

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХРОМАТО- МАССПЕТРОМЕТРИИ У БОЛЬНЫХ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУИТОМ

Курбанов Элмурод Хушвактович

Самаркандский Государственный Медицинский Институт Самарканд,
Узбекистан

Газовая хроматография используется во многих областях медицины и биологии: в экологии для определения содержания вредных примесей в воздухе, воде и пищевых продуктах: в токсикологии и судебной медицине – для диагностики отравлений техническими жидкостями и пестицидами самой различной структуры [1]. В процессе метаболизма микробные клетки производят низшие карбоновые кислоты, причем набор кислот является как бы визитной карточкой того или иного микроорганизма [4]. Иммуно-серологический метод является непрямым, поскольку выявляет не возбудителя, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации. Известные молекулярно-биологические методы, при несомненных преимуществах - прямое определение возбудителя, высокие специфичность и чувствительность, универсальность, скорость, возможность диагностики хронических и латентных инфекций — имеют такие серьезные недостатки, как частые ложноположительные результаты и невозможность адекватной количественной оценки [3,4]. Однако существует альтернативный способ определения микробных сообществ методом хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров. В основе метода лежит высокоточное определение специфических маркерных молекул, входящих в состав клеточных липидов микроорганизмов. Метод представляет собой идентификацию микробных сообществ по специфическим жирным кислотам методом хромато-масс-спектрометрии [1]. Высокочувствительный и селективный метод газовой хроматографии - масс спектрометрии (ГХ-МС) позволяет одновременно измерять концентрации более сотни микробных маркеров непосредственно в анализируемом материале: крови, моче, биоптатах и других биологических жидкостях и тканях, [4]. Метод хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров является самым информативным и быстрым для оценки воздействия на большое количество микробных сообществ, например для оценки воздействия антимикробных средств на микробиоту. Существуют работы по оценке микробных сообществ методом хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров в различных экологических объектах [3,4], подробно исследована микробиота слизистой кишечника при различных заболеваниях, микрoэкология кишечника и кожи].

Полость носа населена определенной микробиотой, которая несет защитные функции. Микробиота носовой полости первой встречается с микроорганизмами и вирусами, попадающими в нос извне, и не пропускает их во внутреннюю среду, является показателем уровня «защитного порога» организма человека. Таким образом, слизистая оболочка полости носа является доступным объектом исследования и может использоваться для экспресс-диагностики ряда заболеваний. Носовая полость густо заселена микроорганизмами, причем распределение микроорганизмов различно в зависимости от места локализации. Слизистая оболочка полости носа является интересным объектом исследования, микробиота имеет большое количественное и видовое разнообразие. С помощью газовой хроматографии можно проводить ускоренную (менее двух часов) индикацию микроорганизмов по спектру специфических компонентов их мембран или специфическим продуктам пиролиза и гидролиза клеточных препаратов [4]. Газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ-МС) показала себя как наиболее быстрый и чувствительный метод с высокой разрешающей способностью. Первоначально он применялся для изучения природных микробных сообществ. Бактериям свойственно большое разнообразие ЖК и жирных альдегидов. ЖК в бактериях входят в состав различных классов липидов: фосфолипидов, гликолипидов,

гликофосфолипидов, орнитин- и лизинсодержащих липидов, ацилглицеринов, эфиров жирных кислот, липопротеинов и липополисахаридов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, некоторых других липидов [1-4].

Цель работы

охарактеризовать видовую структуру микробиоты полости носа у больных полипозным риносинуситом по результатам массспектрометрии микробных маркеров. В данной работе проведен ряд исследований по созданию методики определения химических маркеров микроорганизмов в слизистой оболочке полости носа.

