

А.А.Шульдяков, О.Б.Лиско, В.И.Еремин

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДОВ И ИЗОФЕРМЕНТОВ АМИНОТРАНСФЕРАЗ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМАХ ДИФТЕРИИ

Саратовский государственный медицинский университет

Проведено клинико-лабораторное обследование 58 больных с тяжелыми формами дифтерии, включающее комплексное исследование показателей гликопротеидов и изоферментного спектра аминотрансфераз, повышающее качество диагностики дифтерийной инфекции. Установлено, что в развитии патологического процесса при дифтерийной инфекции значительную роль играют нарушения метаболизма соединительной ткани, а изоферментный спектр аминотрансфераз характеризуется выраженным дисбалансом с преимущественным увеличением митохондриальных изоферментов. Степень выявленных изменений четко коррелирует с тяжестью болезни, а патологические сдвиги при токсических формах заболевания сохраняются после окончания острой фазы заболевания в периоде осложнений дифтерии.

На современном этапе особенностями дифтерии является преобладание варианта «gravis» дифтерийной палочки, высокий процент детского контингента среди заболевших, высокая летальность и заболеваемость среди социально неблагополучных слоев населения, относительный рост тяжелых случаев заболевания с сохранением отдельных клинических проявлений болезни в анамнезе, рост бактерионосительства среди населения [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11]. Достигнутые за последние годы научные успехи позволили на качественно новом уровне подойти к решению многочисленных вопросов, связанных с проблемами эпидемиологии, патогенеза, клиники, лечения и профилактики дифтерийной инфекции [3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12]. Вместе с тем некоторые разделы патогенеза дифтерийной инфекции исследованы недостаточно. К настоящему времени не вызывает сомнений роль дисбаланса гликопротеидов в развитии патологического процесса при инфекционных заболеваниях [13, 15]. Однако при дифтерии практически не изучались такие важнейшие параметры обмена гликопротеидов, как гексозы, фукоза, сиаловые кислоты, не определена их роль как критериев диагностики и оценки тяжести состояния пациента. Необходимость и целесообразность динамического мониторинга за такими ключевыми параметрами гомеостаза, как показатели аминотрансфераз крови, в настоящее время не вызывает сомнений [9, 13, 15]. В то же время уровень изоферментов, который позволяет в большинстве случаев на качественно более высоком уровне подойти к вопросам диагностики и прогнозирования течения болезни, при дифтерии практически не исследован.

Таким образом, комплексное исследование, целью которого явилось повышение качества диагностики и прогнозирования течения дифтерийной инфекции на основании изучения баланса гликопротеидов, изоферментов аминотрансфераз, является актуальным и своевременным.

Материалы и методы исследования

Обследовано 58 взрослых пациентов с тяжелой дифтерией ротоглотки, из них с субтоксической формой, токсической 1-й степени, токсической 2-й степени – по 15 чел. и токсической 3-й степени – 13 чел. Средний возраст пациентов – (40,8±3,9) лет: мужчин – 28 чел. (48,3 %), женщин – 30 (51,7 %).

Больные обращались в стационар на 2–5-е сутки (3,4±1,3) от начала заболевания. Из исследования исключались пациенты с другими формами дифтерии, хроническим алкоголизмом, сопутствующими заболеваниями в фазе обострения. Фоновые состояния и сопутствующие заболевания регистрировались в 32,7 % случаев и существенного влияния на тяжесть и течение дифтерийного процесса не оказывали. Большинство обследованных поступило в осенне-зимне-весенний период. Диагноз дифтерия устанавливался на основании эпидемиологических данных, жалоб, анамнеза заболевания, характерной клинической картины в соответствии с действующей классификацией дифтерии [17] и подтверждался при бактериологическом обследовании в 84,5 % случаев. У всех пациентов выделялся токсигенный вариант *gravis* дифтерийной палочки *Corinebacterium diphtheriae*.

При постановке диагноза, оценке тяжести, характера осложнений дифтерии, сопутствующей патологии, учитывались общепринятые критерии [17], результаты лабораторных (общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимическое исследование крови и др.) и инструментальных методов обследования (ЭКГ, кардиоинтервалография, доплер-ЭхоКГ, УЗИ органов брюшной полости, рентгенография и др.). Помимо вышеперечисленных методов обследования, всем больным в динамике проводилось исследование отдельных показателей, характеризующих метаболизм соединительной ткани: определение суммарного количества гликопротеидов по концентрации общих гексоз в крови (D.Handel, W.Kitlak в модификации Ю.П.Федянина и Е.П.Ляпиной), концентрация общих гексоз и белковосвязанных гексоз в моче (D.Handel, W.Kitlak в модификации С.И.Вайстуха). Фукогликопротеиды измеряли по общей фукозе в крови (Z.Dische, L.Shettles в модификации Ю.П.Федянина и Е.П.Ляпиной). Исследовались также белковосвязанная и общая фукоза в моче (D.Handel, W.Kitlak в модификации С.И.Вайстуха). Сиалогликопротеиды в крови оценивались по сиаловым кислотам (E.L.Hess et al.). Также определялись митохондриальные изоферменты АлАТ, АсАТ и ГГТ (мАлАТ, мАсАТ и мГГТ) в сыворотке крови. Все вышеуказанные методики представлены в руководствах по лабораторной диагностике и в монографиях [9, 13].

