

- jury, and body position of the patient. Crit. Care Med. 2003; 31 (2): 411—418.
16. *Hogdson C. L., Tuxen D. V., Bailey M. J.* et al. A positive response to a recruitment maneuver with PEEP titration in patients with ARDS, regardless of transient oxygen desaturation during the maneuver. J. Intensive Care Med. 2011; 26 (1): 41—49.
  17. *Remstic P. P., Arajo S., de Figueiredo L. C.* et al. Impact of alveolar recruitment maneuver in the postoperative period of videolaparoscopic bariatric surgery. Rev. Bras. Anesthesiol. 2011; 61 (2): 163—176.
  18. *Esan A., Hess D. R., Raoof S.* et al. Severe hypoxemic respiratory failure: part 1 — ventilatory strategies. Chest 2010; 137 (5): 1203—1216.
  19. *Brower R. G., Morris A., MacIntyre N.* et al. Effects of recruitment maneuver in patient with acute lung injury acute respiratory distress syndrome ventilated with high end expiratory pressure. Crit. Care Med. 2003; 31 (11): 2592—2597.
  20. *Huh J. W., Hong S. B., Lim C. M.* et al. Effect of the alveolar recruitment manoeuvre on haemodynamic parameters in patients with acute respiratory distress syndrome: relationship with oxygenation. Respirology 2010; 15 (8): 1220—1225.
  21. *Toth I., Leiner T., Mikor A.* et al. Hemodynamic and respiratory changes during lung recruitment and descending optimal positive end-expiratory pressure titration in patients with acute respiratory distress syndrome. Crit. Care Med. 2007; 35 (3): 787—793.
  22. *Constantin J. M., Futier E., Cherprenet A. I.* et al. A recruitment maneuver increases oxygenation after intubation of hypoxemic intensive care unit patients: a randomized controlled study. Crit. Care 2010; 14 (2): R76.
  23. *Santiago V. R., Rzezinski A. F., Nardelli L. M.* et al. Recruitment maneuver in experimental acute lung injury: the role of alveolar collapse and edema. Crit. Care Med. 2010; 38 (11): 2207—2214.
  24. *Hogdson C., Keating J. L., Holland A. E.* et al. Recruitment manoeuvres for adults with acute lung injury receiving mechanical ventilation. Cochrane Database Syst. Rev. 2009; 15 (2): CD006667.

Поступила 12.05.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616-008.9-0074

**<sup>1</sup>Н. В. Белобородова, <sup>1</sup>А. Ю. Оленин, <sup>2</sup>А. С. Ходакова, <sup>1</sup>Е. А. Черневская, <sup>2</sup>О. Н. Хабиб**

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН;

<sup>2</sup>Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. акад. А. Н. Бакулева РАМН, Москва

При изучении метаболических нарушений и механизмов регуляции метаболизма при тяжелых заболеваниях и критических состояниях до недавнего времени не учитывался вклад низкомолекулярных соединений микробного происхождения. Нами исследованы сыворотки крови 16 здоровых людей методом ГХ-МС, среди многочисленных низкомолекулярных ароматических соединений выделены ключевые фенольные метаболиты (ФМ), перспективные для мониторинга и изучения, установлены нормальные (фоновые) уровни для ФМ: бензойная (БК), фенилуксусная (ФУК), фенилпропионовая (ФПК), фенилмолочная (ФМК), гидроксифенилмолочная (ГФМК) и гидроксифенилуксусная кислоты (ГФУК), в сумме не превышающие 5 мкМ. При обследовании 97 больных с сердечной недостаточностью, различными послеоперационными осложнениями инфекционного и неинфекционного характера показано, что суммарное содержание ФМ в сыворотке крови возрастает параллельно их степени тяжести, достигая максимальных значений 25 мкМ при сепсисе, а среди умерших больных — до 40 мкМ. Выявлены такие закономерности, ожидающие последующего изучения и правильной интерпретации, как воздействие неблагоприятных факторов (хирургический стресс, послеоперационные осложнения, инфекция), сопровождающее снижением ФПК, а при сепсисе ФПК вообще не обнаруживается в крови; гладкое течение послеоперационного периода, характеризующееся быстрым восстановлением исходного уровня ФМ, тогда как развитие осложнений сопровождается отклонениями, максимально выраженными при сепсисе; преобладание гидроксилированных ФМ при сепсисе указывает на усиленную микробную деградацию ароматических аминокислот, преимущественно тирозина; нельзя исключить прямое участие некоторых ФМ в танатогенезе, так как даже при небольшом числе наблюдений случаев сепсиса (n = 22) выявлены достоверные различия при сравнении выживших и умерших больных по уровню ГФМК (p = 0,001) и ФМК (p = 0,04).

Таким образом, меняющийся профиль низкомолекулярных фенольных соединений в сыворотке крови человека отражает существование малоизученных молекулярных механизмов взаимодействия клеток и тканей организма хозяина с его микрофлорой и по убеждению авторов играет важную роль в развитии и исходе критических состояний, что требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Минобрнауки РФ в рамках ГК № 16512.11.2227.

Ключевые слова: сыворотка крови, метаболические нарушения, фенольные метаболиты, низкомолекулярные фенольные соединения

## LOW-MOLECULAR PHENOL METABOLITES IN BLOOD SERUM: ORIGIN AND CLINICAL SIGNIFICANCE

*Beloborodova N.V., Olenin A.Yu., Khodakova A.S., Chernevskaya E.A., Khabib O.N.*

*Studying of metabolic disorders and metabolic regulation mechanisms in severe diseases and critical state until recently, was not taken into account the contribution of low-molecular compounds of microbial origin.*

*We have studied the blood serum of 16 healthy people with gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), among the numerous low-molecular weight aromatic compounds were highlighted key phenolic metabolites (PM), promising for monitoring and studying, and were set the normal levels of: benzoic (BA), phenylacetic (PAA), phenylpropionic (PPA), phenyllactic (PLA), hydroxyphenyllactic (HPLA) and, hydroxyphenylacetic (HPAA) acids, total amount under 5 microns.*

*Examining 97 patients with heart failure, different postoperative infectious and noninfectious complications, it was shown, that the total content of PM increases according to their severity degree, reaching 25 microns in sepsis, and 40*