Пациенты и методы

Обследовано 104 больных полипозным риносинуситом в возрасте от 17 до 60 лет. Всем пациентам проводились углубленное клиническое и параклинические обследования (общий анализ крови, иммунологическое исследование крови, ринопневмометрии, пульсоксиметрия), а также исследование микробиоты носоглотки с использованием метода массспектрометрии микробных маркеров (МСММ) Для изучения микробной флоры полости носа проводилось исследование соскоба из глубоких отделов носа методом МСММ. Соскоб забирали сухими стерильными щеточками в силиконовом футляре (зонд одноразовый стерильный Эндобраш). Метод МСММ позволяет в ускоренном режиме, минуя стадию культивирования и тестовых ферментаций, определить спектр доминирующих микроорганизмов (более 104 клеток в пробе) по молекулярным маркерам — клеточным высшим жирным кислотам, альдегидам и стеринам [8-10] Суть анализа состоит в прямом извлечении с помощью ряда химических реакций высших жирных кислот из подлежащего исследованию образца, их разделении на газовом хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализе состава в динамическом режиме на массспектрометре. По результатам анализа маркеров микробного сообщества относительно длительности заболевания обнаружена значительная зависимость качественного и количественного состава микробиоты от срока болезни. При анализе средних значений в меньшей сроке болезни определялась минимальная колонизация микробами при наименьшем разнообразии видов в слизистой оболочке. Среди них присутствовали аэробы *Streptococcus* spp., *Str. pneumoniae*, *Moraxella* cat., *Nocardia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Corineform CDC-group XX*, *Staphylococcus*, *Nocardia asteroides* и анаэробы *Clostridium propionicum*, *Lactobacillus*, *Cl. difficile*, *Prevotella*, *Eubacterium/Cl. coccoides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium*, *Propionibacterium/Cl. subterminale*, *Propionibacterium acnes*, *Ruminococcus*, *Actinomycetes 10Me14*, *Actinomyces viscosus*, *Propionibacterium jensenii*. При длительной сроке болезни определялись грибы актиномицеты, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Mycobacterium/Candida* и вирус Herpes. Как оказалось, наибольшее общее число микроорганизмов и их значительное разнообразие было характерно для пациентов болевших более 5 лет, когда слизистый полости носа является «вакциной лабораторией» и оказывает существенное влияние на формирование адаптивного иммунитета [5]. При этом среди аэробов определялись *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Str. pneumoniae*, *Moraxella* cat., *Nocardia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Corineform CDC-group XX*, *Staphylococcus*, *Helicobacter pylori*, h18; *Enterococcus*, *Nocardia asteroides*, а среди анаэробов — *Peptostreptococcus anaerobius*, *Porphyromonas*, *Lactobacillus*, *Cl. difficile*, *Prevotella*, *Eubacterium/Cl. Coccoides*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium*, *Propionibacterium/Cl. Subterminale*. Интересно, что у больных длительным сроком болезни было выявлено большое разнообразие микроорганизмов при сравнительно незначительном их общем количестве. Среди них встречались *Staf/ aurens* аэробы *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Str. pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia asteroides* и анаэробы *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium*

propionicum, *Selenomonas*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Eubacterium/Cl. coccoides*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium*, *Propionibacterium/Cl. subterminale*, *Propionibacterium acnes*, *Ruminococcus*, *Actinomyces viscosus*, *Propionibacterium jensenii*. К тому же у всех детей этой группы определялись грибы актиномицеты, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium/Candida* и вирус *Herpes minicoccus*, *Actinomycetes Actinomyces viscosus*. Для клинической практики весьма важно, что среди этих микроорганизмов определяются как аэробы, так и анаэробы, вирусы и грибы. На сегодняшний день доказано: для анаэробных микроорганизмов формирование ассоциаций с аэробами позволяет находить защиту от вредных последствий воздействия кислорода. Очевидно, что анаэробные микроорганизмы в условиях биопленки защищены от токсического воздействия кислорода за счет их взаимодействия с кислородопотребляющими аэробами, которые редуцируют естественный уровень насыщенности кислородом [8-10]. С этой точки зрения важным диагностическим преимуществом метода МСММ по сравнению с культуральными методами является следующее: в число определяемых маркеров микроорганизмов входят не только те, что располагаются на поверхности биопленки, но и те, что находятся внутри микробных ассоциаций, из которых химические вещества жизнедеятельности микроорганизмов могут поступать на поверхность. Результаты МСММ демонстрируют в одном анализе присутствие как резидентной (*Actinomyces*, *Clostridium* spp., *Candida*, *Lactobacillus* spp., *Mycobacterium* spp., *Neisseria* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Treponema* spp.), так и факультативной микрофлоры (*Alcaligenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium/Cl. coccoides*, *Str. pneumoniae*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Campylobacter mucosalis*, *Corineform CDCgroup XX*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium ramosum*, *Cl. difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Eubacterium*, *Herpes*, *Helicobacter pylori*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium/Cl. subterminale*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Selenomonas*, *Streptomyces*). Такое разнообразие микроорганизмов на поверхности слизистой оболочки носа больных полипозным риносинуситом выполняет двоякую роль. С одной стороны, микроорганизмы участвуют в переваривании пищи, обеспечивают баланс между сапрофитной и условно-патогенной флорой, поддерживая иммунитет слизистой оболочки.

