

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ПОЧЕК ПРИ СИФИЛИСЕ

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

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

Для лабораторной диагностики почечной патологии при сифилисе использован ГХ-МС анализ. Проведен анализ биохимических изменений мочи с определением летучих жирных кислот, фенолов, крезолов, сернистых соединений, амидов. Определены молекулярные маркёры поражения почек при сифилисе. Показано, что информативность ГХ-МС исследований молекулярных маркёров поражения почек выше по сравнению с традиционными клинико-лабораторными показателями сифилиса. Разработанные ГХ-МС критерии поражения почек имеют высокий уровень диагностической чувствительности, специфичности, предсказуемости положительной и отрицательной и могут быть использованы в качестве лабораторных диагностических критериев развития данной патологии.

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

INDICATION OF MOLECULAR MARKERS OF KIDNEY INFECTIOUS PATHOLOGY IN SYPHILIS

Terehova 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 laboratory diagnostics of kidney pathology was performed by GC-MS analysis. The analysis of the biochemical change the urine was carried out along with the determination of the volatile fatty acids, phenols and cresols, sulphureous compounds and amides. The molecular markers of kidney lesions are determined in syphilis. GC-MS researches of molecular markers in kidney syphilis have high informative importance.

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

В мире растёт количество заболеваний, передающихся половым путём (ЗППП). Одним из наиболее значимых ЗППП является сифилис. По данным органов ГСЭН, заболеваемость сифилисом в 2001 году составила в РФ 240 тыс. случаев. Эпидемиологическая ситуация в стране остается крайне напряжённой. Одним из основных мероприятий, направленных на предупреждение заболеваемости сифилисом, является его ранняя диагностика [3, 4, 7]. Несмотря на то что сифилис известен врачам с античных времён, остается много нерешённых вопросов его диагностики и лечения. В последние годы особенно увеличилось количество скрытых форм сифилиса, удельный вес раннего скрытого сифилиса в РФ вырос с 1991 по 1994 год в 1,2 раза [9]. Частота регистрации позднего скрытого сифилиса снизилась в 6 раз.

Причина резкого подъёма заболеваемости сифилисом в последние годы до конца не изучена. Считается доказанной роль неблагоприятных социально-экономических, демографических факторов, а также ослабление

противоэпидемических мероприятий. Важную роль играет изменение структуры здравоохранения с увеличением количества частнопрактикующих врачей, оказывающих населению дерматовенерологические услуги, но не занимающихся противоэпидемической работой [11].

Чаще сифилисом заражаются люди в возрасте 20-29 лет. У мужчин сифилис, особенно первичный, регистрируется в 2-6 раз чаще, чем у женщин, что объясняется более ранним проявлением у них клиники заболевания и трудностями распознавания его у женщин [1, 10, 11]. Проблема ранней диагностики сифилиса и его органных поражений всегда стояла остро, поскольку в большинстве случаев сифилитический процесс в ЦНС протекает бессимптомно и не имеет чётких клинических признаков.

Медицина XXI века – молекулярная медицина. Основной постулат молекулярной медицины – положение о том, что для каждой болезни, каждого патологического проявле-

ния 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. Методы молекулярной диагностики и прогноза течения сифилитической инфекции на основе современных технологий и, в частности, хромато-масс-спектрометрии (ХМС) биологического материала от больных сифилисом могут решить сложные задачи диагностики скрытых форм сифилиса и его органических поражений [3, 4, 5].

В связи с вышесказанным разработка современных недорогих, высокочувствительных и специфических методов лабораторной диагностики сифилиса является актуальной и имеет большое значение для медицинской науки и практического здравоохранения. Целью настоящего исследования явилась разработка способа индикации молекулярных маркеров поражения почек на основе ХМС анализа биологических жидкостей организма больного сифилисом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследована моча 16 больных: 12 больных с уретритами (70,5%), 10 больных с циститами (58,8%), 7 больных с пиелонефритами специфической природы (41,1%), а также с инфекциями мочевыводящих путей (ИМП), возникающих при нарушениях иммунной резистентности при сифилисе. Хроматографические исследования проводились по схеме газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС анализа) биологического материала больных сифилисом с переводом исследуемых соединений в триметилалкильные производные (ТМС-соединения) и идентификации с помощью масс-селективного детектора [2, 7, 8].