*microns in all patients deaths. Revealing regularities in need of further study and correct interpretation, namely: the effects of negative factors (surgical stress, postoperative complications, infection) accompanied by PPA decrease, and in sepsis PPA is not found in the blood; the smooth postoperative period course is characterized by rapid restoration of the initial PM level, while complications development – by disorders, the largest in sepsis; the predominance of hydroxylated PM in sepsis points to increased microbial degradation of aromatic amino acids, mainly tyrosine; one cannot exclude the participation of some PM in tanatogenesis, because even with a small number of observations cases of sepsis (n=22) were revealed significant differences in HPLA (p=0,001) and PLA (p=0,04) among the survivors and the dead patients. Thus, the changing profile of low-molecular PM reflects the existence of poorly known mechanisms of interaction between the cells and tissues of the organism with its microflora, and according to authors plays an important role in critical state development and outcome that requires further study.*

**Key words:** *blood serum, metabolic disorders, phenol metabolites, low-molecular phenol metabolites*

Изучение метаболических нарушений и механизмов регуляции метаболизма при тяжелых заболеваниях и критических состояниях чрезвычайно актуально, однако до недавнего времени вклад низкомолекулярных соединений микробного происхождения практически не учитывался. В то же время факт постоянного присутствия низкомолекулярных соединений фенольного ряда (далее для краткости — фенольных метаболитов — ФМ) в сыворотке крови людей на сегодняшний день уже не вызывает сомнений [1—3]. Установлено, что качественно-количественный профиль этих соединений существенно различается у здоровых и больных людей [2], однако клиническое значение этих находок изучено крайне мало. Доказано, что у больных сепсисом имеет место многократное увеличение уровня таких фенольных метаболитов, как ФМК, ГФМК, ГФУК, по сравнению с фоновыми концентрациями, в связи с чем предложено их использовать в качестве биомаркеров сепсиса [3—6]. Представления о происхождении ФМ в организме человека весьма противоречивы. В работах, изучающих ФМ в кишечнике людей [7], а также в микробиологических исследованиях на чистых культурах условно-патогенных и индигенных бактерий ФМ изучают как продукты микробного метаболизма [4, 8—10], а в международной базе данных Human Metabolome Database, где к настоящему времени содержится информация по 7900 метаболитам [11], те же ФМ относят к продуктам человеческого метаболизма.

В литературе наиболее распространены представления об алиментарном происхождении ФМ в организме человека [12, 13], причем основным источником низкомолекулярных фенольных соединений считаются полифенолы растительного происхождения, входящие в состав чая, кофе, вина, фруктов, шоколада и пр. [13—17]. Дегградация полифенолов происходит в пищеварительном тракте с участием кишечной микрофлоры и приводит к образованию ФМ [12, 15—18]. Наряду с полифенолами среди других предшественников ФМ называют ароматические аминокислоты, некоторые лекарственные препараты, стероиды, пищевые красители и др.

Актуальность клинического изучения низкомолекулярных ароматических соединений связана с биологической активностью, характерной для соединений этого ряда, в сочетании с их широким распространением в природе. Наибольший интерес к этим соединениям проявляют специалисты-диетологи, гастроэнтерологи, онкологи, исследователи проблемы долголетия и качества жизни. Наряду с известными ранее антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [20] в последние годы сообщается о влиянии фенольных соединений микробного происхождения на функции клеток эпителия толстой кишки человека в качестве антиканцерогенных агентов [21]. Изучаются не только позитивные, но и негативные биологические эффекты ФМ. В экспериментальных условиях при изучении механизмов токсического действия фенилкарбонновых кислот (ФКК) показана способность негидроксилированных ФКК влиять на митохондрии, подавляя активность ферментов дыхательной цепи [22—24].

В некоторых работах утверждается, что ФМ участвуют в патогенезе заболеваний, причем как инфекционных [25], так и неинфекционных [2, 8], а общебиологическая роль микробных метаболитов состоит в обеспечении динамического равновесия между микробиотой и организмом хозяина, т. е. в поддержании гомеостаза здорового человека [26, 27].

Таким образом, имеются серьезные основания для изучения не только диагностической значимости, но и биологической роли ФМ, присутствующих в крови здорового и больного человека.

#### **Информация для контакта.**

Белобородова Наталья Владимировна. E-mail: nvbeloborodova@yandex.ru

Однако на сегодняшний день в научной литературе, связанной с исследованием фенольных соединений в биологических средах человека, преобладают прикладные работы, например посвященные изучению биодоступности полифенолов, содержащихся в пищевых продуктах и напитках. Немаловажным ограничением в изучении клинического значения микробных метаболитов является методологическая сторона: для детекции низкомолекулярных соединений в сыворотке крови нужна газовая хромато-масс-спектрометрия с предшествующей трудоемкой пробоподготовкой исследуемого образца.

Авторы данной работы считают весьма перспективным изучение ФМ при критических состояниях, в том числе сопровождающихся бактериальным воспалением (сепсис). По мнению авторов, ФМ могут участвовать в механизмах критических состояний, выполнять функцию сигнальных молекул при развитии синдрома системного воспалительного ответа, полиорганной недостаточности и др. По-прежнему остаются неясными происхождение ряда ФМ в крови тяжелых больных, связь уровня ФКК с тяжестью состояния и летальностью.

Целью данной работы было изучение профиля ФМ в сыворотке крови людей при воздействии различных факторов (операционная травма, развитие локального/системного микробного воспаления), выявление клинически значимых ФМ, коррелирующих с присоединением инфекции, с тяжестью состояния и исходом.

**Материалы и методы.** Исследовались образцы сыворотки крови от 113 больных и здоровых взрослых людей в возрасте 18—70 лет — всего 6 групп. При включении больных в ту или иную группу использовались клинико-лабораторные критерии, общепринятые для постановки соответствующего диагноза, что документировалось в истории болезни.

Группа 1 "норма", включены 16 здоровых людей, добровольцев из состава сотрудников института; группа 2 "больные кардио" — 36 кардиологических больных с приобретенными пороками сердца и/или ишемической болезнью сердца, нуждающиеся в хирургическом лечении, забор крови для исследования проводили при поступлении в кардиохирургической стационар (перед операцией); группа 3 "после операции" — 11 больных, перенесших кардиохирургическую операцию с ИК, с гладким течением послеоперационного периода. Анализировались образцы, взятые у этих больных до операции, на 3-й и 6-е сутки после операции. Операции были выполнены с ИК по поводу изолированных пороков аортального клапана (у 3), при сочетанном поражении двух—трех клапанов (у 5) или на клапанах в комбинации с аортокоронарным шунтированием (у 3); группа 4 "осложнения" — 8 кардиологических больных после операций с ИК по поводу приобретенных пороков сердца и/или ишемической болезни сердца, с осложненным течением послеоперационного периода, нуждающиеся в продленной ИВЛ (энцефалопатия, сердечная недостаточность, синдром полиорганной недостаточности, астенизация и др.), не имеющие осложнений инфекционного характера, т. е. без диагноза пневмонии, раневой инфекции, сепсиса; в группу 5 "пневмония" включены 20 больных в возрасте 43—70 лет, 9 мужчин и 11 женщин, с документированной ИВЛ-ассоциированной пневмонией, развившейся в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных. Диагноз пневмонии ставили в соответствии с критериями. Операции были выполнены по поводу изолированных пороков аортального (у 4), митрального (у 4), сочетанного поражения двух—трех клапанов (у 7) или на клапанах в комбинации с аортокоронарным шунтированием (у 5). Кровь брали при клинико-лабораторном и рентгенологическом подтверждении пневмонии в сроки после операции 5—35 сут. Гемодиализ у 1 больного. Летальных случаев 3 (15%); группа 6 "сепсис". В группу включены 22 больных в возрасте 42—70 лет, 14 мужчин и 8 женщин, оперированных по поводу пороков

