

УДК 616-008.843.1-07:612.396:611.018.7:616.311.2-002.828:576.52-053.2

Е.Г. Романенко¹, И.А.Кленина²

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУКОЗЫ В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ И ЕЁ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СТАТУСОМ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ДЕСНЫ У ДЕТЕЙ

¹ ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»² ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», Днепропетровск

В настоящее время при изучении патологии тканей пародонта большое значение придается защитным факторам полости рта, среди которых особое значение имеет изменение качественного и количественного состава муцинов (гликопротеинов) слюны [7, 9]. Воспалительные процессы в десне могут быть связаны с изменением структуры и состава гликопротеинов, которые определяют основные физико-химические свойства слюны, принимающей также участие в формировании защитного барьера слизистых оболочек пищевода и желудка. Важным источником слизистых веществ в полости рта является секрет поднижнечелюстных и подъязычных желез, содержащий основную массу гликопротеинов.

О характере нарушения образования и степени зрелости гликопротеинов слюны можно судить по наличию в их составе терминальных углеводных остатков, представленных фукозой, сиаловыми кислотами, и корпусных моносахаров, представленных гексозаминами. Полноценное созревание гликопротеинов в клетке обеспечивает защиту слизистой оболочки от внешних и внутренних агрессивных факторов [5], в том числе адгезии патогенных микроорганизмов. Во многих случаях специфичность микробных лектинов к углеводным лигандам хозяина определяет инвазию микробных патогенов [4]. Функциональный и морфологический статусы эпителиоцитов способны меняться на фоне патологических состояний [8,10]. *In vivo* на процесс адгезии существенное влияние оказывают растворенные компоненты биологических жидкостей и секретов, с которыми патогены чаще встречаются до контактов с клетками-мишенями и которые по химическому строению аналогичны клеточным рецепторам [1]. В литературе встречаются данные о непосредственном влиянии компонентов ротовой жидкости на процесс прикрепления клеток к эпителиоцитам через модификацию адгезивных молекул [6]. Фукоза содержит изомер глюкозы и действует как одна из форм рецепторов для *Candida*. Механизмы подобных взаимодействий полностью не установлены, хотя именно смешанная слюна является первым, подчас непреодолимым препятствием для патогенных микроорганизмов, их адге-

зии к поверхности клеток-мишеней. Колонизационная резистентность во многом будет зависеть от совокупности факторов, препятствующих прикреплению и размножению микроорганизмов на слизистых оболочках ротовой полости. Существенная роль при этом отводится нормофлоре слизистых оболочек, ее конкурентным взаимоотношениям с патогенной микрофлорой и физиологическому состоянию эпителиальных клеток. Однако не все так однозначно, т.к., в частности, кандиды используют механизмы коадгезии с бактериями нормальной микрофлоры для колонизации слизистых [12]. Роль адгезии в патогенезе кандидоза подробно обсуждена в работах зарубежных ученых [11,12]. Авторы излагают гипотезу о роли адгезина *S. albicans* и предполагают, что рецепторы адгезии, специфичные к гликопротеинам человека, обеспечивают условно-патогенным возбудителям возможность колонизации мукоидных мембран эпителия. Блокирование рецепторов адгезинов избытком лиганда способно предотвратить адгезию к иммобилизованным гликопротеинам базальных мембран эпителия и таким образом остановить распространение инфекции. Фукоза слюны может конкурентно связывать рецепторы *S. albicans* и тем самым препятствовать адгезии микроорганизма на эпителиоцитах.

Учитывая вышесказанное, определение фукозы в слюне – ценный диагностический и прогностический критерий в стоматологии и гастроэнтерологии. Исследование содержания фукозы в слюне до настоящего времени проводили по методике Дисше (Dische N., Shettles Z., 1948) [3]. Нами предложена модификация метода, состоящая в следующем.

Используемые реактивы: 95-96% этанол, 0,1 н. NaOH, сернокислотный реактив (6 частей концентрированной H₂SO₄ и одна часть дистиллированной воды), 3% раствор солянокислого цистеина, стандартные растворы, содержащие 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мг L-фукозы в 1 мл дистиллированной воды.