Для ХМС использовали 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 соедине-

ний 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 и 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) использованы 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 на ЭВМ. В работе анализировались только статистически достоверные данные. Для оценки диагностической значимости разработанных ГХ-МС критериев, использовали унифицированные критерии пригодности лабораторных тестов для диагностики определенной формы патологии, применённые В.В. Меньшиковым (1982) и основанные на решении теоремы Байеса (расчёт вероятности распределения результатов исследования) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методами ГХ-МС-анализа идентифицированы: летучие жирные кислоты (ЛЖК) – уксусная, пропионовая, изомасляная, масляная, изовалериановая, валериановая, копроновая, лауриловая; ароматические жирные

кислоты – фенилуксусная и фенилпропионовая, 1-1-бензодиокси-5-ол, 2-пропан-амид; 1-4-дитозил-2, 3-изопропил-L-трейтол; нитробензен; 4-4-ацетамидо-2, 2, 6, 6-тетра-метил-пиперадино-1-оксил; ацетамидо-N-аминооксиметил, 2-метил-5-(1-метил-этил)-фенол, 4-4-1-метилэтил-бутил-фенол.

Появление этих метаболитов связано с инактивацией продуктов нарушенного метаболизма углеводов и аминокислот и с развитием ИМП, вызванной аэробными и анаэробными микробами. Содержание указанных соединений в моче представлено в табл. 1.

Кроме ЛЖК, фенолов, крезолов, идентифицирован ряд сернистых соединений и амидов в моче, которые, по нашему мнению, причастны к развитию почечных осложнений у больных сифилисом и, с другой стороны, связаны с вторичной ИМП, проявляющейся в почечной патологии за счёт нарушенной иммунной реактивности. Данные соединения представлены на рис. 1, 2, 3. Количественные характеристики указанных соединений представлены в табл. 2.

У больных с ИМП оценена диагностическая эффективность ГХ-МС индикации сернистых соединений, фенолов, амидов в моче, фенилкарбоновых кислот. Диагностическая

чувствительность, диагностическая специфичность, диагностическая предсказуемость – положительная и отрицательная ГХ-МС индикации представлена в табл. 3. Самый высокий уровень показателя диагностической чувствительности отмечен у ГХ-МС-анализа фенолов и амидов (88,8%), затем следует определение сернистых соединений и фенилкарбоновых кислот в моче – соответственно 75,0% и 71,4%; далее определение ЛЖК в моче – 66,6%. Показатели диагностической специфичности распределились следующим образом: фенолы и амиды в моче – 80%; сернистые соединения и ЛЖК в моче – 50,0% и 45,3%, соответственно; фенилкарбоновые кислоты – 25,0%. Показатель диагностической предсказуемости положительной наиболее высок для определения фенолов и амидов, а также сернистых соединений – соответственно 88,8% и 75,0%, далее следуют фенилкарбоновые кислоты и ЛЖК в моче – 57,1% и 33,6% соответственно. Показатель диагностической предсказуемости отрицательной наиболее высок для определения фенолов и амидов в моче, затем для сернистых соединений и фенилкарбоновых кислот в моче – по 50,0%; и ЛЖК в моче – 41,2%.

