

ИНДИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НЕЙРОСИФИЛИСА

© Терехова Ю.Б., Миронов А.Ю., Истратов В.Г., Осман К.А.

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии
Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, Москва

Для лабораторной диагностики нейросифилиса использован анализ газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Проведен анализ биохимических изменений ликвора с определением углеводных и аминокислотных компонентов. Определены молекулярные маркёры поражения нервной системы при сифилисе. Показано, что информативность ГХ-МС исследований молекулярных маркёров нейросифилиса выше по сравнению с традиционными клинико-лабораторными показателями сифилиса. Разработанные ГХ-МС критерии нейросифилиса имеют высокий уровень диагностической чувствительности, специфичности, предсказуемости положительной и отрицательной, и могут быть использованы в качестве лабораторных диагностических критериев развития данной патологии.

Ключевые слова: нейросифилис, молекулярные маркёры, газовая хроматография-масс-спектрометрия.

INDICATION OF MOLECULAR MARKERS OF NEUROSYPHILIS

Terekhova Yu.B., Mironov A.Yu., Istratov V.G., Osman K.A.

**Microbiology, Virology & Immunology Department of the I.M. Sechenov Moscow Medical Academy,
Moscow**

The gas chromatography (GH) and mass spectrometry (MS) were used for diagnosis of syphilis. The analysis of biochemical changes in liquor was performed. The molecular markers of nervous system disturbances are determined in syphilis. The GH-MS researches of the molecular markers of neurosyphilis have higher informational significance in comparison to the traditional clinical laboratory indices of syphilis.

Key words: neurosyphilis, molecular markers, a gas chromatography-mass spectrometry.

Сифилис представляет одну из актуальных проблем современной медицины. Последнее десятилетие XX века характеризовалось чрезвычайно высокой заболеваемостью им в России, странах Восточной Европы и США. По оценкам ВОЗ в 1999 г. в мире зарегистрировано 12 млн. больных сифилисом; в 2002 г. среди всех причин смертности в мире доля сифилиса составила 0,3%. В течение долгого периода заболеваемость сифилисом в развитых странах находилась под контролем, однако в последние годы наблюдается её рост. В США заболеваемость в течение 40 лет была низкая, а с 2000 г. количество новых случаев прогрессивно увеличивается. Аналогичная ситуация наблюдается в Канаде и Европе. Большинство случаев сифилиса зарегистрировано у гомосексуалистов, из них 75% инфицированы ВИЧ. Взаимосвязь ВИЧ и сифилиса вызывает особую озабоченность, так как описание клинических случаев позволяет предположить, что у ВИЧ инфицированных пациентов, даже после полноценного лечения, нередко развивается нейросифилис.

По данным К.И. Разнатовского с соавт. в Санкт-Петербурге, несмотря на статистическое снижение уровня заболеваемости сифилисом – с 1093 человек в 2001 г. до 492 человек в 2004 г. – течение этой инфекции в настоящее время имеет угрожающий характер, что определяет неблагоприятный прогноз на ближайшие годы [8]. Увеличивается количество скрытых (43,2%), поздних форм (2,63%), серорезистентных форм (6%), нейросифилиса (5,5%), растёт число больных сифилисом беременных (5,5%) и детей (18 случаев). В 4 раза увеличилось количество случаев нейросифилиса, продолжает регистрироваться третичный сифилис.

Причина резкого подъёма заболеваемости сифилисом в последние годы до конца не изучена. Однако в настоящее время считается доказанной роль неблагоприятных социально-экономических, демографических факторов, а также ослабление противоэпидемических мероприятий. Важную роль играет изменение структуры здравоохранения: увеличение доли частнопрактикующих врачей,

оказывающих населению дерматовенерологические услуги, но не занимающихся противоэпидемической работой [10].