Таблица 1

**Определяемые соединения, хроматографические и масс-спектральные характеристики их ТМС-производных**

Соединение	Время удерживания, мин	Основной ион, m/z	Дополнительный ион, m/z
D <sub>5</sub> -бензойная кислота (стандарт)	10,45	184	110
Бензойная кислота	10,51	179	105
<i>n</i> -Гидроксibenзойная кислота	18,27	267	223
2,4-Дигидроксibenзойная кислота	20,75	355	281
3,4-Дигидроксibenзойная кислота	20,84	193	370
Фенилукусная кислота	11,71	164	91
<i>n</i> -Гидроксифенилукусная кислота	18,04	179	296
2-Гидроксифенилукусная кислота	15,22	179	147
Фенилпропионовая кислота	14,02	104	207
<i>n</i> -Гидроксифенилпропионовая кислота	19,80	179	192
Циннамовая кислота	16,29	205	131
<i>n</i> -Гидроксифенилциннамовая кислота	22,22	219	293
Фенилмолочная кислота	17,12	193	147
<i>n</i> -Гидроксифенилмолочная кислота	22,02	179	147
<i>o</i> -Гидроксифенилукусная кислота	16,75	147	253

аортального (у 3), митрального (у 4) или обоих клапанов (у 8), а также после операций аортокоронарного шунтирования (АКШ) у 1 или АКШ в сочетании с протезированием клапанов (у 6). Все больные на момент обследования находились в ОРИТ на ИВЛ в связи с осложненным течением послеоперационного периода.

Диагноз сепсиса ставился в соответствии с международными рекомендациями [28, 29]: при наличии гнойно-воспалительного очага и/или бактериемии, SIRS и признаков органной недостаточности одновременно. Забор крови на исследование осуществляли в день, когда диагноз сепсиса был документирован и внесен в историю болезни. Из инфекционных очагов на момент забора крови (7—38 сут после операции) более чем у половины больных имела место пневмония (у 13), также встречались перитонит (у 1), раневая инфекция (у 1), гангренозный холецистит (у 1). Бактериemia документирована у 10 больных. У всех больных наблюдалась полиорганная недостаточность, в том числе почечная (на гемодиализе 12 больных), печеночная (у 5), энцефалопатия (у 10), шок (у 3). Летальных исходов 11 (50%).

Венозную кровь (2 мл) забирали из венозных катетеров во время плановых лечебно-диагностических процедур у пациентов, находящихся на стационарном лечении. В послеоперационном периоде у многих больных исследовались несколько образцов крови в динамике: при гладком течении послеоперационного периода — на 3-и и 6-е сутки после операции, при осложненном — индивидуальный мониторинг осуществляли и в более поздние сроки. Общее число исследованных образцов крови более 250. В качестве контрольной группы обследовали добровольцев — здоровых сотрудников научно-исследовательских учреждений, венозная кровь собиралась путем венепункции. После центрифугирования (3000 об/мин, 15 мин) образцы сыворотки крови подвергались замораживанию и хранились при -20°C для последующей пробоподготовки и ГХ-МС-анализа.

Таблица 2

**Результаты определения 10 фенольных метаболитов в сыворотке крови здоровых людей методом ГХ-МС (группа 1 — норма, *n* = 16), нг/мл**

Концентрация ФМ, нг/мл	Медиана	25%	75%
Бензойная кислота	79	77	88
<i>n</i> -Гидроксibenзойная кислота	7	4	17
Фенилукусная кислота	52	39	75
<i>n</i> -Гидроксифенилукусная кислота	72	62	93
2-Гидроксифенилукусная кислота	7	0	17
Фенилпропионовая кислота	35	20	54
<i>n</i> -Гидроксифенилпропионовая кислота	0	0	3
Фенилмолочная кислота	47	37	64
<i>n</i> -Гидроксифенилмолочная кислота	195	159	371
<i>o</i> -Гидроксифенилукусная кислота	0	0	17

Пробоподготовка включала экстракцию ФМ из сыворотки крови с последующим превращением их в летучие триметилсилильные производные. В центрифужную пробирку отбирали 200 мкл сыворотки крови, добавляли 800 мкл воды для инъекций, перемешивали, добавляли 400 нг стандарта (D<sub>5</sub>-бензойной кислоты) в виде заранее приготовленного раствора в этаноле. Раствор сыворотки подкисляли серной кислотой до pH 2,0 дважды экстрагировали диэтиловым эфиром, экстракт объединяли, упаривали при температуре 40°C. Остаток обрабатывали 20 мкл N,O-бис(триметил-силил)-трифторацетамида (БСТФА) в течение 15 мин при 80°C. К реакционной смеси добавляли 80 мкл гексана. Полученный раствор вводили в инжектор ГХ-МС-системы. Объем вводимой пробы 2 мкл.

Хромато-масс-спектрометрическое определение низкомолекулярных веществ проведено с использованием газового хроматографа Agilent Technologies 6890, оснащенного масс-спектральным детектором Agilent Technologies 5973, в режиме полного сканирования. Хроматографическое разделение компонентов осуществлялось на кварцевой капиллярной колонке HP-5MS диаметром 0,2 мм, длиной 25 м и толщиной слоя 0,33 мкм. Газ-носитель — гелий, скорость потока — 24 мл/мин, скорость потока через колонку — 1,2 мл/мин. Температурный режим во время анализа: температура испарителя 280°C, начальная температура термостабильности колонки 80°C, время выдержки 4 мин, далее нагрев до 240°C со скоростью 7° в 1 мин, до 320°C со скоростью 15° в 1 мин, затем термостатирование при 320°C до окончания анализа: общее время анализа 35 мин, время задержки работы детектора 4 мин. Список определяемых соединений, время удерживания и характерные ионы в масс-спектрах приведены в табл. 1.