Таблица 1

ГХ-МС анализ мочи больных с первичным сифилисом половых органов (n=16)

Идентифицируемые соединения	Содержание в моче (ммоль/л)
Уксусная	0,06-0,09
1-1-бензодиокси-5-ол	0,05-0,07
Пропионовая	0,06-0,09
2-пропанамид	0,03-0,06
Изомасляная	0,02-0,04
1-4-дитозил-2,3-изопропил-L-трейтол	0,04-0,07
Масляная	0,24-0,31
Нитробензен	0,02-0,04
Изовалериановая	0,03-0,07
4-4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметил-пиперидино-1-оксил	0,05-0,08
Валериановая	0,08-0,12
Ацетамид-N-амноксиметил	0,04-0,07
Капроновая	0,06-0,09
Лауриновая	0,07-0,10
2-метил-5-(1-метил-этил)-фенол	0,11-0,15
4-4-1-метил-этил-бутил-фенол	0,13-0,17
Фенилуксусная	0,14-0,19
Фенилпропионовая	0,19-0,23

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

Таблица 2

ГХ-МС-анализ сернистых соединений в моче больных сифилисом

Идентифицируемые соединения	Содержание в моче (ммоль/л)
1-4-дитозил-2,3-изопропил-L-трейтол	0,09-0,13
4-4-дигидрокси-дифенил-сульфон	0,002-0,005
N-N-бис-тетраметилен-тиурам-дисульфид	<0,002