Чаще всего сифилисом заражаются молодые люди в возрасте 20-29 лет. У мужчин сифилис, особенно первичный, регистрируется в 2-6 раз чаще, чем у женщин, что объясняется более ранним обнаружением у них клинических проявлений этого заболевания и трудностями распознавания его у женщин [10].

Проблема ранней диагностики сифилиса и его органических поражений всегда стояла остро, поскольку в большинстве случаев сифилитический процесс в центральной нервной системе протекает бессимптомно и не имеет чётких клинических признаков.

Наличие методов диагностики и прогноза течения сифилитической инфекции на основе новейших технологий и, в частности, хромато-масс-спектрометрии (ХМС) биологического материала больных сифилисом может решить сложные задачи диагностики скрытых форм сифилиса с органическими поражениями. В связи с вышеизложенным, разработка современных недорогих, высокочувствительных и специфических методов лабораторной диагностики сифилиса является актуальной и имеет важное значение для медицинской науки и практического здравоохранения.

Приступая к ХМС-индикации молекулярных маркеров нейросифилиса, мы исходили из основного постулата молекулярной медицины – положения о том, что для каждой болезни, каждого патологического проявления организма имеется молекулярная мишень, которую можно использовать как для диагностики заболевания, так и для лекарственного воздействия. Использование современных технологических и инструментальных разработок существенно расширяет возможности молекулярной диагностики. Привлечение в арсенал методов лабораторной диагностики сифилиса ХМС позволяет с высокой степенью достоверности определить наличие органического поражения ЦНС по наличию специфического молекулярного маркера.

Целью настоящего исследования явилась разработка способа индикации молекулярных маркеров нейросифилиса на основе ХМС-анализа биологических жидкостей больных сифилисом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследован биологический материал (ликвор) от 17 пациентов с нейросифилисом. Клинические формы нейросифилиса представлены в табл. 1.

С клинических позиций сифилис нервной системы подразделяется на ранний нейросифилис (до 5 лет от момента заражения, в основном первые 2-3 года) и поздний нейросифилис (не ранее 6-8 лет после заражения). Ранний нейросифилис называется мезенхимным, так как при нём поражаются оболочки и сосуды мозга, преобладает мезенхимная реакция; паренхиматозные элементы иногда могут вовлекаться в процесс, но вторично. Ранний нейросифилис проявляется поражением оболочек мозга разной степени выраженности: от латентных форм до острого генерализованного менингита. Выделяют скрытый (латентный) сифилитический менингит, менинго-невротическую форму сифилитического менингита (базальный менингит), сифилитическую гидроцефалию, острый генерализованный (манифестный) сифилитический менингит, сифилитический менингомиелит, ранний менинговаскулярный сифилис. Скрытый (латентный) сифилитический менингит встречается у 10-15% больных первичным и 20-25% больных вторичным и ранним скрытым сифилисом. При этом, как правило, клинические симптомы отсутствуют. Иногда отмечается головная боль, шум в ушах, головокружение, снижение слуха, болезненность при движении глазных яблок. Диагноз у больных ранним сифилисом устанавливается по изменениям в цереброспинальной жидкости.

Ранним нейросифилисом страдали 9 больных из 17 (52,9%): асимптомным менингитом (скрытый ранний сифилис) – 2 чел.; менинговаскулярным нейросифилисом, осложненным острым нарушением мозгового кровообращения – 1 чел.; дисциркуляторной энцефалопатией (сифилис скрытый ранний) – 1 чел.; сифилисом скрытым ранним без неврологической симптоматики – 5 чел.