Количество определяемого соединения оценивали сравнением площади его пика с площадью пика для известного количества (400 нг) стандартного соединения — ТМС-производного D<sub>5</sub>-бензойной кислоты (время удерживания 10,45 мин) с учетом их молекулярных масс. Содержание ФМ в образцах оценивали как среднее значение в дублированных пробах.

Массовую концентрацию (в нг/мл) фенилсодержащих кислот вычисляли методом внутреннего стандарта по формуле

$$c_i = \frac{S_i \cdot M_{r_i} \cdot m_{st} \cdot I_{max}}{S_{st} \cdot M_{r_{st}} \cdot V_s \cdot I_i}$$

где  $c_i$  — концентрация *i*-го компонента (в нг/мл),  $S_i$  — площадь пика *i*-го компонента, определенная по основному иону (m/z),  $M_{r_i}$  — молекулярная масса *i*-го компонента,  $m_{st}$  — масса вводимого стандарта (400 нг),  $I_{max}$  — высота пика самого интенсивного иона (m/z) в масс-спектре ТМС-производного *i*-го компонента (999),  $S_{st}$  — площадь пика стандарта,  $M_{r_{st}}$  — молекулярная масса стандарта (127),  $V_s$  — объем образца (0,2 мл),  $I_i$  — относительная интенсивность (высота) пика основного иона (m/z) в масс-спектре ТМС-производного *i*-го компонента. Масс-спектральные данные

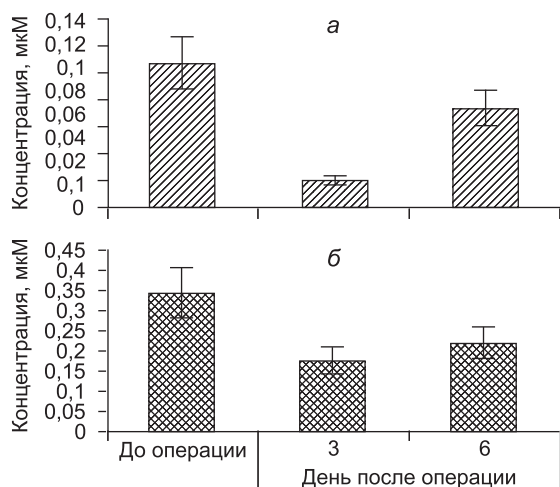


Рис. 1. Динамика уровня фенилпропионовой (а) и фенилуксусной (б) кислот в группе больных с гладким течением послеоперационного периода: снижение в первые дни с тенденцией к восстановлению исходного уровня.

(*m/z* и относительные интенсивности пиков) взяты из международной базы данных масс спектров NIST-02.

Для оценки различий между малыми независимыми группами применяли непараметрический метод *U*-критерий Манна—Уитни [2]. В таблицах представлены результаты для каждой группы в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й и 75-й квартиль). Достоверность различий между одноименными показателями определяли при попарном сравнении разных групп с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0 для Windows.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Результаты определения уровня 10 ФМ в сыворотке крови здоровых людей (группа 1 — норма) приведенным выше методом (в нг/мл) представлены в табл. 2. В ходе исследования было показано, что *n*-гидроксифенилпропионовая кислота, 3,4-дигидроксibenзойная кислота, *m*-гидроксифенилуксусная кислота, *o*-гидроксифенилуксусная кислота встречались редко либо вообще отсутствовали в исследуемых пробах. Две другие (*n*-гидроксибензойная, 2,4-дигидроксibenзойная кислота) обнаруживались в очень низких концентрациях, граничащих с пределом обнаружения, поэтому в дальнейшем ряд ФМ исключены из анализа. Циннамовая и гидроксициннамовая кислоты также не обнаруживались в исследуемых пробах, что можно объяснить нестабильностью этих ФМ, имеющих двойные связи, в кислой среде.

Таким образом, дальнейший анализ по группам проведен по следующим фенольным кислотам: бензойная (БК), 3-фенилпропионовая (ФПК), фенилуксусная (ФУК), 3-фенилмолочная (ФМК), *n*-гидроксифенилмолочная (ГФМК). Эти 6 фенольных кислот можно назвать ключевыми ФМ. Для сопоставимости количественного содержания искомым соединений первичный расчет при ГХ-МС-анализе осуществляли в нг/мл, а затем переводили в мкмоль/л (мкМ) с учетом молекулярной массы искомым соединений, а именно:

Название ФМ	Молекулярная масса, г/моль
Бензойная кислота	122
Фенилуксусная кислота	136
<i>n</i> -Гидроксифенилуксусная кислота	152
Фенилпропионовая кислота	150
<i>n</i> -Гидроксифенилпропионовая кислота	166
3-Фенилмолочная кислота	166
<i>n</i> -Гидроксифенилмолочная кислота	182

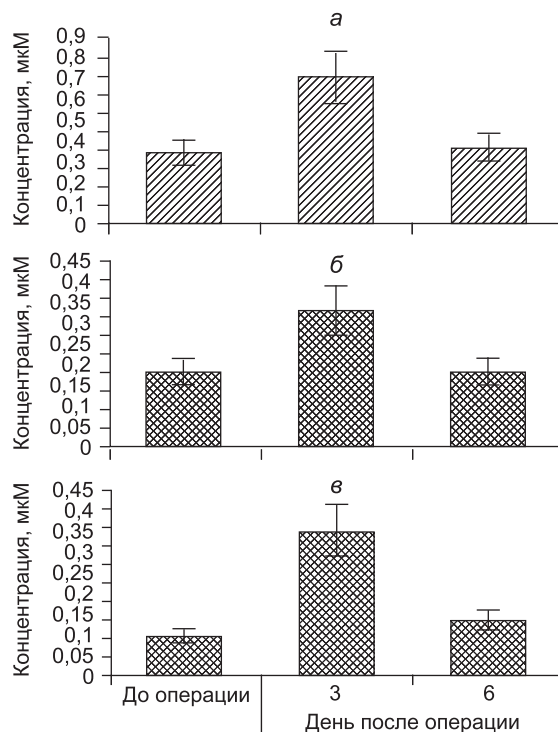


Рис. 2. Динамика уровня фенилмолочной (а), *n*-гидроксифенилмолочной (б) и *n*-гидроксифенилуксусной (в) кислот в группе больных с гладким течением послеоперационного периода: повышение в первые дни с тенденцией к нормализации к 6-му дню после операции.

В сводной табл. 3. представлены результаты исследования уровня ФМ по всем группам больных (1—6).