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

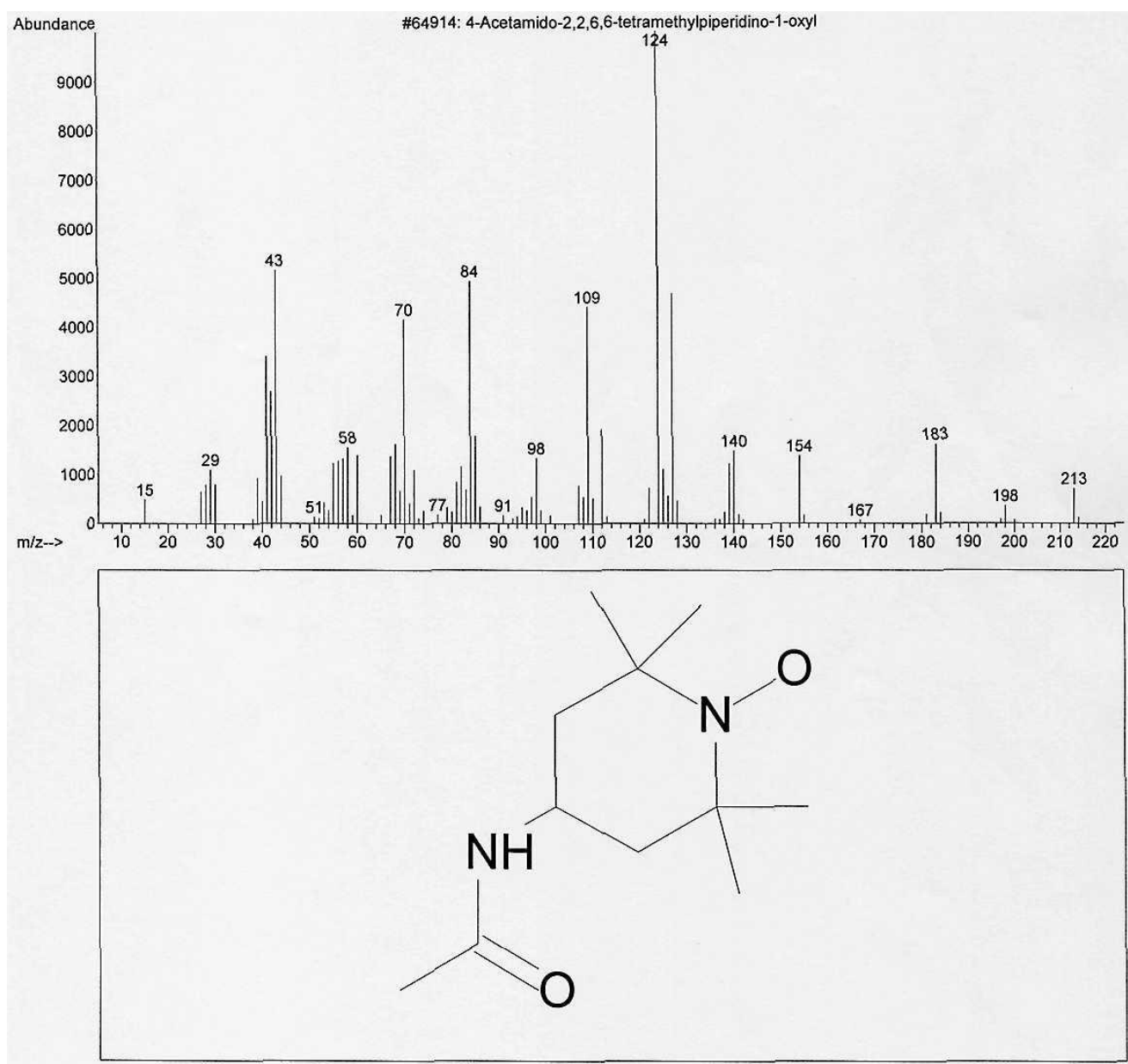


Рис. 1. 4-4-ацетомидо-2, 2, 6, 6-тетрометил-пиперадино-1-оксил.

Диагностическая эффективность ГХ-МС методик у больных сифилисом с почечными осложнениями

ГХ-МС показатели	Диагностическая эффективность (%)			
	ДЧ	ДС	ПРпол.	ПРотр.
Сернистые соединения в моче	75,0	50,0	75,0	50,0
Фенолы и амиды в моче	88,8	80,0	88,8	80,0
Фенилкарбоновые кислоты в моче	71,4	25,0	57,1	50,0
ЛЖК в моче	66,6	45,3	33,6	41,2

