, чтобы исключить влияние оптической плотности ротовой жидкости на результаты определения активности фермента. Далее проводили инкубацию проб в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 10 мин (10 тыс. об/мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося эластина-Конго красного в виде неразрушенных частиц. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300,

где при длине волны 492 нм (максимально близкой к 495 нм) определяли оптическую плотность в лунках. Результат выражался в оптических единицах ($E_{оп}$), рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных. Статистическую обработку данных проводили с помощью Excel и Statistica 6.0. Так как изучаемые показатели имели нормальное распределение во всех группах исследования ($p > 0,05$ для критерия Шапиро – Уилка во всех группах), результаты представлены в виде $M \pm \sigma$. При сравнении групп использован t -критерий Стьюдента для независимых групп, для изучения изменений активности эластазы в процессе лечения в пределах одной группы исследуемых использован t -критерий Стьюдента для зависимых групп.

Результаты исследования

Результаты определения активности эластазы ротовой жидкости представлены в табл. 1.

Таблица 1

Активность эластазы ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области и здоровых лиц

Группа участников исследования	Активность эластазы, $E_{оп}$		p (проба 1 / проба 2)
	Начало лечения (проба 1)	Завершение лечения (проба 2)	
Доноры	0,016 ± 0,01		
Флегмона одного клетчаточного пространства	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,02
Флегмона нескольких клетчаточных пространств	0,086 ± 0,04	0,007 ± 0,005	0,01
Острый сиалоаденит	0,04 ± 0,02	0,017 ± 0,01	0,0008

У здоровых доноров активность эластазы ротовой жидкости составила $0,016 \pm 0,01 E_{оп}$. При этом данный показатель у пациентов с одонтогенными флегмонами одного клетчаточного пространства в день госпитализации был равен $0,04 \pm 0,02 E_{оп}$, у пациентов с флегмонами двух и более клетчаточных пространств активность эластазы в день поступления в стационар составила $0,086 \pm 0,04 E_{оп}$. У пациентов с сиалоаденитами изучаемый показатель при поступлении был равен $0,04 \pm 0,02 E_{оп}$. При сравнении активности эластазы ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области с активностью эластазы здоровых доноров выявлено статистически значимое повышение активности фермента в день госпитализации у пациентов с одонтогенными флегмонами одного клетчаточного пространства ($p = 0,000001$), у пациентов с флегмонами нескольких клетчаточных пространств ($p = 0,000001$) и у пациентов с сиалоаденитом ($p = 0,000001$). Таким образом, при развитии одонтогенных и неодонтогенных гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области активность эластазы ротовой жидкости повышается относительно показателя здоровых лиц.

В день завершения стационарного лечения активность эластазы ротовой жидкости у пациентов с флегмонами одного клетчаточного пространства составила $0,02 \pm 0,02 E_{оп}$, у пациентов с флегмонами нескольких клетчаточ-

ных пространств – $0,007 \pm 0,005 E_{Op}$, у пациентов с сиалоаденитом – $0,017 \pm 0,01 E_{Op}$. В ходе лечения активность эластазы ротовой жидкости статистически значимо уменьшалась относительно показателя первого дня стационарного лечения у пациентов с одонтогенными флегмонами одного клетчаточного пространства ($p = 0,02$), у пациентов с флегмонами нескольких клетчаточных пространств ($p = 0,01$) и у пациентов с сиалоаденитами ($p = 0,0008$). При этом статистически значимых отличий активности эластазы пациентов в день завершения лечения от показателя здоровых доноров выявлено не было ($p > 0,05$), что указывает на снижение и нормализацию изучаемого показателя при купировании воспалительных процессов челюстно-лицевой области.

При сравнении активности эластазы ротовой жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области между собой выявлено статистически значимое повышение активности фермента при распространении гнойно-воспалительного процесса. Так, в день госпитализации в стационар у пациентов с флегмонами одного клетчаточного пространства данный показатель составил $0,04 \pm 0,02 E_{Op}$, а у пациентов с флегмонами нескольких клетчаточных пространств – $0,086 \pm 0,04 E_{Op}$, $p = 0,04$. В то же время эластазная активность ротовой жидкости пациентов этих двух групп в день завершения курса лечения не отличались ($p > 0,05$).

У пациентов с сиалоаденитом активность изучаемого фермента в день госпитализации не имела статистически значимых отличий от данного показателя пациентов с флегмонами одного клетчаточного пространства ($p > 0,05$) и была ниже, чем у пациентов с флегмонами двух и более клетчаточных пространств ($p = 0,01$). В то же время в день выписки пациентов из стационара активность эластазы у пациентов с сиалоаденитом не отличалась от активности фермента пациентов с флегмонами различной распространенности ($p > 0,05$).

Заключение

Таким образом, эластазная активность ротовой жидкости повышается при развитии воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области одонтогенного и неодонтогенного характера, а при купировании острых воспалительных процессов активность данного фермента снижается до показателей здоровых лиц. Активность эластазы ротовой жидкости у пациентов с более распространенными одонтогенными гнойно-воспалительными процессами выше, чем при развитии воспаления в пределах одного клетчаточного пространства. Дальнейшее изучение активности эластазы ротовой жидкости при развитии гнойно-воспалительных процессов челюстно-лицевой области позволит разработать неинвазивные диагностические тесты для повышения качества оказания медицинской помощи данной категории пациентов.