В группе 2 у больных с кардиохирургической патологией (до операции) по сравнению со здоровыми людьми (группа 1) снижен уровень ФПК ( $p = 0,001$ ) и повышен уровень ГФУК ( $p = 0,04$ ).

При неосложненном (гладком) течении послеоперационного периода (группа 3) приведены индивидуальные данные о динамике ФМ, что позволило оценить влияние операционного стресса. Выявлены определенные закономерности в изменении уровня ФМ под влиянием комплекса неблагоприятных факторов, связанных с кардиохирургической операцией в условиях искусственного кровообращения (табл. 4). Так, на 3-и сутки после операции зарегистрировано снижение уровней ФПК и ФУК более чем в 5 ( $p = 0,05$ ) и 2 ( $p = 0,01$ ) раза соответственно (рис. 1), а уровни ФМ, ГФМК и ГФУК, напротив, повышались более чем в 2 раза ( $p = 0,008$ ,  $p = 0,022$ ,  $p = 0,002$  соответственно, рис. 2). При отсутствии осложнений уже к 6-м суткам после операции отмечалась четкая тенденция к восстановлению исходного уровня всех ФМ (для ФПК  $p = 0,03$ , ФМК  $p = 0,009$ , ГФМК  $p = 0,01$ , для ФПК и ГФУК недостоверно) (см. рис. 2).

При осложненном течении послеоперационного периода (группы 4, 5 и 6) нормализации уровня ФМ после 3-х суток не происходило. Так, ФПК определялась менее чем у половины больных на крайне низких уровнях вплоть до полного исчезновения при сепсисе (группа 6). У всех больных с осложнениями отмечалась тенденция к накоплению в крови общего количества ФМ. Максимальный вклад в суммарное количество ФМ вносят ГФУК и ГФМК, что отражено на рис. 3.

Различия в уровнях ФМ в зависимости от характера осложнений (рис. 4): данные об уровне ФМ при развитии осложнений, не связанных с инфекцией (группа 4), приведены в сравнении с локальными инфекционными осложнениями (группа 5 — пневмония). Следует подчеркнуть, что больные в группа 4 и 5 сопоставимы по основной патологии и тяжести состояния на момент обследования в ОРИТ и принципиально различались лишь по факту наличия или отсутствия инфекции.

В группе 6 (больные сепсисом) общее количество ФМ достигало максимальных значений, в среднем превышая 25 мкМ. Несмотря на небольшое число наблюдений, при сравнительном анализе уровня ФМ у выживших и 11 умерших больных сепсисом выявлены достоверные различия для ГФМК ( $p = 0,001$ ) и ФМК ( $p = 0,04$ ) (рис. 5).

## Сводная таблица данных

А) содержание ФМ в сыворотке крови в группах (медиана, М и интерквартильные размахи 25% и 75%), мкМ

Концентрация ФМ, мкМ	Группа																	
	1 добровольцы (n = 16)			2 больные до операции (n = 36)			3 гладкое течение (n = 11)			4 неинфекционные осложнения (n = 8)			5 пневмония (n = 20)			6 сепсис (n = 22)		
	М	25%	75%	М	25%	75%	М	25%	75%	М	25%	75%	М	25%	75%	М	25%	75%
Бензойная кислота	0,7	0,6	0,8	0,4	0,2	0,5	0,6	0,5	0,9	3,1	1,6	3,9	1,1	0,7	1,7	0,9	0,8	2,0
Фенилуксусная кислота	0,4	0,3	0,6	0,4	0,2	0,7	0,3	0,1	0,4	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,3	0,4	0,1	0,7
n-Гидроксифенилуксусная кислота	0,5	0,4	0,6	0,7	0,3	1,4	1,0	0,6	1,8	1,8	0,9	2,6	2,8	1,8	6,5	14,1	7,8	35,9
Фенилпропионовая кислота	0,2	0,1	0,4	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Фенилмолочная кислота	0,3	0,2	0,4	0,4	0,2	0,6	0,3	0,2	0,5	1,0	0,6	1,2	0,7	0,6	1,3	2,7	1,4	5,1
n-Гидроксифенилмолочная кислота	1,1	0,9	2,0	1,4	0,7	2,1	1,4	1,1	1,6	2,9	1,3	4	1,9	1,3	3,4	7,6	2,9	15,5

Б) достоверность различий (p-коэффициент достоверности), полученная при сравнении групп по Mann—Whitney U Test

Концентрация ФМ, мкМ	Здоровые (n = 16) vs больные до операции (n = 36)		Больные до операции (n = 36) vs гладк. теч. 3 сут (n = 11)		Больные до операции (n = 36) vs пневмония (n = 20)		Больные до операции (n = 36) vs неинфекционные осложнения (n = 8)		Больные до операции (n = 36) vs сепсис (n = 22)		Неинфекционные осложнения (n = 8) vs пневмония (n = 20)		Неинфекционные осложнения (n = 8) vs сепсис (n = 22)		Пневмония (n = 20) vs сепсис (n = 22)	
	№ 1 vs № 2	№ 2 vs № 3 — 3 сут	№ 2 vs № 3 — 3 сут	№ 2 vs № 3 — 6 сут	№ 2 vs № 5	№ 2 vs № 4	№ 2 vs № 6	№ 4 vs № 5	№ 4 vs № 6	№ 4 vs № 5	№ 4 vs № 6	№ 5 vs № 6				
Бензойная кислота	0,84	0,15	0,58	0,000024	0,00084	0,000007	0,010999	0,014741	0,820689							
Фенилуксусная кислота	0,87	0,01	0,1	0,002768	0,006	0,923401	0,575888	0,02438	0,017317							
n-Гидроксифенилуксусная кислота	0,04	0,002	0,1	0,000253	0,17	0	0,177772	0,000869	0,000077							
Фенилпропионовая кислота	0,001	0,051	0,03	0,031197	0,43	0,008999	0,387297	0,260357	0,579542							
Фенилмолочная кислота	0,37	0,008	0,009	0,000352	0,019	0	0,918987	0,007514	0,000261							
n-Гидроксифенилмолочная кислота	0,66	0,022	0,01	0,020975	0,056	0	0,647173	0,012934	0,00056							