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

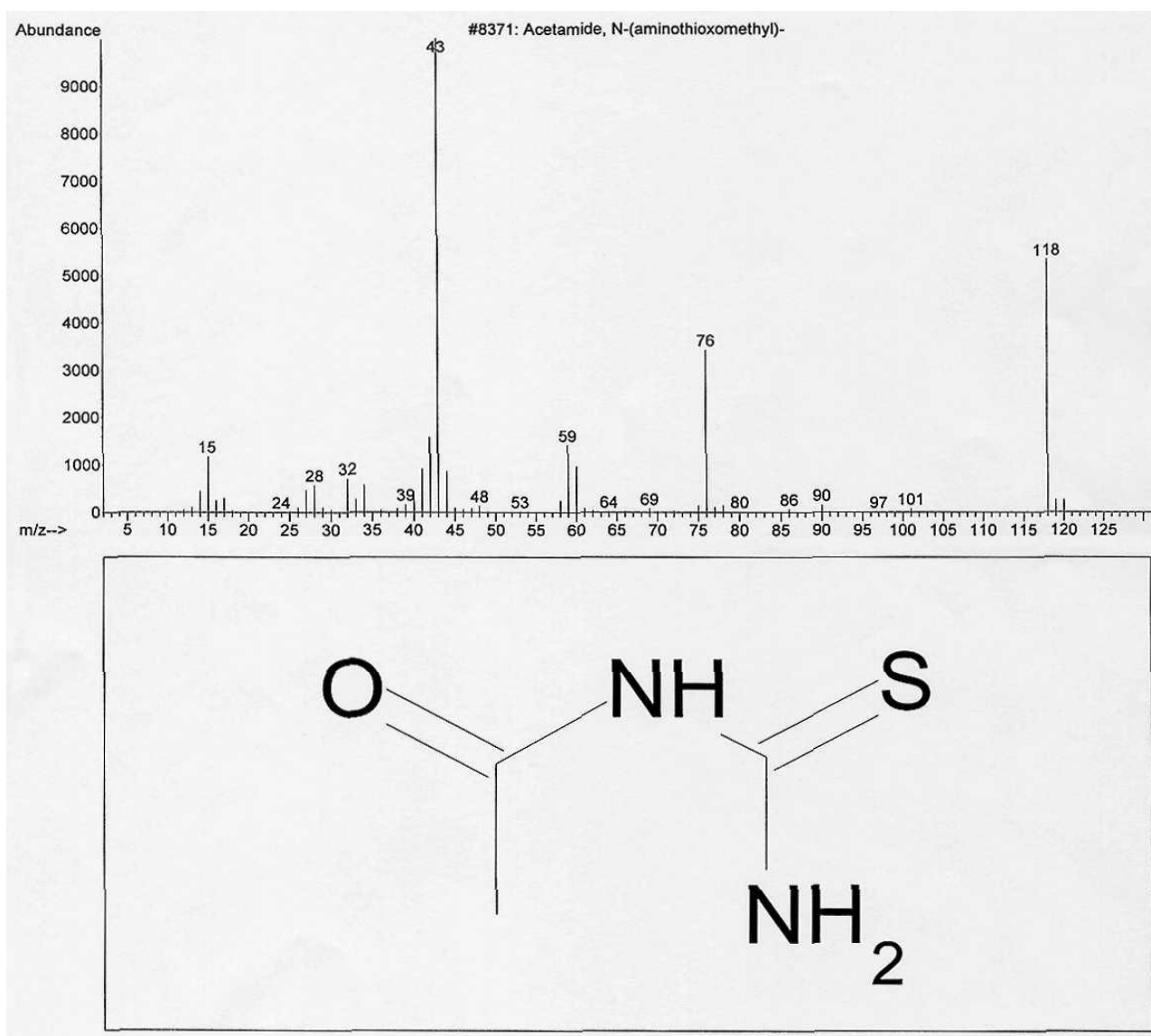


Рис. 2. Ацетамидо-N-аминооксиметил.

