

© Н.К. Пастухова, Г.Е. Старков, 2010
УДК 616-002-074

Н.К. Пастухова, Г.Е. Старков

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Кафедра общей хирургии с курсом эндоскопии (зав. — проф. М.П. Королев) Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии

Ключевые слова: системное воспаление, хроматографическое исследование.

Введение. Хроматография — метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различии в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.

Метод активно используется для диагностики заболеваний. В биотехнологии хроматография является основным процессом выделения вирусов гриппа, энцефалита, бешенства и ящура, очистки вакцин, промышленного производства инсулина, других белков и полипептидов.

Хроматографический контроль биохимических маркеров и метаболитов применяется для выявления и подтверждения опасных заболеваний, мониторинга эффективности терапии, предсказания прогноза лечения, определения рецидивов болезни [2]. В одних случаях для надежной диагностики патологического процесса достаточно оценить уровень нескольких биохимических маркеров, в других — определяется метаболический профиль многих компонентов.

В роли маркеров могут выступать сравнительно небольшие молекулы: катехоламины, аминокислоты, сахара, стероиды, гормоны, витамины и т.д., а также большие молекулы: отдельные ферменты, белки и нуклеиновые кислоты.

Синдром системной воспалительной реакции — сложный многокомпонентный процесс, объединяющий глубокие нарушения гомеостаза, источником которых являются циркулирующие в крови токсические продукты метаболизма, в том числе появляющиеся при инфекции различной природы [1].

Цель нашей работы — оценка возможности использования хроматографических методов для диагностики системной воспалительной реакции.

Материалы и методы. Исследование провели на 2-е сутки послеоперационного периода у 18 пациентов с острым деструктивным холециститом, осложненным пери-

тонитом. Возраст больных был от 49 до 78 лет, из них мужчин — 7, женщин — 11. Контрольную группу составили 15 доноров крови в возрасте от 38 до 52 лет.

Комплекс обследования больных включал: данные осмотра, клинико-лабораторные параметры, на основании которых пациентов разделили по тяжести системного воспаления, иммунохроматографический тест для полуколичественного определения прокальцитонина «BRAHMS RCT-Q» и хроматографические методы для анализа структуры плазмы крови. Для сравнения и получения достоверных результатов хроматографию плазмы крови провели как пациентам (разделенным по подгруппам по тяжести системного воспаления), так и донорам, методом высокоточной эксклюзионной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (гель-фильтрации) с использованием двух колонок: «Полиспен G-5» с полиоксиметакрилатным гелем и колонки «Тоуоперл-Sw — 2000-2500» на жидкостном хроматографе системы «TRI ROTAR» («Yasco», Япония).

Результаты и обсуждение. У всех пациентов констатируется наличие синдрома системной воспалительной реакции. В ряде случаев отмечено нарастание лейкоцитоза, лейкоцитарного индекса интоксикации, молекул средней молекулярной массы (таблица). Нарастающая тахикардия, гипотония, повышение центрального венозного давления свидетельствовали о прогрессировании недостаточности кровообращения, а увеличение частоты дыхания и снижение сатурации — о нарастании дыхательной недостаточности.

Повышение билирубина и ферментов, мочевины и креатинина при снижении диуреза являлось отражением присоединения печеночной и почечной недостаточности. Кроме того, имело место прогрессирование гипопроотеинемии, анемии, т. е. развивалась полиорганная недостаточность.

Данные, полученные при анализе клинико-лабораторных параметров, позволили дифференцировать пациентов основной группы по тяжести проявлений системного воспаления на основании рекомендаций согласительной конференции (г. Калуга, июнь 2004 г.), дополненных на VII Конференции РАСХИ (ноябрь 2008 г.) [3].

В 8 случаях констатируется наличие синдрома системной воспалительной реакции (ССВР),

Пациенты с разной тяжестью системного воспаления (M±m)