Список литературы

1. Агапов, В. С. Инфекционные воспалительные заболевания челюстно-лицевой области / В. С. Агапов, С. Д. Артюнов, В. В. Шулаков. – М. : МИА, 2004. – 184 с.
2. Deep vein thrombosis in a burn patient / O. Heymans [et al.] // Rev. Med. Liege. – 2002. – Vol. 57, № 9. – P. 587–590.
3. Эпидемиологические особенности госпитальной хирургической инфекции челюстно-лицевой области / С. А. Кабанова [и др.] // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 35–40.

4. **Giamarellou, H.** Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery / H. Giamarellou, A. Antoniadou // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* – 1996. – Vol. 17, № 8. – P. 558–564.
5. **Аверьянов, А. В.** Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких / А. В. Аверьянов // *Цитокины и воспаление.* – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 3–8.
6. **Косинец, А. Н.** Инфекция в хирургии: Руководство / А. Н. Косинец, Ю. В. Стручков. – Витебск : Изд-во ВГМУ, 2004. – 510 с.
7. **Супотницкий, М.** Микроорганизмы, токсины и эпидемии / М. Супотницкий. – М. : Вузовская книга, 2000. – 376 с.
8. Нейтрофильная эластаза в биологических средах беременных женщин с инфекционной патологией / Ю. Г. Клименкова и др. // *Студенческая медицинская наука XXI века : материалы XIII Междунар. науч.-практ. конф.* – Витебск : Витебск. гос. мед. ун-т, 2013. – С. 267–268.
9. **Ohman, D. E.** Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase / D. E. Ohman, S. J. Cryz, B. H. Iglewski // *J. Bacteriol.* – 1980. – № 142. – P. 836–842.

References

1. Agapov V. S., Artyunov S. D., Shulakov V. V. *Infektsionnye vospalitel'nye zabolevaniya chelyustno-litsevoy oblasti* [Infectious inflammatory diseases of maxillofacial area]. Moscow: MIA, 2004, 184 p.
2. Heymans O. et al. *Rev. Med. Liege.* 2002, vol. 57, no. 9, pp. 587–590.
3. Kabanova S. A. et al. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of Vitebsk State Medical University]. 2003, vol. 2, no. 1, pp. 35–40.
4. Giamarellou H., Antoniadou A. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1996, vol. 17, no. 8, pp. 558–564.
5. Aver'yanov A. V. *Tsitokiny i vospalenie* [Cytokine and inflammation]. 2007, vol. 6, no. 4, pp. 3–8.
6. Kosinets A. N., Struchkov Yu. V. *Infektsiya v khirurgii: Rukovodstvo* [Infection in surgery: guide]. Vitebsk: Izd-vo VGMU, 2004, 510 p.
7. Supotnitskiy M. *Mikroorganizmy, toksiny i epidemii* [Microorganisms, toxins and epidemics]. Moscow: Vuzovskaya kniga, 2000, 376 p.
8. Klimenkova Yu. G. et al. *Studencheskaya meditsinskaya nauka XXI veka: materialy KhIII Mezhdunar. nauch.-prakt. konf.* [Student medical science of XXI century: proceedings of XIII International scientific and practical conference]. Vitebsk. gos. med. un-t., 2013, pp. 267–268.
9. Ohman D. E., Cryz S. J., Iglewski B. H. *J. Bacteriol.* 1980, no. 142, pp. 836–842.

Кабанова Арина Александровна

кандидат медицинских наук, доцент,
кафедра стоматологии детского возраста
и челюстно-лицевой хирургии,
Витебский государственный
медицинский университет (Беларусь,
г. Витебск, пр.Фрунзе, 27)

E-mail: arinakabanova@mail.ru

Kabanova Arina Aleksandrovna

Candidate of medical sciences, associate
professor, sub-department of children
dentistry and maxillofacial surgery,
Vitebsk State Medical University
(27 Frunze avenue, Vitebsk, Belarus)

Окулич Виталий Константинович
кандидат медицинских наук, доцент,
кафедра клинической микробиологии,
Витебский государственный
медицинский университет (Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27)

E-mail: vokul@mail.ru

Гончарова Анна Игоревна
аспирант, Витебский
государственный медицинский
университет (Беларусь, г. Витебск,
пр. Фрунзе, 27)

E-mail: anna2569@yandex.by

Усович Александр Константинович
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой анатомии
человека, Витебский
государственный медицинский
университет (Беларусь, г. Витебск,
пр. Фрунзе, 27)

E-mail: usovicha@mail.ru

Денисенко Александр Григорьевич
кандидат медицинских наук, ассистент,
кафедра судебной медицины,
Витебский государственный
медицинский университет (Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27)

E-mail: denisenko_1976@mail.ru

Okulich Vitaliy Konstantinovich
Candidate of medical sciences, associate
professor, sub-department of clinical
microbiology, Vitebsk State Medical
University (27 Frunze avenue, Vitebsk,
Belarus)

Goncharova Anna Igorevna
Postgraduate student, Vitebsk State
Medical University (27 Frunze avenue,
Vitebsk, Belarus)

Usovich Aleksandr Konstantinovich
Doctor of medical sciences, professor,
head of sub-department of human anatomy,
Vitebsk State Medical University
(27 Frunze avenue, Vitebsk, Belarus)

Denisenko Aleksandr Grigor'evich
Candidate of medical sciences, assistant,
sub-department of forensic medicine,
Vitebsk State Medical University
(27 Frunze avenue, Vitebsk, Belarus)

УДК 616.716.8 – 002.36:575.15

Кабанова, А. А.

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 // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2014. – № 2 (30). – С. 68–75.