Результаты и обсуждение

Анализ клинической картины, проведенный у 58 больных с тяжелыми формами дифтерии ротоглотки, позволил констатировать, что на современном этапе это хорошо изученное и давно известное инфекционное заболевание сохраняет свои основные клинические признаки, которые позволяют диагностировать данную патологию и проводить дифференциальный диагноз.

При оценке отдельных показателей, отражающих метаболизм соединительной ткани, установлено, что уровень сиаловых кислот повышается при дифтерийной инфекции в диапазоне от 1,4 при субтоксической форме до 2,1 раз при токсической 3-й степени с сильной достоверной корреляцией в зависимости от тяжести заболевания (табл. 1). Быстрота восстановления сдвигов в тесте также четко зависела от тяжести болезни, и если при субтоксической форме нормализация показателей наблюдались уже к 9–10-му дню, то токсические формы дифтерии 2-й и 3-й степени характеризовались сохранением достоверных отличий даже через две недели от момента госпитализации.

Уровень гексоз в крови у больных с токсическими формами дифтерии четко коррелировал с тяжестью патологии, а увеличение показателя было в пределах 1,6–2,3 раза, с крайними показателями соответственно при субтоксических и токсических 3-й степени формах болезни (табл. 1). В динамике наблюдения нормализация теста происходила при субтоксических формах болезни уже к 9–10-му дню, в то время как в более тяжелых случаях нарушения состояния сохранялись и на 9–10, 14–15-й день пребывания больных в стационаре.

Увеличение показателей концентрации фукозы в крови пациентов с дифтерией при поступлении в стационар находилось в сильной прямой существенной ($p < 0,05$) корреляционной связи с тяжестью заболевания, а уровень сдвигов был в пределах от 20 % при субтоксической форме до 50 % при токсической 3-й степени (табл. 1). Повышенными оставались показатели у больных с токсическими формами 2-й и 3-й степени до 9–10 и 14–15-го дня от момента госпитализации.

Анализируя полученные данные, важно отметить, что у больных с дифтерией, наряду с наличием характерного специфического воспаления на месте внедрения возбудителя, всосавшийся в кровоток дифтерийный экзотоксин вызывает каскад патологических реакций практически во всех звеньях го-

меостаза, самоподдерживающихся и самоускоряющихся, вызывающих функциональные и структурные изменения во многих органах и тканях [3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 14]. Поэтому четко трактовать механизмы выявленных нарушений метаболизма соединительной ткани сложно, с учетом поражения при токсических формах дифтерии печени как основного органа, в котором осуществляется синтез гликопротеидов [13]. Вместе с тем значение установленных сдвигов для объективизации диагностики и оценки тяжести пациента с дифтерией несомненно.

Общие гексозы в моче у больных достоверно увеличивались на фоне симптомов интоксикации и активного процесса в ротоглотке (табл. 1). Выраженность изменений прямо коррелировала с тяжестью заболевания (увеличение от 1,5 раз при субтоксических формах до 2,1 раз при токсических 3-й степени), и если при субтоксических формах нормализация показателей наступала уже к 9–10-му дню болезни, то токсические формы 2-й и 3-й степени сопровождалась пролонгированными сдвигами на фоне развивающихся осложнений дифтерии. Важно отметить, что при общей направленности степень нарушений экскреции связанных с белком гексоз была существенно выше, чем общих гексоз (табл. 1).

Содержание фукозы в моче в острый период заболевания повышалось в 1,4 раза при субтоксических формах и в 2 раза при токсических 3-й степени (достоверно коррелировало с тяжестью заболевания). Связанная с белком фукоза увеличивалась несколько больше: в 2,1 и 3,1 раза соответственно (табл. 1). В динамике развития болезни сохранение отклонений в тестах у больных токсическими формами дифтерии в периоде осложнений свидетельствовало о сложном, многокомпонентном характере патологических сдвигов при тяжелой дифтерии, даже по завершению острого периода болезни. Выявленные изменения и дисбаланс маркеров обмена гликопротеидов в моче в определенной степени отражают нарушения метаболизма соединительной ткани на уровне целостного организма, однако развивающееся у больного дифтерией поражение мочевыделительной системы также, по всей видимости, играет свою роль в формировании данных сдвигов, подчеркивая важность динамической оценки показателей экскреции гексоз и фукозы.