Ход определения. 1 мл слюны приливают к 2 мл 96% этанола, центрифугируют 10–15 мин. при 1500 об/мин., надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют 1 мл 0,1 н. NaOH. За-

тем в пробирку добавляють 4,5 мл охолодженого серноокислотного реактива. То же количество кислоты добавляем к стандартным растворам фукозы, взятым по 1 мл. Затем все смеси помещаем в кипящую водяную баню на 10 минут. Пробирки охлаждають водопроводной водой и добавляють 0,1 мл 3% раствора солянокислого цистеина. Оставляют на 1 час при комнатной температуре и фотометрируют в кювете 10 мм при длинах волн 400 Нм и 440 Нм. Специфичность реакции повышается, если определение производят не прямо, а вычитывают разность экстинции при длинах волн 400 и 440 Нм, что позволяет избавиться от воздействия гексоз и пентоз. Контролем служит проба с дистиллированной водой. Построение калибровочных графиков осуществляют с использованием стандартных растворов фукозы.

Расчёт производится по формуле (1):

$$\Delta E \times 620,5 \text{ (мкг/мл)}, \quad (1)$$

где ΔE - разница между экстинциями опытной пробы, найденными при колориметрировании при длинах волн 400 и 440 Нм;

620,5 – коэффициент пересчета.

Особенностью способа является то, что гликопротеины смешанной слюны, в состав которых входит фукоза, предварительно осаждаются 96% этанолом, взятом в соотношении 2:1 к слюне, и полностью отделяются в осадок при центрифугировании. Надосадочную жидкость, содержащую белок, после центрифугирования сливают, что позволяет исключить влияние вязкости и мутности слюны на исследование.

Цель исследования: разработать и апробировать эффективный, точный и простой в исполнении метод определения содержания фукозы в смешанной слюне и оценить её влияние на функциональный статус эпителиоцитов десны у детей.

Материал и методы исследований

Для апробации метода обследовано 72 ребёнка обоих полов в возрасте от 12 до 17 лет. Из них 60 детей - с патологией верхних отделов пищеварительного тракта и 12 соматически здоровых детей (контрольная группа). Контингент детей был набран из пациентов областной детской клинической больницы, проходивших исследование и лечение в гастроэнтерологическом отделении. Диагностика патологии гастродуоденальной зоны проводилась в соответствии с Протоколами диагностики и лечения гастроэнтерологических заболеваний у детей МЗ Украины (2010 г.). Для верификации диагноза все больные подлежали клинико-инструментальному обследованию, которое включало ФЭГДС, УЗ исследование органов брюшной полости. Больные с патологией верхних отделов пищеварительного тракта были разделены на группы: 1 - дети с воспалительными изме-

нениями в слизистой оболочке пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки - 16 человек; 2 - дети с воспалительными и эрозивными изменениями в слизистой оболочке пищевода и желудка - 12 человек; 3 - дети с воспалительными и эрозивными изменениями в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки - 10 человек; 4 - дети с язвой луковицы двенадцатиперстной кишки - 8 человек; 5 - дети с обострением хронического гастрита и дуоденита - 14 человек.

Слюну собирали утром натощак путём сплёвывания в одноразовую пластиковую ёмкость в объёме 2-2,5 мл. Фукозу в смешанной слюне определяли предложенным выше методом.

Определение адгезивных свойств эпителиоцитов к микроорганизмам *C. albicans* штамм: ССМ 885 АТСС10231 = 300001 проводили экспресс-методом В. И. Бриллиса, (1986) на модели "эпителий десны - *C. albicans*" [2]. О степени адгезивности штамма судили по следующим показателям:

-средний показатель адгезии (СПА) - среднее количество микроорганизмов, прикрепившихся на эпителиоцит;

-коэффициент участия эпителиоцитов в адгезивном процессе (Куэ) - процент эпителиоцитов, имеющих на своей поверхности адзегированные микроорганизмы.

СПА от 0 до 1,0 соответствует нулевой адгезивности, от 1,01 до 2,0 - низкой, от 2,01 до 4 - средней, более 4 - высокой адгезивности.

Статистическую обработку данных клинических и лабораторных исследований проводили с использованием лицензионной программы «STATISTICA 6.1». Определяли среднюю арифметическую величину (M), величину ошибки среднего (m), критерий значимости (t) Стьюдента, степень достоверности различий (p).

Результаты исследований и их обсуждение.

Содержание фукозы в смешанной слюне у детей обследуемых групп представлено в таблице. У детей с заболеваниями верхних отделов пищеварительного тракта содержание фукозы в смешанной слюне достоверно повышается. Исключение составляют дети с эрозивным поражением луковицы двенадцатиперстной кишки и воспалительными поражениями в слизистой оболочке пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки, хотя и в этих группах детей есть тенденция к повышению содержания фукозы в слюне на 15,45% и 24,76% соответственно по сравнению с группой контроля. Наиболее высоким оказалось содержание фукозы у детей с эрозивными поражениями кардиальной зоны желудка и пищевода, а также у детей с обострением хронического процесса в верхних отделах пищеварительного тракта.