Показатели	ССВР (n=8)	Сепсис (n=5)	Тяжелый сепсис (n=3)	Септический шок (n=2)
Пульс, уд/мин	92,35±8,36	103,85±13,1	110,08±25,7	119,4±6,8
АД _{сист.} , мм рт. ст.	132,15±12,25*	110,5±11,15^	95,35±14,2*^	75,25±10,02*^^
АД _{диаст.} , мм рт. ст.	75,05±7,45*	71,3±7,35^	64,1±13,2^	40,2±10,3*^^
Частота дыханий в 1 мин	20,15±2,85*	21,1±2,3	22,3±3,5	25,42±4,1*
Суточный диурез, мл	1662,2±288,5*	1553,5±273,1^	1289,3±315,1**	693,5±254,5**
ЦВД, см вод. ст.	5,9±2,45*	7,5±3,2	9,8±4,3*	12,6±3,5*
T °C	37,4±1,4	37,5±1,3	37,4±0,9	37,6±0,5
Общий белок, г/л	59,66±1,65*	55,89±3,33	54,45±4,85	52,05±3,75*
Билирубин, мкмоль/л	28,26±2,58*	33,19±5,03^	39,26±6,63*	51,36±5,35*^
ALT, ед/л	85,35±11,7*	142,45±27,8*	154,45±34,95*	178,05±40,2*
AST, ед/л	114,85±25,93*	121,9±27,5^	154,9±18,25*^	190,9±10,13*^
Мочевина, ммоль/л	9,91±3,5*	12,6±2,03^	12,9±1,25^	17,65±3,25*^
Креатинин, мкмоль/л	109,5±22,7*	126,3±12,2^	145,6±19,95**	215,45±27,7*^
МСМ ₂₅₄ вен., ед.	0,255±0,07*	0,327±0,06*	0,397±0,05^	0,496±0,095*^
МСМ ₂₈₀ вен., ед.	0,360±0,019*	0,471±0,035*	0,498±0,074	0,519±0,055*
Амилаза, ед / л	48,3±10,1*	107,2±20,25*	182,3±18,65*	209,2±35,4*
Гемоглобин, г/л	118,27±2,6*	107,36±2,42	103,25±4,35*	96,3±2,95*
Лейкоциты, ×10 ⁹ / л	12,25±1,05*	13,53±0,92^	16,06±0,89*^	22,2±1,75*^
ЛИИ, усл. ед.	3,05±0,95*	4,87±0,6^	7,78±0,57*^	8,93±1,2*^

*.^.^ Группы сравнения, p<0,01.

а у 5 пациентов — сепсис. Тяжелый сепсис имел место у 3 больных, септический шок развился у 2 пациентов.

Уровень прокальцитонина у пациентов с сепсисом и тяжелым сепсисом был выше 2 нг/мл, у больных с септическим шоком — более 10 нг/мл.

У здоровых доноров на хроматограмме, выполненной на колонке «Полисеп G-5»,

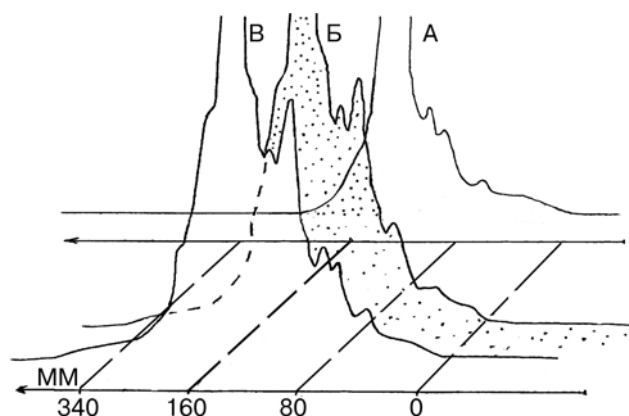


Рис. 1. Хроматограмма плазмы крови на колонке «Полисеп G-5».

А — хроматограмма плазмы доноров (p=0,3); Б — хроматограмма пациентов с синдромом системной воспалительной реакции (p=0,2); В — хроматограмма пациентов в стадии сепсиса (p=0,3). Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс: ММ — молекулярная масса (килодальтон).

идентифицировались следующие фракции белков: 1) высокомолекулярные белки с массой (ММ) 160 000–340 000 дальтон (иммуноглобулины, фибриноген, альбумин); 2) среднемолекулярные компоненты с ММ от 60 000–160 000; 3) — низкомолекулярные белки с ММ 25 000–60 000 дальтон.

При хроматографии крови больных наблюдалась иная картина (рис. 1).

У них выявлено четкое сходство колебательных кривых. При сопоставлении хроматограмм доноров, пациентов с ССВР и сепсисом отмечено, что при прогрессировании системного воспаления появляется и нарастает значительный крупнодисперсный компонент — аномальная преальбуминовая фракция, отмечается последовательное снижение альбумина и увеличивается количество веществ средней и низкомолекулярной массы.