Диагностическая ценность определения спектра изоферментов аминотрансфераз к настоящему времени не вызывает сомнений [9, 13, 15]. При исследовании активности АЛАТ, АсАТ, ГГТ у больных токсическими формами дифтерии нами уста-

Таблица 1

Показатели концентрации маркеров гликопротеидов в крови и моче у больных тяжелой дифтерией при поступлении в стационар ($M \pm m$)

Показатели	Группа	Здоровые, n=20	Субтоксические, n=15	Токсические 1-я степень, n=15	Токсические 2-я степень, n=15	Токсические 3-я степень, n=13
Гексозы, г/л		1,21±0,02	1,96±0,13*	2,27±0,14*	2,4±0,15*	2,74±0,18*
Фукоза, г/л		0,076±0,002	0,091±0,005*	0,108±0,009*	0,111±0,008*	0,11±0,008*
Сиаловые кислоты, ммоль/л		1,55±0,05	2,22±0,15*	2,49±0,14*	2,52±0,13*	3,19±0,20*
Гексозы в моче, г/л						
Общие		1,621±0,107	1,905±0,117*	1,871±0,164*	2,239±0,159*	1,053±0,048
Связанные с белком		0,205±0,0141	0,245±0,015*	0,245±0,022*	0,297±0,021*	0,091±0,0045
Фукоза в моче, г/л						
Общая		0,142±0,0083	0,170±0,011*	0,171±0,015*	0,206±0,0085*	0,102±0,004
Связанная с белком		0,0184±0,0011	0,023±0,0015*	0,023±0,0020*	0,028±0,0020*	0,0089±0,0004

Примечание: Здесь и в табл. 2: * – различия достоверны ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля.

Показатели активности ферментов у больных тяжелой дифтерией при поступлении в стационар (М±m)

Таблица 2

Показатели	Группа	Здоровые, n=20	Субтоксические, n=15	Токсические 1-я степень, n=15	Токсические 2-я степень, n=15	Токсические 3-я степень, n=13
АлАТ, МЕ/л						
Суммарные		16,09±0,70	31±2,35*	36,47±2,75*	44,77±3,70*	65,53±4,33*
Митохондриальные		4,46±0,18	12,70±1,12*	14,40±1,29*	18,20±1,55*	27,32±2,36*
АсАТ, МЕ/л						
Суммарные		22,46±0,87	45,84±4,28*	56,97±5,53*	74,84±7,39*	93,66±8,52*
Митохондриальные		8,13±0,31	25,85±2,70*	33,31±2,59*	48,70±5,50*	56,36±6,97*
ГГТ, МЕ/л						
Суммарные		18,26±0,79	36,36±3,22*	43,39±3,85*	52,61±3,81*	76,27±5,55*
Митохондриальные		5,69±0,24	12,71±1,12*	15,59±1,38*	20,53±1,76*	30,22±2,50*

новлено, что в зависимости от тяжести патологии (от субтоксических до токсических 3-й степени форм) показатели ферментов увеличивались в диапазоне 1,9–4,0; 2,0–4,2 и 2,0–4,2 раз соответственно. Необходимо отметить, что существенных различий в степени увеличения различных ферментов в острый период болезни не выявлено (табл. 2), что, по всей видимости, служит отражением полиорганный характера патологии при дифтерийной инфекции, особенно в ее тяжелых формах. Корреляционный анализ выявил прямые сильной степени достоверные связи между увеличением активности аминотрансфераз и тяжестью заболевания. В динамике процесса нормализации показателей активности АлАТ, АсАТ, ГГТ происходила у больных с субтоксическими и токсическими формами 1-й степени к 9–10-му дню болезни, в то время как у больных с токсическими формами 2-й и 3-й степени на фоне развивающихся осложнений дифтерии активность ферментов оставалась повышенной. При оценке активности митохондриальных изоферментов АлАТ, АсАТ, ГГТ выявлено, что степень их увеличения была на 10–50 % выше, чем суммарной активности этих ферментов (табл. 2). Причем в динамике заболевания восстановление активности мАсАТ несколько отставало от нормализации мАлАТ и мГГТ, что, наиболее вероятно, свидетельствует о пролонгированном характере цитолитических процессов в мышечных клетках, в том числе миокарда. Существенно большие сдвиги в спектре митохондриальных изоферментов в сравнении с суммарной активностью аминотрансфераз служат косвенным подтверждением имеющихся в литературных источниках указаний на то, что митохондрии являются одной из ключевых точек в прямом и/или опосредованном влиянии дифтерийного токсина на клетки [10, 18], а также, несомненно, подчеркивают значимость определения этих показателей для динамического наблюдения за больными с дифтерией.