Содержание фукозы в смешанной слюне и показатели колонизации *C.albicans* на эпителиоцитах у детей обследуемых групп

Показатели	Группы детей (n=72)					
	контроль (n=12)	1 группа (n=16)	2 группа (n=12)	3 группа (n=10)	4 группа (n=8)	5 группа (n=14)
Фукоза, ммоль/л	0,55±0,01 *1; **2,4, 5	0,73±0,05 * 2, 5	1,24±0,11 *1; **к,3	0,65±0,04 *4,5; ** 2	0,94±0,05 *к, 1,3	1,05±0,06 *к, 1,3
КУЭ, %	21,78±0,34 *5;**1,3,4	64,20±2,80 *3,4,5 **к,2	22,76±1,42 *5;**1,3,4	45,31±2,61 *1,4;**к	64,88±0,57 *3,5; **к,2	37,40±5,21 *к, 1,2,4
СПА, ед.	1,75±0,12 *4, 1	3,99±0,24 *к, 2,5	1,54±0,13 * 1, 4	2,16±0,21 *1	3,56±0,12 *к,2, 5	1,70±0,18 * 1, 4

Примечание: к – контрольная группа;

* достоверность различий показателей между группами * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Очевидно, повышение содержания фукозы способствует увеличению объёма слизистого компонента слюны и играет важную роль в защите слизистой оболочки пищевода и желудка при кислотозависимых заболеваниях.

В то же время количество эпителиоцитов, участвующих в адгезивном процессе с *Candida albicans*, как и количество микроорганизмов, прикрепившихся на эпителиоцит, было максимальным у детей первой и четвёртой групп. Повидимому, в первой группе незначительное повышение содержания фукозы не влияет на защитные свойства слюны и не может препятствовать адгезии патогенных микроорганизмов. У детей с язвенным поражением желудка и двенадцатиперстной кишки (4 группа), как нами указывалось ранее, снижается содержание других углеводных компонентов гликопротеинов - сиаловых кислот и гексозаминов [7]. Нарушение соотношения состава моносахаров в гликопротеинах слюны при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки свидетельствует о синтезе «незрелых» гликопротеинов и снижении защитной функции слизистого компонента, что способствует адгезии *Candida albicans*. Длительность заболевания у детей этой группы более четырёх лет, что может в итоге приводить к истощению образования слизистой составляющей секрета слюнных желез.

У детей при высоком содержании фукозы в слюне процент эпителиоцитов с адгезированными микроорганизмами во второй группе практически не отличался от показателя группы контроля; в пятой группе был достоверно ниже, чем в первой и четвёртой группах детей. Количество микроорганизмов, прикрепившихся на эпителиоцит, не превышало двух, что соответствовало низкой степени адгезивной способности эпителиоцитов, как и в группе контроля.

Уровень фукозы резко повышается при эрозивных поражениях пищевода и кардиального отдела желудка, обострении хронического гастрита и дуоденита у детей, связан с увеличением объёма слизистого компонента слюны (поскольку фукоза обладает гидрофобными свойствами), играющего важную роль в защите слизистой обо-

лочку пищевода и желудка. Повышение содержания фукозы в слюне снижает адгезивную способность эпителия десны к патогенным микроорганизмам, что имеет значение в патогенезе заболеваний пародонта у детей с гастроэнтерологической патологией.

В дальнейшем мы планируем исследовать возможность применения фукоиданов (продуктов, выделенных из бурых водорослей и содержащих фукозу) в лечении заболеваний пародонта и слизистой оболочки полости рта у детей с патологией верхних отделов пищеварительного тракта.

Литература

- Афиногенов Г.Е. Влияние ксилита в составе зубных паст на специфическую адгезию некоторых клинических штаммов микроорганизмов в полости рта / А.Е. Афиногенов, А.Г. Афиногенова, Е.Н. Доровская, С.К. Матело // *Стоматология детского возраста и профилактика*. - 2008. - Т.25, №2. - С.73-78.
- Бриллис В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Бриллис, Т.А. Брилене, Х.П. Ленцнер // *Лабораторное дело*. - 1986. - №4. - С.210-212.
- Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. - М.: Медпрессинформ, 2009. - 896 с.
- Казмирчук В.Е. Клиническая иммунология и аллергология / В.Е. Казмирчук, Л.В. Ковальчук, Д.В. Мальцев. - К.: Феникс, 2009. - 524 с.
- Лукьянов П.А. Современная гликобиология и медицина / П.А. Лукьянов, Н.В. Журавлёва // *Вестник ДВО РАН*. - 2004. - № 3. - С. 24-34.
- Махрова Т. В. Некоторые механизмы антиадгезивности эффекта секрета ротовой полости в системе "*Candida albicans* - буккальные эпителиоциты" / Т.В. Махрова, А.Н. Маянский, М.И. Заславский // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. - 2005. - № 2. - С.11-14.
- Романенко Е.Г. Состав гликопротеинов ротовой жидкости у детей с хронической гастродуоденальной патологией / Е.Г. Романенко // *Український стоматологічний альманах*. - 2012. - №2, Т 2. - С. 37-40.
- Рыжавский Б.Я. Изменения буккального эпителия при некоторых заболеваниях у детей / Б.Я. Ры-