Поздний нейросифилис выявлен у 8 больных из 17 (47,1% случаев). Нейросифилис с энцефалопатией смешанного генеза обнару-

Таблица 1

Клинические формы нейросифилиса, выявленные у больных

Ранний нейросифилис, n=9	Количество больных	Поздний нейросифилис, n=8	Количество больных
Асимптомный менингит (скрытый ранний сифилис)	2	Нейросифилис (энцефалопатия смешанного генеза)	2
Менинговаскулярный нейросифилис, осложненный острым нарушением мозгового кровообращения	1	Сифилис вторичный (с неврологической симптоматикой)	3
Дисциркуляторная энцефалопатия (сифилис скрытый ранний)	1	Сифилис поздний скрытый, осложненный астеническим синдромом	1
Сифилис скрытый ранний без неврологической симптоматики	5	Сифилис скрытый не уточненный, осложненный инсультом и алкоголизмом	1
		Сифилис скрытый не уточненный с неврологической симптоматикой, осложненный отравлением метиловым спиртом	1
Всего:	9		8

жен у 2-х пациентов, сифилис вторичный (с неврологической симптоматикой) у 3-х пациентов; сифилис поздний скрытый (с астеническим синдромом) – у 1 пациента; сифилис скрытый не уточненный, осложненный инсультом и алкоголизмом – у 1 пациента и сифилис скрытый не уточненный с неврологической симптоматикой, осложненный отравлением метиловым спиртом – у 1 пациента.

ХМС-исследования проводились по разработанной схеме газовой хроматографии и масс-спектрометрии биологического материала больных сифилисом с переводом исследуемых соединений в триметилалкильные производные (ТМС-соединения) и идентификации с помощью масс-селективного детектора. Для проведения ХМС-исследований использован хроматограф HP-6890 с масс-селективным детектором MSD-5973. Линейный динамический диапазон определяемых концентраций для MSD модели 5973 позволяет для пикограммов образца получать масс-спектры, пригодные для библиотечного поиска. Идентификация соединений проводилась с помощью химической станции GS/MSD-Chem/Station, работающей в среде Microsoft Windows. Химическая станция обеспечивает полный автоматизированный

контроль всех рабочих параметров системы ГХ серии HP-6890, включая электронный контроль потоков (EPC). В работе химической станции использовались стандартные форматы Analyticae Instrument Association (AIA), Open Data Base Connectivity (ODBC), формат Windows Metafile (WMF). Масс-селективный детектор (MSD) модели 5973 позволяет идентифицировать и количественно определить все компоненты сложных биологических матриц. В сложных для идентификации химических соединений случаях (незнакомое химическое соединение или низкий уровень содержания вплоть до следовых количеств) использовали скрининговые масс-спектрометрические исследования с применением селективных ионов. Для подготовки проб биологического материала использовали методы твёрдофазной экстракции с применением специальных предколонок и твёрдофазных картриджей фирмы Agilent. Для максимального эффективного использования возможностей ХМС системы HP-6890 / MSD-5973 предварительно проводили моделирование процесса идентификации органических соединений с помощью программы фирмы Resteck.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью ЭВМ. В работе анализировались только статистически достоверные данные. Для оценки диагностической значимости разработанных ХМС критериев, использовали унифицированные критерии пригодности лабораторных тестов для диагностики определенной формы патологии, примененные В.В. Меньшиковым (1982) и основанные на решении теоремы Байеса (расчёт вероятности распределения результатов исследования) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ликворе больных сифилисом методами ХМС-анализа с масс-селективным детектором обнаружены: фосфорная кислота, D-галактоза, D-трентол (D-треоза и её лактон), пировиноградная кислота, метаболиты серотонина и его производных (индолуксусная, индолмасляная кислоты) изомеры глюкозы (α - и β -глюкоза), D-манноза, рибоза, N-ацетил-DL-триптофан (ацетилированная форма предшественников серотонина), 4-ацетилморфолин (ацетилированная форма гетероциклического амина). Уровень содержания указанных соединений в ликворе представлен в табл. 2.

ХМС-данные исследования ликвора больных позволили не только уточнить диагноз заболевания, его форму и осложнения, но также установить некоторые патологические механизмы воздействия трепонемной инфекции на ткань головного мозга с нарушением обмена триптофана и его производных (предшественников серотонина), а также появления ацетилированных форм и производных морфолина. Морфолин и его производные обладают нейролептическим и транквилизирующим действием. Масс-спектры идентифицированные методом ХМС-анализа с масс-селективным детектором предшественников и метаболитов окситриптамина представлены на рис. 1-3.