Для подтверждения полученного результата хроматографию плазмы крови доноров и пациентов дополнительно провели на колонке «TOYOPEARL-SW-2000» (рис. 2). С ее помощью у здоровых доноров идентифицировали следующие фракции: 1 — высокомолекулярные комплексы и фибриноген с ММ от 200 000 и более 670 000 дальтон; 2 — иммуноглобулины, альбумин с ММ 200 000 — 60 000 дальтон; 3 — низкомолеку-

лярные пептиды и мелкодисперсные белки с ММ 10 000–1000 дальтон.

При сопоставлении хроматограмм доноров, пациентов с ССВР и септическим шоком характерным оказалось значительное снижение концентрации альбумина, увеличение концентраций высокомолекулярных веществ, многократное повышение концентраций средномолекулярных фракций, а также значительное увеличение концентраций фракций низкодисперсных белков. Кроме того, только в наиболее тяжелой группе больных (септический шок) были обнаружены непостоянные низкомолекулярные компоненты.

Таким образом, исследование плазмы на колонках «Полисеп G-5», а затем на «Toyhhear I-SW-2000» выявило и подтвердило, что при наличии и прогрессировании системного воспаления происходит изменение спектра хроматографической картины плазмы крови: накопление веществ средне- и низкомолекулярной массы, снижение концентрации альбумина, а также значительное обогащение спектра хроматографической картины за счет появления новых веществ.

Выводы. 1. При генерализации системного воспаления на хроматограмме плазмы крови появляются и нарастают новые белковые вещества, которые, вероятнее всего, относятся к эндотоксинам, накапливаются вещества средне- и низкомолекулярной массы, происходит прогрессирующее снижение концентрации альбумина.

2. Хроматографические методы являются дополнительным средством оценки системного воспаления, дают возможность контролировать его динамику, предвидеть развитие генерализации процесса.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алексеев С.А. Абдоминальный хирургический сепсис. — Минск.: Юнипак, 2005. — 256 с.
2. Даванков В. А., Яшин Я. И. Сто лет хроматографии // Вестн. РАМН. — 2003. — № 7. — С. 637–646.

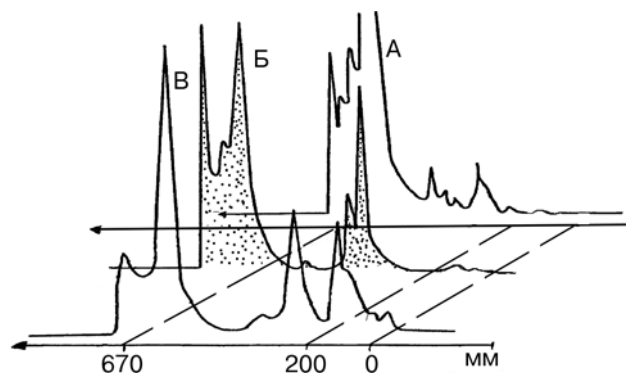


Рис. 2. Хроматограммы на колонке «Toyhhear I-SW-2000».

А — хроматограмма плазмы крови доноров ($p=0,2$); Б — хроматограмма плазмы крови пациентов с ССВР ($p=0,3$); В — хроматограмма плазмы крови пациентов с септическим шоком ($p=0,3$).

3. Сепсис: классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение. Практическое руководство / Под ред. В.С.Савельева, Б.Р.Гельфанда. — М.: МИА, 2010. — 351 с.

Поступила в редакцию 06.04.2010 г.

N.K.Pastukhova, G.E.Starkov

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHY METHODS FOR THE DIAGNOSTICS OF SYSTEMIC INFLAMMATION

Specific manifestations of systemic inflammation in patients with acute destructive cholecystitis in the postoperative period were studied by the methods of high-precision exclusive liquid chromatography with chromatograph «Trirotar» (Japan) with columns «Polysep G-5», «Toyopearl-Sw — 2000–2500». It was found that systemic inflammation was accompanied by active accumulation of middle- and low-molecular mass. Later their spectrum was found to change when going over to unfavorable clinical course. In patients with septic shock there occurred enrichment of the chromatographic picture spectrum with new peaks (substances which can be considered as endotoxins), decrease of the albumin concentration, as well as increase of dispersity of the biochemical composition of blood.