Осуществленный статистический анализ отношений между показателями обмена гликопротеидов и спектра изоферментов аминотрансфераз позволил установить, что по всем параметрам прослеживаются достоверные прямые средней и сильной степени корреляции, отражающие взаимосвязи между развивающимися при дифтерии патологическими процессами в соединительной ткани и структурной целостностью мембран клеток организма.

Выводы

1. При токсических формах дифтерии в развитии патологического процесса значительную роль играют нарушения метаболизма соединительной

ткани, нашедшие свое отражение в показателях обмена гликопротеидов крови и мочи. Степень выявленных изменений четко коррелирует с тяжестью болезни, а патологические сдвиги сохраняются после окончания острой фазы заболевания в периоде осложнений.

2. У больных с тяжелыми формами дифтерии ротоглотки изоферментный спектр аминотрансфераз характеризуется выраженным дисбалансом с преимущественным увеличением митохондриальных изоферментов, четкой прямой корреляцией нарушений в зависимости от тяжести заболевания и пролонгированным до периода осложнений характером патологических сдвигов.

3. Показатели активности изоферментов аминотрансфераз, наряду с параметрами обмена гликопротеидов в крови и моче, позволяют объективно оценить тяжесть больного с дифтерийной инфекцией и прогнозировать развитие осложнений заболевания и их тяжесть.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко А.Л., Тихомолова Е.Г., Тихомолова Е.П. и др. // Эпидемиол. и инф. бол. – 2000. – № 2. – С. 27–29. – 2. Демикова Е.В. // Там же. – С. 22–25. – 3. Зрячкин Н.И. Дифтерия: клиничко-эпидемиологические особенности современного течения, патогенез и обоснование рациональной гормонотерапии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саратов, 2000. – 37 с. – 4. Иванова В.В., Курбатова Г.П., Швалко А.Д. и др. // Детские инфекции: Сб. науч. тр., посв. 70-летию НИИ детских инф. – СПб, 1997. – Вып. V. – С. 46–51. – 5. Иванова В.В., Швалко А.Д., Сиземов А.Н. и др. // Рос. вестник перинатологии и педиатрии. – 1996. – № 1. – С. 25–30. – 6. Краснов В.В. Современное течение дифтерии и ее осложнений у детей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Н-Новгород, 2001. – 52 с. – 7. Максимова Н.М., Маркина С.С., Чистякова Г.Г. и др. // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2004. – № 4 (17). – С. 28–31. – 8. Малюгина Т.Н., Шульдяков А.А., Мягкова М.А. и др. // Инф. бол. – 2004. – Т. 2, № 1. – С. 51–54. – 9. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М.: Медицина, 2002. – 544 с. – 10. Ниселовская Л.И. Влияние введения дифтерийного токсина на процессы окислительного фосфорилирования. Фосфорилирование и функция. – Л., 1960. – С. 363–368. – 11. Родионова О.В., Иванова В.В., Аксенов О.А. и др. // Детские инфекции: Сб. науч. тр., посв. 70-летию НИИ детских инф. – СПб, 1997. – Вып. V. – С. 52–56. – 12. Сундуков А.В., Ющук Н.Д. // Эпидемиол. и инф. бол. – 2003. – № 6. – С. 36–39. – 13. Федянин Ю.П. Гликопротеиды при заболеваниях гепатобилиарной системы. – Саратов, 1994. – 132 с. – 14. Шульдяков А.А. Дифтерия: клиника, состояние сердечно-сосудистой системы и системы гемостаза, современные методы терапии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саратов, 1999. – 34 с. – 15. Шульдяков А.А., Дробышева О.А., Хорошун Е.В. и др. // Инфекционные болезни на рубеже XXI века: Матер. науч.-практ. конф. – М., 2000. – Ч. 1. – С. 73–75. – 16. Шульдяков А.А., Зайцева И.А., Антипова О.Н. // Эпидемиол. и инф. бол. – 1998. – № 3. – С. 35–39. – 17. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Лекции по инфекционным болезням: В 2 томах; 2-е изд., пере-

раб. и доп. – М.: ВУНМЦ, 1999. – 18. Fonnesu A., Severy C. // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1956. – Vol. 2. – P. 293–299.