В ликворе больных сифилисом обнаружены морфолиновые соединения (ацетилморфолин, тиоморфолин). Содержание морфолинов в ликворе больных сифилисом представлено в табл. 3. Обнаружение в ликворе больных сифилисом морфолиновых структур

свидетельствует о влиянии сифилитической инфекции на метаболизм головного мозга с активацией естественных структур, в частности морфолиновых, обладающих опиатоподобным действием. Особенно важным представляется наличие тиоморфолина – соединения, обладающего двумя особенностями: с одной стороны – механизмами транквилизирующего и опиатоподобного действия, с другой – мощной S-структурой, обеспечивающей высокую токсичность данного соединения и деструктивным действием на ткани головного мозга.

Оценена диагностическая эффективность ХМС метода индикации изомеров сахаров в ликворе, метаболитов серотонина (индолуксусная и индолмасляная кислоты), метаболитов триптофана (ацетилированные формы триптофана) и ацетилморфолина у больных нейросифилисом (17 чел.). Диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, диагностическая предсказуемость (положительная и отрицательная) ХМС методов индикации у больных нейросифилисом представлены в табл. 4.

По диагностической чувствительности молекулярные маркёры распределились следующим образом: метаболиты триптофана (ацетилированные формы) – 88,8%; изомеры сахаров в ликворе – 85,7%; ацетилморфолин – 80,0%; метаболиты серотонина – 75%.

По показателям диагностической специфичности молекулярные маркёры распределились следующим образом: ацетилморфолин – 75%; метаболиты триптофана – 60%; метаболиты серотонина и изомеры сахаров в ликворе – соответственно 25% и 20%.

Наиболее важным представляются показатели диагностической предсказуемости, прежде всего положительной, как один из конкретных механизмов прогноза развития органических поражений у больных сифилисом. Этот показатель являлся наиболее высоким для ХМС анализа ацетилморфолина – 90,0%; далее следуют метаболиты триптофана – 77,7%; метаболиты серотонина – 62,5% и изомеры сахаров в ликворе – 43,2%.

Показатель диагностической предсказуемости отрицательной наиболее высок у метаболитов триптофана и изомеров сахаров в ликворе – 80,0%; у метаболитов серотонина и ацетилморфолина – 50,0%.

Таблица 2

ГХ-МС-анализ ликвора больных сифилисом (n=17)

Идентифицированные соединения	Содержание в ликворе (ммоль/л)
Фосфорная кислота	0,18-0,23
D-галактоза	0,46-0,54
D-трентол (D-треоза и её лактон)	0,51-0,63
Пировиноградная кислота	0,11-0,17
Метаболиты серотонина и его производных: индолуксусная кислота	0,07-0,11
Индолмасляная кислота	0,09-0,13
α -глюкоза	1,03-1,19
β -глюкоза	0,71-0,92
D-манноза	0,56-0,63
Рибоза	0,33-0,42
N-ацетил-DL-триптофан	1,21-1,39
4-ацетилморфолин	0,17-0,25

Примечание: в таблице приведены доверительные интервалы указанных значений с достоверностью $p < 0,005$.