- жавский, Г.Н. Холодок // Клиническая лабораторная диагностика.- 1995. - №2. - С.39-40.
9. Тарасенко Л.М. Биохимия органов полости рта: [учеб. пособ.] /Л.М. Тарасенко, К.С.Непорада. - Полтава, 2008. - 71 с.
10. Хусаинова И.С. Оценка цитологических показателей буккального эпителия для диагностики функционального состояния человека/ И.С. Хусаинова, И.Ю. Варулева, Н.А. Кожина // Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - №3.- С.10-12.
11. Vitkov L. Candida attachment to oral epithelium / L. Vitkov, W.D. Krautgartner, M. Hannig // Oral Microbiol Immunol. – 2002. – Vol. 17, № 1. – P.60-64.
12. Holmes A.R. Saliva Promotes Candida albicans Adherence to Human Epithelial Cells/ A.R. Holmes, B.M.K. Bandara, R.D. Cannon //J.Dent.Res.-2002.- Vol.21,№1.-P.28-32.

**Стаття надійшла
30.04.2013 р.**

Резюме

Представлен метод определения фукозы в смешанной слюне. Метод апробирован на детях обоих полов в возрасте от 12 до 17 лет с патологией верхних отделов желудочно-кишечного тракта (60 человек) и соматически здоровых детей (12 человек, контрольная группа). Результаты исследования показали, что среднее содержание фукозы в смешанной слюне детей контрольной группы составило $0,55 \pm 0,01$ ммоль/л. Содержание фукозы наиболее высоко ($1,24 \pm 0,11$ ммоль/л) у детей с эрозивными поражениями кардиальной зоны желудка и пищевода, а также у детей с обострением хронического процесса в верхних отделах пищеварительного тракта ($1,05 \pm 0,06$ ммоль/л). Повышение содержания фукозы в слюне снижает адгезивную способность эпителия десны к патогенным микроорганизмам, что имеет значение в патогенезе заболеваний пародонта у детей с гастроэнтерологической патологией.

Ключевые слова: фукоза, смешанная слюна, пищеварительный тракт, адгезия.

Резюме

Представлений метод визначення фукози в змішаній слині. Метод апробований на дітях обох статей у віці від 12 до 17 років з патологією верхніх відділів шлунково-кишкового тракту (60 осіб) і соматично здорових дітях (12 осіб, контрольна група). Результати дослідження показали, що середній уміст фукози в змішаній слині дітей контрольної групи склав $0,55 \pm 0,01$ ммоль / л). Уміст фукози найвищий ($1,24 \pm 0,11$ ммоль / л) у дітей з ерозивними ураженнями кардіальної зони шлунка та стравоходу, а також у дітей із загостренням хронічного процесу у верхніх відділах травного тракту ($1,05 \pm 0,06$ ммоль / л). Підвищення вмісту фукози в слині знижує адгезивну здатність епітелію ясен до патогенних мікроорганізмів, що має значення в патогенезі захворювань пародонта в дітей із гастроентерологічною патологією.

Ключові слова: фукоза, змішана слина, травний тракт, адгезія.

Summary

The present paper describes the method for determination of fucose in mixed saliva. The method was tested on children of both sexes aged 12 to 17 years with the pathology of the upper gastrointestinal tract (60) and physical health care (12 people, the control group). The results showed that the average content of fucose in the mixed saliva of children of the control group was $0,55 \pm 0,01$ mmol / l. Fucose content is the greatest ($1,24 \pm 0,11$ mmol / l) in children with erosive lesions in the cardiac area of the stomach and esophagus and in children with acute exacerbation of chronic process in the upper gastrointestinal tract ($1,05 \pm 0,06$ mmol / l). The increase of fucose in the saliva reduces adhesive capacity of gingival epithelium to pathogenic microorganisms, which is important in the pathogenesis of periodontal disease in children with gastroenterological diseases.

Key words: fucose, mixed saliva, digestive tract, adhesion