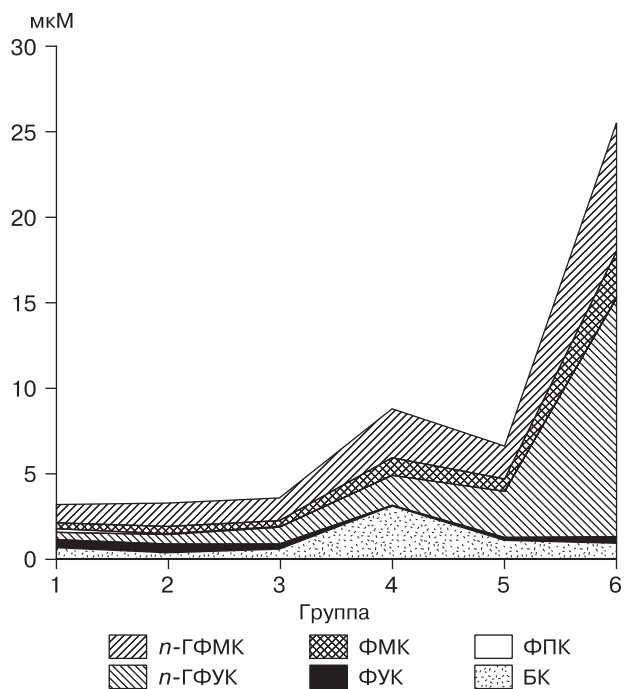


Рис. 3. Вклад каждого ФМ в суммарное количество фенольных кислот в сыворотке крови обследованных здоровых и больных людей в зависимости от группы, медианы, мкМ.

Обсуждая вопрос о происхождении ФМ в сыворотке крови обследованных нами больных, в пользу концепции о преимущественно микробном пути их образования из ароматических аминокислот [9] свидетельствует тот факт, что никто из больных

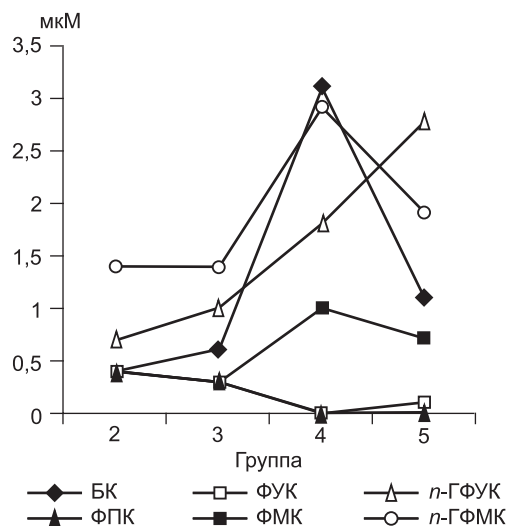


Рис. 4. Сравнение тенденций к изменению уровня ФМ при развитии осложнений, не связанных с инфекцией (группа 4), и инфекционных (группа 5 — пневмония). Медиана, мкМ.

не получал специальных продуктов питания, напитков или препаратов, целенаправленно обогащенных растительными полифенолами, поэтому наиболее вероятной причиной повышения уровня ФМ является накопление промежуточных продуктов катаболизма фенилаланина и тирозина [9]. Дополнительным аргументом в пользу этой точки зрения являются низкие уровни или отсутствие ФПК в сыворотке крови у больных с осложнениями. Так, по нашим данным, ФПК не обнаружена ни у одного больного из группы 6 "сепсис" и отсутствовала у 60% больных в группе 4 "осложнения" и группе 5 "пневмония", в то время как

Таблица 4

**Индивидуальные данные о динамике ФМ у 11 больных с гладким течением послеоперационного периода (группа 3), мкМ**

Показатель	Шифр больного с гладким течением послеоперационного периода (группа 3)										
	NX1	NX5	NX6	NX7	NX9	NX10	NX11	NX13	NX14	NX3	NX12
<b>ФПК:</b>											
до операции	0,11	0,39	0,01	0,37	0,15	0,00	0,09	0,06	0,00	0,29	0,31
3 сут п/о	0,01	0,02	0,00	0,02	0,03	0,04	0,00	0,00	0,03	0,05	0,30
6 сут п/о	0,18	0,07	0,00	0,15	0,15	0,04	0,00	0,03	0,21	0,00	0,11
<b>ФУК:</b>											
до операции	0,40	0,35	0,25	0,60	0,63	0,03	0,33	0,30	0,19	0,85	0,61
3 сут п/о	0,12	0,30	0,18	0,31	0,13	0,10	0,06	0,17	0,20	1,07	2,17
6 сут п/о	0,13	0,40	0,00	0,76	0,16	0,00	0,82	0,09	0,43	0,29	0,22
<b>ФМК:</b>											
до операции	0,27	0,18	0,36	0,72	0,35	0,16	0,34	0,31	0,89	0,39	0,43
3 сут п/о	0,69	0,72	0,51	0,51	0,25	0,31	0,78	0,75	0,81	0,78	1,67
6 сут п/о	0,21	0,26	0,35	0,55	0,25	0,28	0,37	0,45	0,61	0,55	0,74
<b>ГФМК:</b>											
до операции	0,89	1,81	1,32	1,35	3,19	1,00	3,14	1,79	3,33	1,93	3,34
3 сут п/о	2,43	4,35	3,10	3,30	2,84	1,47	5,47	3,11	3,55	3,51	10,01
6 сут п/о	1,08	1,62	1,66	1,48	2,19	1,45	2,69	1,81	2,34	2,20	4,45
<b>ГФУК:</b>											
до операции	0,49	0,57	0,96	2,05	0,94	0,56	1,42	0,86	0,99	0,77	0,94
3 сут п/о	2,16	4,68	4,31	5,27	1,17	1,37	1,37	2,08	3,51	4,72	4,46
6 сут п/о	0,64	2,05	1,49	1,71	0,48	0,85	1,92	0,73	0,89	5,82	1,33

Примечание. п/о — после операции.

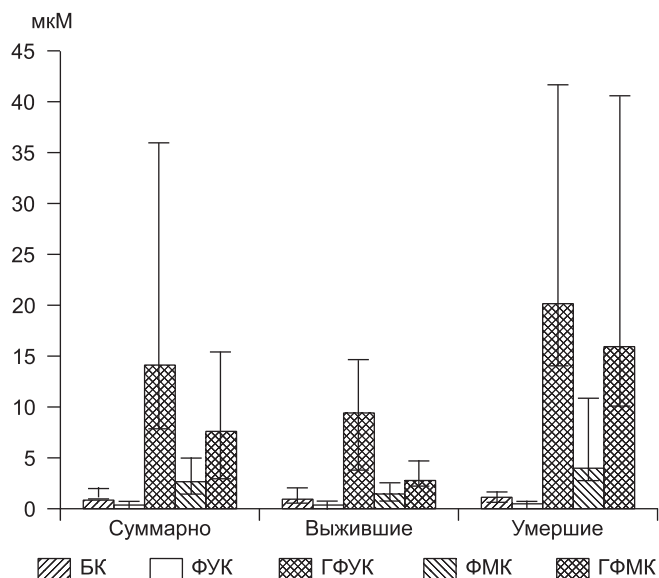


Рис. 5. Сравнение уровней фенолкарбоновых кислот между 11 выжившими и 11 умершими в группе больных сепсисом (группа 6,  $n = 22$ ). Достоверность различий между выжившими и умершими от сепсиса больными — по ФМК  $p = 0,04$ , по ГФМК  $p = 0,001$ .