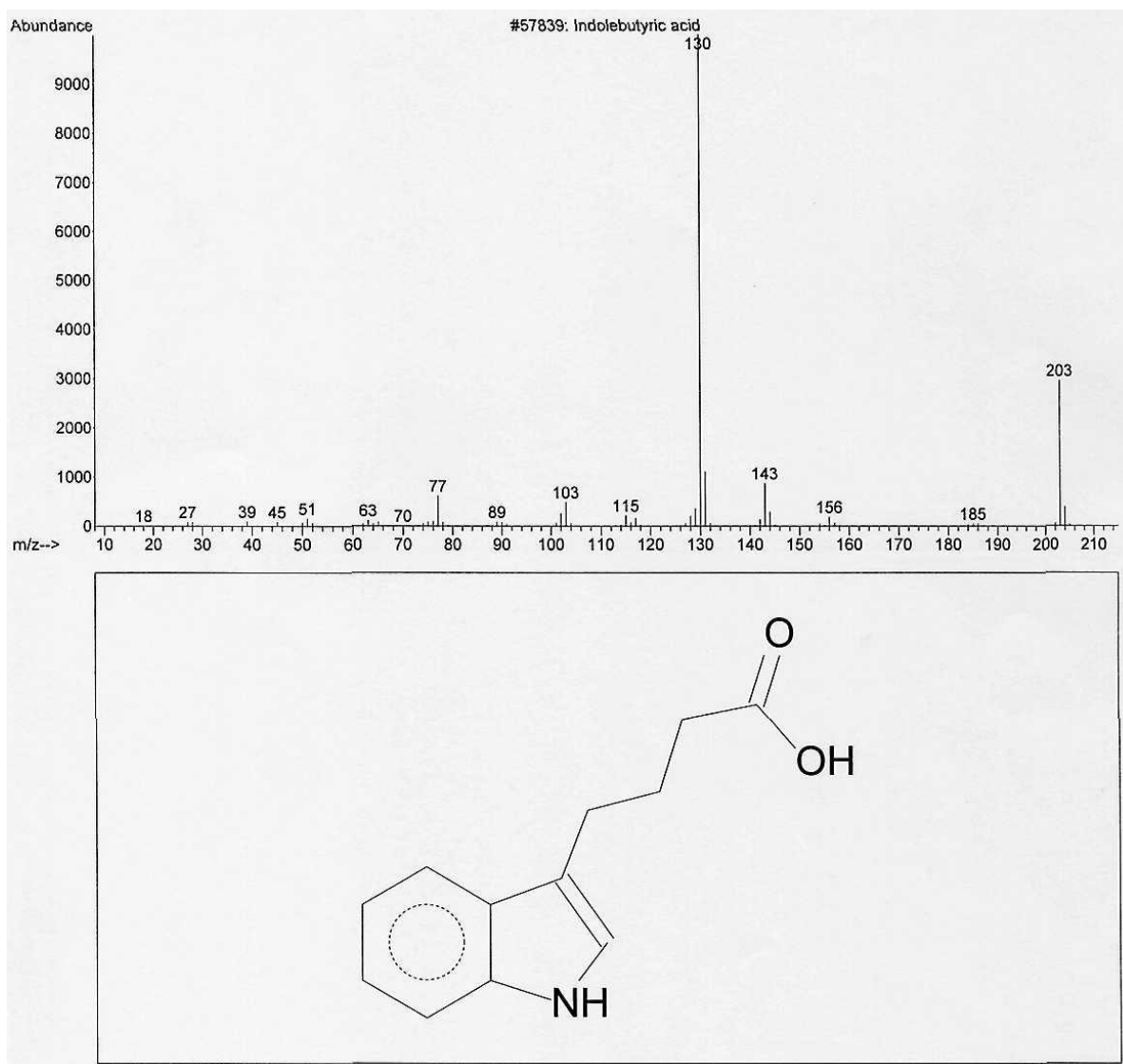


Рис. 1. Индолмасляная кислота.