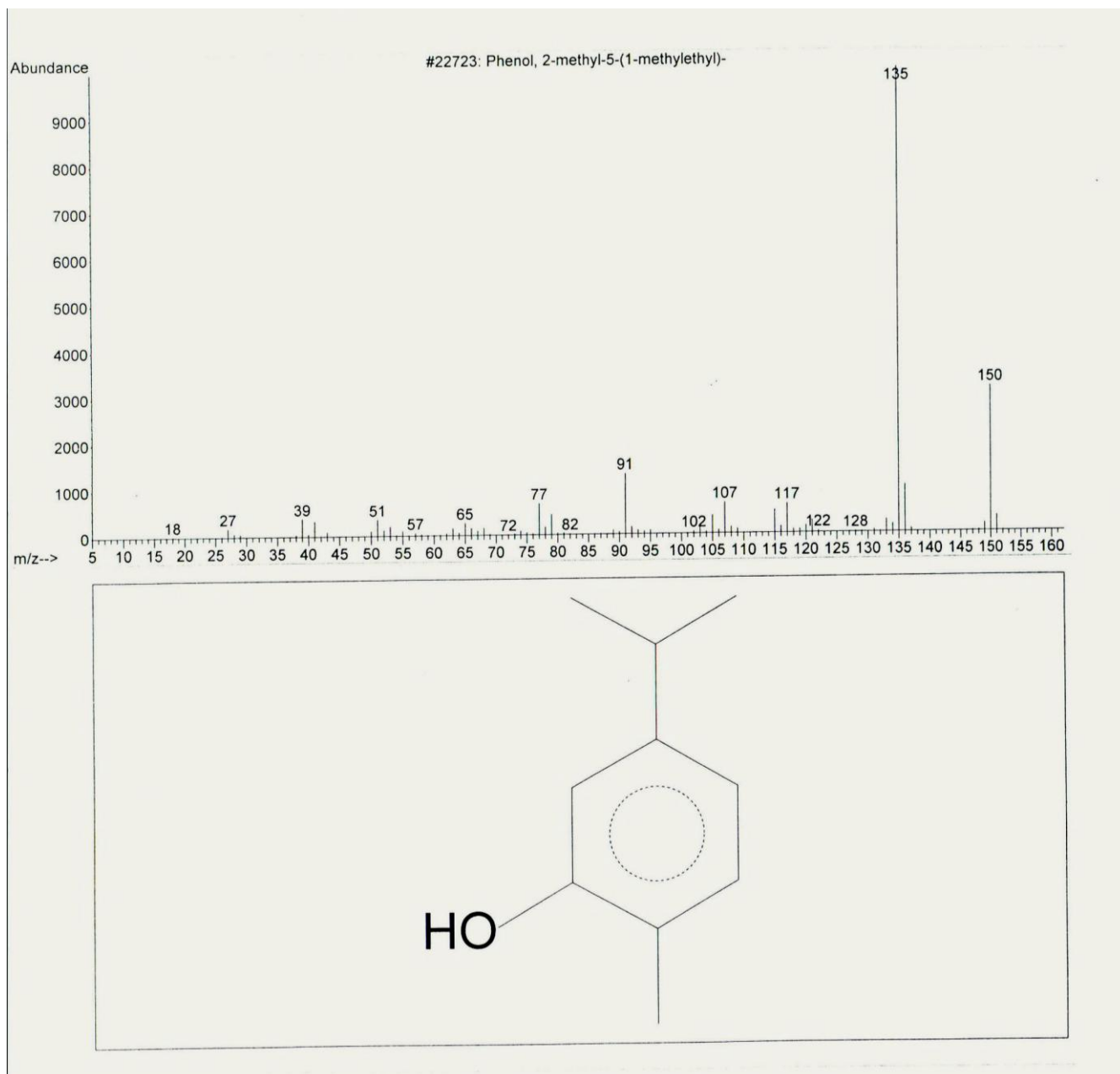


Рис. 3. 2-метил-5-(1метил-этил)-фенол.

На основании проведённых исследований предложены новые хроматографические тесты диагностики патологии почек при сифилисе. Молекулярными маркерами инфекционной патологии почек служат 1-1-бензодиокси-5-ол, 2-пропанамида; 1-4-дитозил-2, 3-изопропил-L-трейтол; нитробензен; 4-4-ацетомидо-2, 2, 6, 6-тетрометилпиперадино-1-оксил; ацетамидо-N-аминооксиметил, 2-метил-5-(1-метил-этил)-фенол, 4-4-1-метилэтил-бутил-фенол. Разработанные ГХ-МС-критерии почечной патологии имеют высокий уровень диагностической чувствительности (66,6-88,8%), диагностической специфичности (25,0-80,0%), диагностиче-

ской предсказуемости положительной (33,6-88,8%), диагностической предсказуемости отрицательной (41,2-50,0%). На разработанный "Способ диагностики инфекционной патологии почек при сифилисе" получено положительное решение по заявке 2006142059/15 (045933) о выдаче патента РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Венерические болезни. Рук-во для врачей* / Под ред. О.К. Шапошникова. – М.: Медицина, 1991. – 140 с.

2. Витенберг А.Г., Иоффе Б.В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе. – Л.: Химия, 1982. – 279 с.
3. Воробьев А.А., Миронов А.Ю., Истратов В.Г., Осман К.А. Оценка диагностических критериев сифилитической инфекции методом газовой 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 // Клинический журнал. – 2004. – № 9. – С. 65.
5. Истратов В.Г., Миронов А.Ю., Осман К.А. Хроматографические аспекты люэтической инфекции // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 9. – С. 65.
6. Меньшиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике. – М., 1982. – 576 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. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. – М.: Медицина, 1978. – 600 с.
9. Разнатовский К.И., Смирнова Т.С. Статистический анализ заболеваемости инфекциями, передающимися половым путём, в России. Особенности контроля и профилактики на современном этапе // Росс. семейный врач. – 2000. – № 4. – С. 14–17.
10. Родионов А.Н. Сифилис: Рук-во для врачей. – СПб.: Питер, 2007. – 320 с.
11. Яковлев Н.А., Дубенский В.В. Нейросифилис: клиника, диагностика, лечение // Учеб. пособие. – Тверь, 2004. – 175 с.