A.A. Shuldyakov, O.B. Liszko, V.I. Yereomin

Diagnostic and Forecast Importance of Glycoproteids and Aminotransferase Isoenzymes in Severe Diphtheria Cases

Saratov State Medical University

Fifty-eight severe diphtheria patients were examined to assess their clinical symptoms and laboratory findings involving a complex study of glycoproteids and isoenzyme aminotransferases spectrum, with the aim of

improving the quality of diphtheria infection diagnosis. Metabolic disorders in the connective tissue were shown to play an important role in the development of the pathologic diphtheria process while the isoenzymatic spectrum of aminotransferases was characterized by strongly pronounced disbalance with preferential enhancement of the mitochondrial isoenzymes. The degree of the alterations observed was found to bear a clear correlation to the severity of the disease with the pathologic shifts, in case of toxic forms, being maintained after the expiry of the acute stage of the disease during the period of complications onset.

Поступила 19.01.05

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 576.851.2

Н.Г.Тихонов, В.М.Самыгин, А.В.Липницкий, Л.К.Жога

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Разработаны питательная среда и условия глубинного культивирования, обеспечивающие эффективное получение биомассы антибиотикорезистентных штаммов *B. subtilis*, которая является основой производства пробиотиков для профилактики и лечения инфекционных заболеваний при одновременной антибиотикотерапии.

Разработка и использование различных пробиотиков, являющихся антагонистами многих патогенных бактерий, остаются в числе наиболее значимых проблем медицинской микробиологии. Препараты, содержащие живые микроорганизмы-сапрофиты, экологически безопасны, совершенно безвредны и не имеют явных противопоказаний для клинического применения. К настоящему времени полученные на основе микроорганизмов рода *Bacillus* (в основном *B. subtilis*) препараты-пробиотики весьма положительно зарекомендовали себя в случаях коррекции микрофлоры при дисбактериозах, вызванных антибиотикотерапией, при острых кишечных и некоторых других заболеваниях [1–3]. Однако сведения о пробиотиках, полученных на основе генетически измененных вариантов микроорганизмов, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью и антибактериальной активностью в отношении патогенных видов и могут быть использованы для профилактики и лечения инфекционных заболеваний при одновременной антибиотикотерапии, единичны [4, 5]. Тем более остаются неисследованными биотехнологические процессы получения таких микроорганизмов, в том числе условия культивирования, обеспечивающие интенсивное размножение клеток.

Целью настоящего исследования явилась разработка условий культивирования генетически измененных антибиотикорезистентных штаммов *B. subtilis* для эффективного получения биомассы, являющейся основой в производстве пробиотиков.

В работе использовали штаммы *B. subtilis* KM-115 и KM-117, запатентованные и депонированные в Российской коллекции патогенных бактерий противочумного института «Микроб» (Саратов). Штамм *B. subtilis* KM-115 отличался устойчивостью

к рифампицину, ампициллину, стрептомицину (Rif^r , Amp^r , Str^r), а *B. subtilis* KM-117, кроме того – к тетрациклину и хлорамфениколу (Rif^r , Amp^r , Str^r , Tc^r , Cm^r). Оба штамма проявляли ингибирующую активность в тесте «отсроченного антагонизма» в отношении возбудителей чумы, мелиоидоза, холеры и сибирской язвы.

Штаммы выращивали глубинным способом и в стационарном режиме. Глубинное культивирование осуществляли в модифицированной установке «Биофло» («Брунсвик», США) с рабочим объемом культурального сосуда 400 мл [6]. Посев культуры и отбор проб проводили посредством создаваемого избыточного разрежения воздуха. Бактерии выращивали в периодическом режиме в условиях искусственной аэрации и термостатирования. Аэрацию осуществляли за счет непрерывного барботирования и перемешивания среды, при этом расход стерильного воздуха составлял 0,8–1,0 л/мин, а скорость вращения магнитной мешалки – 200–250 об/мин. Температуру в культуральном сосуде в пределах 37 °C поддерживали при помощи электронагревателя и термореле, а контролировали с помощью комбинированного электрода. Концентрацию биомассы в отбираемых через каждые 4 ч пробах определяли при помощи отраслевого стандартного образца (ОСО) мутности ГИСК им. Тарасевича. Продолжительность культивирования не превышала 12 ч. При стационарном выращивании культуру засеивали во флаконы с жидкой питательной средой и помещали в термостат при 37 °C на 24 ч.

В качестве основы питательных сред были использованы молочная сыроворотка и дрожжевой аутолизат, к которым добавляли в различных сочетаниях и концентрациях неорганические соли, углеводы (в основном моно- и дисахариды), органические и