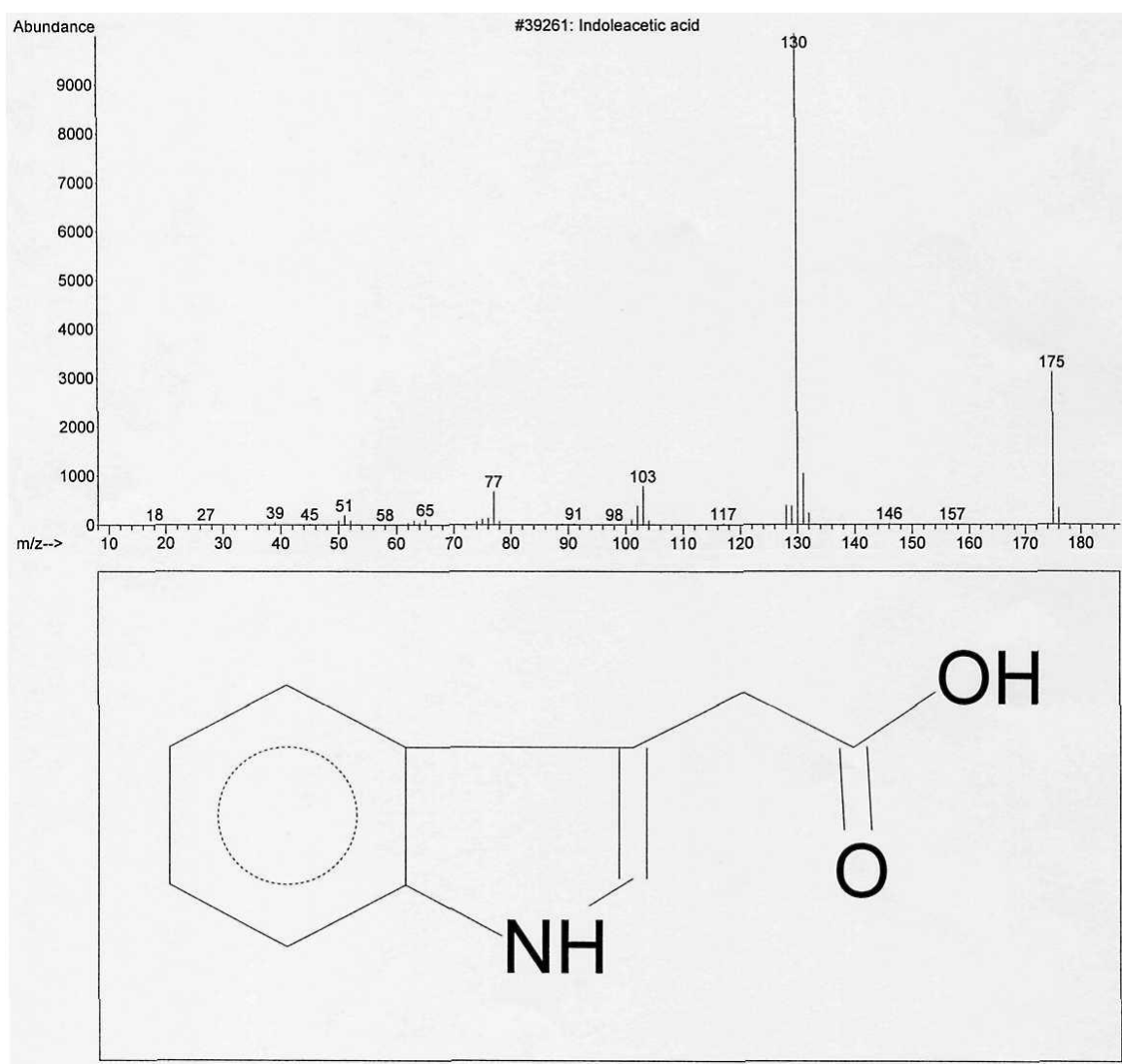


Рис. 2. Индолуксусная кислота.