Из полученных данных видно, что маркеры некоторых микроорганизмов определяются лишь у отдельных больных, поэтому они должны индивидуально учитываться при анализе микробного паспорта. В то же время нам удалось выявить целый ряд микроорганизмов, который демонстрирует единую тенденцию изменений в зависимости от срока болезни: *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Alcaligenes*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium/Candida*, *Cl. difficile*, *Prevotella*, *Eubacterium/Cl. coccoides*, *Staphylococcus*, *Helicobacter pylori*, *h18*, *Enterococcus*, *Herpes*, *Ruminococcus*, *Actinomycetes 10Me14*, *Actinomyces viscosus*. Когда эти микроорганизмы являются участниками инфекционного процесса (*Clostridium*, *Eubacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Helicobacter pylori*), то обладают высокой патогенетической активностью, а вызванные ими заболевания трудно поддаются лечению и полипозный процесс может распространяться за пределами носа [10].

Выводы

1. Использование метода МСММ позволяет оценить экосистему носа у больных полипозным риносинуситом с учетом различных видов бактерий, грибов и даже вирусов.
2. Результаты исследования микробиоты носа у больных полипозом, по данным МСММ, свидетельствуют о наличии сукцессии в количественных показателях видового состава микрофлоры в зависимости срока и распространенности патологического процесса.
3. С помощью метода МСММ удастся определять индивидуальные свойства микробиоты слизистой оболочки носа у больных полипозным риносинуситом, что позволяет рекомендовать данный метод к использованию в клинической практике оториноларинголога.

В заключение необходимо отметить, что изучение микробных ассоциаций у больных полипозным риносинуситом для оториноларингологов крайне важно, так как анализ микробиоты носа даст возможность адекватно оценивать развитие воспаления и устранять патологический процесс без повреждения экологии слизистых оболочек.

Литература/References

1. Хроматография в биологии и медицине: сб. научн. трудов / под ред. Р.Т. Тогузова, М.И. Савиной. - Москва: 2-й МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова, 1985. — 158 с.
2. Зеленин, К.Н. Газовая хроматография в медицине / К. Н. Зеленин / Соросовский образовательный журнал. — 1996. — № 11. — С. 20 — 22. Persing, D. H. Polymerase chain reaction: trenches to benches / D. H. Persing // J. Clin. Microbiol. - 1991. - Vol. 29, № 7. - p. 1281 - 1285.
3. Fenollar, F. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections / F. Fenollar, V. Roux, A. Stein, M. Drancourt, D. Raoult // J. Clin. Microbiol. - 2006. - Vol. 44, № 3. - p. 1018 - 1028.
4. Михайлова, Д. О. Диагностическое значение различных иммунологических методов лабораторной диагностики легионеллеза / Д.О. Михайлова, З. Д. Бобылева, В. В. Базарный, Е. П. Амон, Я. Б. Бейкин, Л. Т. Беседина, О. В. Мельникова, В. П. Шилова, С. М. Розанова, Е. Ю. Перевалова // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол. — 2008. — № 2. - С. 51-53.
5. Пат. 2086642 Российская Федерация, С12N 1/00, 1/20, С12Q 1 /4. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов / Г. А. Осипов ; Приоритет от 24 дек. 1993г. Осипов, Г. А. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах / Г. А. Осипов, А. М. Демина // Вестник РАМН. - 1996. - Т.13, №2. - С. 52 - 59.
6. Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Воропаева М.С. Микробиоценозы открытых полостей и мукозальный иммунитет. Эффективная фармакотерапия. 2013;27:611. [Afanas'ev SS, Aleshkin VA, Voropaeva MS. Microbiocenosis open cavities and mucosal immunity. Effektivnaja farmakoterapija. 2013;27:611. (In Russ.)].
7. Примак Т.Д. Изменения местных факторов защиты и микробиоты ротоглотки у детей при острых инфекционных заболеваниях. Успехи современного естествознания. 2004;10:1921. [Primak TD. Changes to local factors and the protection of the oropharynx microbiota in children with acute infectious diseases. Uspehi sovremennogo estestvoznaniya. 2004;10:1921. (In Russ.)].
8. Булатова Е.М., Богданова Н.М. Значение кишечной микробиоты и пробиотиков для формирования иммунного ответа и здоровья ребенка. Вопросы современной педиатрии. 2010;6:3744. [Bulatova EM, Bogdanova NM. The value of the intestinal microbiota and probiotics to generate an immune response and child health. Voprosy sovremennoj pediatrii. 2010;6:3744. (In Russ.)].