ФПК и гидрокси-ФПК считаются основными конечными продуктами метаболизма растительных полифенолов [16]. Из данных литературы известно, что при деградации растительных полифенолов более характерно накопление конечных продуктов микробного метаболизма — ФПК и ФУК [9] и нет данных об образовании ФМК и ГФМК, в то время как у обследованных нами тяжелых больных зарегистрировано накопление промежуточных или вторичных метаболитов ароматических аминокислот с потенциально токсичными свойствами, что указывает на преимущественно микробную деградацию фенилаланина и тирозина в организме этих больных.

Обращает внимание разнонаправленность в поведении негидроксилированных фенолкарбоновых кислот — метаболитов фенилаланина (ФМК и ФУК) по сравнению с гидроксилированными метаболитами тирозина (ГФМК и ГФУК) в ответ на воздействие комплекса стрессовых факторов, связанных с хирургической операцией (см табл. 4, рис. 1 и 2). Кратковременное снижение ФПК и ФУК в сыворотке крови может просто отражать их перераспределение в организме, но, с другой стороны, может указывать на их повышенное потребление в условиях стресса. В пользу такой интерпретации данных свидетельствует явная тенденция к быстрому восстановлению исходного уровня ФПК и ФУК в группе с адекватным ответом на хирургическую травму (группа 2, гладкое течение), т. е. в условиях восстановления гомеостаза.

Суммарное количество ФМ при осложненном течении послеоперационного периода нарастало и достигало максимальных значений у умерших больных сепсисом 40 мкМ. В то же время эти концентрации существенно ниже тех токсических концентраций фенолов, которые указывают авторы, изучающие неблагоприятные эффекты фенолов в экспериментах [22—24]. Остается открытым вопрос, играют ли ФМ в организме септических больных непосредственную роль в танатогенезе или являются лишь косвенными свидетелями (маркерами) несовместимых с жизнью метаболических нарушений.

Выявлены достоверные различия в уровнях ФМ при осложнениях, не связанных с инфекцией (группа 3) при сравнении с инфекционными осложнениями (группа 4). Важно отметить, что исходная тяжесть состояния, объем операций и условия послеоперационного периода у больных обеих групп были сопоставимы, все они на момент обследования находились в ОРИТ на ИВЛ, многие с клиникой энцефалопатии, СПОН и др. Общим для всех больных с осложнениями было снижение ФПК и повышение БК. Интересно, что в группе больных, которые не имели инфекционного диагноза (группа 3), имелись наиболее высокие уровни БК, достоверно ( $p = 0,001$ ) отличающиеся от всех других групп, при относительной стабильности других показателей. А генерализация

инфекции (сепсиса) всегда коррелировала с максимально высокими уровнями ГФМК, ФМК и ГФУК одновременно.

По мере утяжеления состояния больных (от группы 2 к группе 6) отмечается тенденция к накоплению гидроксилированных ФМ (см. рис. 3), что свидетельствует о нарушениях в путях катаболизма преимущественно тирозина. Наиболее ярко эта закономерность прослеживается по динамике ГФУК и судя по результатам исследования имеет несомненную связь с прогрессированием инфекционного процесса (см. рис. 4). Так, в группе 6 "сепсис" летальный исход зарегистрирован у всех больных с уровнем ГФУК, превышающим 15 мкМ (см. рис. 5). На основании этих фактов можно "заподозрить" ГФУК в способности непосредственно участвовать в патогенетических механизмах сепсиса, причем с неблагоприятными последствиями. В то же время достоверные различия при сравнении выживших и умерших больных получены лишь для ГФМК и ФМК, а не для ГФУК (рис. 5).

При сравнении показателей ФМ в группе 6 "сепсис" с группой 2 "больные кардио" коэффициент достоверности различий достигает минимальных значений, а для ряда ФМ практически стремится к 0. Это означает, что манифестация сепсиса связана с уровнем ФМ, а именно сепсис имел место у больных при максимально высоком содержании в плазме крови ФМК, ГФМК, ГФУК и БК, на фоне отсутствия ФПК.

### Заключение

В результате проведенного исследования показано, что фенольные метаболиты постоянно присутствуют в метаболизме человека. С применением метода ГХ-МС установлены нормальные (фоновые) уровни для 6 ключевых ФМ: бензойная (БК), фенилуксусная (ФУК), фенилпропионовая (ФПК), фенилмолочная (ФМК), гидроксифенилмолочная (ГФМК) и гидроксифенилуксусная кислоты (ГФУК), в сумме не превышающие 5 мкМ. Показано, что при сепсисе суммарное содержание ФМ в сыворотке крови может возрастать до 25 мкМ, а среди больных с неблагоприятным исходом достигать 40 мкМ. Анализ полученных данных позволил выявить следующие закономерности: 1) воздействие неблагоприятных факторов (хирургический стресс, послеоперационные осложнения, инфекция) сопровождается снижением ФПК, а при сепсисе ФПК вообще не обнаруживается в крови; 2) гладкое течение послеоперационного периода характеризуется быстрым восстановлением исходного уровня ФМ, тогда как развитие осложнений сопровождается отклонениями, максимально выраженными при сепсисе; 3) преобладание гидроксилированных ФМ при сепсисе указывает на усиленную микробную деградацию ароматических аминокислот, преимущественно тирозина; 4) нельзя исключить прямое участие некоторых ФМ в танатогенезе, так как даже при небольшом числе наблюдений случаев сепсиса (22) выявлены достоверные различия при сравнении выживших и умерших больных по уровню ГФМК ( $p = 0,001$ ) и ФМК ( $p = 0,04$ ).