Таблица 3

Содержание морфолинов в ликворе больных сифилисом
(с органическим поражением головного мозга)

Идентифицированные соединения	Содержание в ликворе
4-ацетил-морфолин	0,07±0,008 – 0,09±0,005 ммоль/л
тиоморфолин	0,02±0,003 – 0,04±0,006 ммоль/л

Примечание: доверительные интервалы с достоверностью $p < 0,005$

Таблица 4

Диагностическая эффективность ГХ-МС методик у больных с нейросифилисом

ГХ-МС показатели	Диагностическая эффективность (%)			
	ДЧ	ДС	ПР пол.	ПР отр.
Метаболиты серотонина (индолуксусная и индолмасляная кислоты)	75,0	25,0	62,5	50,0
Метаболиты триптофана (ацетилированные формы триптофана)	88,8	60,0	77,7	80,0
Ацетилморфолин	80,0	75,0	90,0	50,0
Изомеры сахаров в ликворе	85,7	20,0	43,2	80,0

Примечание: ДЧ — диагностическая чувствительность; ДС — диагностическая специфичность; ПР пол. — диагностическая предсказуемость положительная; ПР отр. — диагностическая предсказуемость отрицательная.

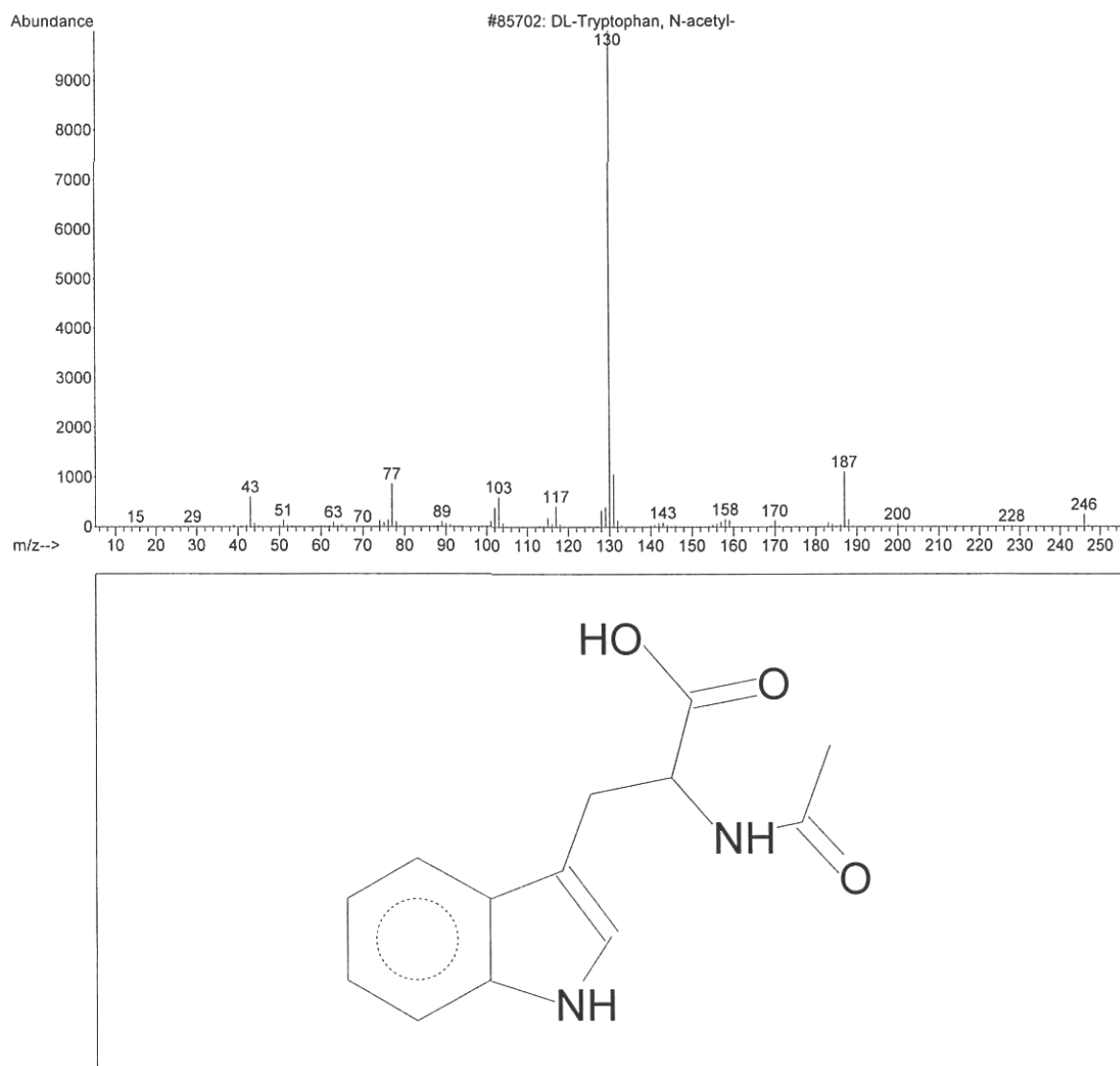


Рис. 3. DL-триптофан

На основании проведённых исследований предложены новые ХМС-тесты диагностики нейросифилиса, которые позволяют не только уточнить диагноз заболевания и его осложнения, но также установить некоторые патогенетические механизмы воздействия *Treponema pallidum* на ткань головного мозга с нарушением обмена триптофана и его производных. Молекулярными маркерами нейросифилиса служат фосфорная кислота, D-галактоза, D-трентол, пировиноградная кислота, метаболиты серотонина и его производных, изомеры глюкозы — α - и β -глюкоза, D-манноза, рибоза, N-ацетил-DL-триптофан, 4-ацетилморфолин. Разработанные ХМС-критерии нейросифилиса имеют высокий уровень диагностической чувствительности (75,0-88,8%), диагностической специфичности (25,0-75,0%), диагностической предска-