Таким образом, меняющийся профиль низкомолекулярных фенольных соединений в сыворотке крови человека отражает, по убеждению авторов, существование малоизученных молекулярных механизмов взаимодействия клеток и тканей организма хозяина с его микрофлорой и, вероятно, играет роль в развитии и исходе критических состояний, что требует дальнейшего изучения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Белобородова Н. В., Архипова А. С., Белобородов Д. М. и др. Хромато-масс-спектрометрическое определение низкомолекулярных соединений микробного происхождения в сыворотке крови больных сепсисом. Клини. лаб. диагн. 2006; 2: 3—6.
2. Кюзян Ж. А., Осипов Г. А., Саркисян Н. Н., Карагезян К. Г. Спектр и уровень содержания низкомолекулярных соединений микробного происхождения при периодической болезни. Вестн. РАНМ 2002; 2: 41—45.
3. Beloborodova N. V., Olenin A. Yu., Khodakova A. S. Phenylcarboxylic acids as potential markers for diagnosis of sepsis in cardiac surgery patients. Archive Euromedica 2011; 1—2: 20—26 <http://www.eanw.de/daten/arihiv-medica-1-2-2011-web.pdf>.
4. Beloborodova N. V., Khodakova A. S., Olenin A. Yu. Are phenylcarboxylic acids really markers in severe sepsis? Crit. Care 2009; 13 (4): 41.
5. Белобородова Н. В., Оленин А. Ю., Ходакова А. С. Способ лабораторной диагностики сепсиса. Пат. № 2423704 от 10.07.2011.
6. Beloborodova N. V., Khodakova A. S., Olenin A. Y., Ovseenko S. T. Phenylcarboxylic acids in blood as new markers for sepsis diagnostics. Intensive Care Med. 2009; 35 (1, Suppl. 84): 0315.

7. Jenner A. M., Rafter J., Halliwell B. Human faecal water content of phenolics: The extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38: 763—772.
8. Mayrand D., Bourgeau G. Production of phenylacetic acid by anaerobes. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 16: 747—750.
9. Beloborodova N. V., Khodakova A. S., Bairamov I. T., Olenin A. Yu. Microbial origin of phenylcarboxylic acids in the human body. *Biochemistry* 2009; 74 (12): 1350001355.
10. Белобородова Н. В., Байрамов И. Т., Оленин А. Ю., Федотчева Н. И. Экзометаболиты некоторых анаэробных микроорганизмов микрофлоры человека. *Биомед. химия* 2011; 57 (1): 95—105.
11. Wishart D. S., Knoch C., Guo A. C. et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acid. Res.* 2009; 37: D603—D610.
12. Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 2000; 130: 2037S—2085S.
13. Rechner A. R., Smith M. A., Kuhnle G. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36 (2): 212—225.
14. Rios L. Y., Gonthier M., Remesy C. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77: 912—918.
15. Luceri C., Caderni G., Sanna A., Dolara P. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase 2, inducible nitric-oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. *J. Nutr.* 2002; 132: 1376—1379.
16. Deprez S., Brezillon C., Rabot S. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J. Nutr.* 2000; 130: 2733—2738.
17. Renwick A. G. Gut bacteria and the metabolism of aromatic amino acids. In: Hill M. J., ed. *Microbial metabolism in the digestive tract*. New York: Academic Press; 1986: 108—119.
18. Gonthier M., Cheynier V., Donovan J. L. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.* 2003; 133: 461—467.
19. Diaz E., Ferrandez A., Prieto M. A. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.* 2001; 65 (4): 523—569.
20. Youdim K. A., Shukitt-Hale B., MacKinnon S. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1523 (13): 117—122.
21. Karlsson P. C., Huss U., Jenner et al. Human fecal water inhibits COX-2 in colonic HT-29 cells: role of phenolic compounds. *J. Nutr.* 2005; 135: 2343—2349.
22. Fedotcheva N. I., Kazakova R. E., Kondrashova M. N., Beloborodova N. V. Toxic effects of microbial phenolic acids on the functions of mitochondria. *Toxicol. Lett.* 2008; 180: 182—188.
23. Федотчева Н. И., Теплова В. В., Белобородова Н. В. Участие фенольных кислот микробного происхождения в дисфункции митохондрий при сепсисе. *Биол. мембраны* 2010; 27 (1): 60—66.
24. Теплова В. В., Федотчева Н. И., Белобородова Н. В. Роль циннамовой и бензойных кислот в дисфункции митохондрий при сепсисе. В кн.: *Рецепция и внутриклеточная сигнализация*. Пушино; 2009. 628—634.
25. Истратов В. Г., Кулешов С. С., Макарова А. В. Хромато-масс-спектрометрическое исследование токсических метаболитов анаэробов при неклостридиальной анаэробной инфекции. В кн.: *Раны и раневая инфекция*. М.; 1988. 223—224.
26. Белобородова Н. В., Осипов Г. А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с организмом хозяина. *Вестн. РАМН* 1999; 7: 25—31.
27. Beloborodova N. V., Osipov G. A. Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship. *Microb. Ecol. Hlth. Dis.* 2000; 12: 12—21.
28. Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644—1655.
29. Dellinger R. P., Carlet J. M., Masur H. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 2004; 32 (3): 858—873.

Поступила 12.04.12

## ТЕРАПИЯ БОЛЕВЫХ СИНДРОМОВ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.857-085

Н. Е. Щербакова, Л. А. Медведева, О. И. Загорулько, А. В. Гнездилов

### ЛЕЧЕНИЕ ГОЛОВНЫХ БОЛЕЙ НАПРЯЖЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЛЕЧЕБНЫХ БЛОКАД И МЕТОДОВ РЕФЛЕКТОРНОГО ОБЕЗБОЛИВАНИЯ

ФГБУ РНЦХ им. акад. Б. В. Петровского РАМН; Отделение терапии болевых синдромов, Москва

*Проведена оценка эффективности инвазивных методик: лечебных блокад затылочного нерва и введение препаратов в триггерные точки цервикокраниальной области (0,5% раствор маркаина с добавлением 0,5—1 мл дексана) и иглорефлексотерапии у пациентов с головными болями напряжения. 138 больных были разделены на 2 сравнимые группы по 69 больных в каждой. Пациенты 1-й группы получали общепринятую медикаментозную терапию (селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, центральные миорелаксанты). Во 2-й группе дополнительно использовали описанные инвазивные методики. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности предложенных инвазивных методик в комплексной терапии головных болей напряжения.*

**Ключевые слова:** головная боль напряжения, антидепрессанты, миорелаксанты, лечебные блокады, иглорефлексо-терапия

### TENSION HEADACHES TREATMENT WITH THE USE OF THERAPEUTIC BLOCKADE AND METHODS REFLEX ANAESTHESIA

Sherbakova N.E., Medvedeva L.A., Zagorulko O.I., Gnezdilov A.V.

*Efficacy of invasive procedures was estimated: therapeutic blockade of n.occipitalis and injection of 0.5% Sol. Marcaini +0.5-1 ml Dexasoni in trigger and acupuncture points in patients with tension headaches. 138 patients were divided into*