зости положительной (43,2-90,0%), диагностической предсказуемости отрицательной (50,0-80,0%). На разработанный "Способ лабораторной диагностики изменений центральной нервной системы при сифилисе" получено положительное решение по заявке 200614206/15(045934) о выдачи патента РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Венерические болезни. Руководство для врачей / Под ред. О.К. Шапошникова. — Медицина, 1991. — 140 с.
2. Витенберг А.Г., Иоффе Б.В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе // Ленинград: Химия, 1982. — 279 с.
3. Воробьев А.А., Миронов А.Ю., Истратов В.Г., Осман К.А. Оценка диагностических критериев сифилитической инфекции методом газо-

- вой хроматографии и масс-спектрометрии // Вестник РАМН. – 2005. – № 2. – С. 22-26.
4. *Истратов В.Г., Миронов А.Ю., Осман К.А.* Новые методические подходы к диагностике септических состояний с помощью методов газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии // Клин. лаборатор. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 65.
 5. *Истратов В.Г., Миронов А.Ю., Осман К.А.* Хроматографические аспекты люэтической инфекции // Клин. лаборатор. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 65.
 6. *Меньшиков В.В.* Руководство по клинической лабораторной диагностике. – М.: Медицина, 1982. – 586 с.
 7. *Миронов А.Ю., Истратов В.Г., Воробьев А.А., Осман К.А., Терехова Ю.Б., Романовская Л.М.* Индикация молекулярных маркеров *Treponema pallidum* в лабораторной диагностике сифилиса // Молекулярная медицина. – 2005. – № 4. – С. 58–63.
 8. *Разнатовский К.И., Смирнова Т.С.* Статистический анализ заболеваемости инфекциями, передающимися половым путем в России. Особенности контроля и профилактики на современном этапе // Российский семейный врач. – 2000. – № 4. – С. 14-17.
 9. *Родионов А.Н.* Сифилис: Руководство для врачей. – СПб, 1997. – 288 с.
 10. *Яковлев Н.А., Дубенский В.В.* Нейросифилис: клиника, диагностика, лечение // Учебное пособие. – Тверь, 2004 – 175 с.