29. Т.А. Крымцева, Г.А. Осипов, Н.Б. Бойко, Я.А. Соколов, А.М. Демина, Т.В. Радюшина, Д.Г. Осипов. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов. Журн. Микроб. Эпидем. Иммун. 2003, № 2: 92-101.

Т.А. Крымцева, Г.А.Осипов, Н.Б. Бойко, Я.А.Соколов,

А.М.Демина, Т.В.Радюшина, Д.Г. Осипов

Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов

Академическая группа академика РАМН Ю.Ф.Исакова;

ГосНИИ биологического приборостроения Минмедбиопрома, Москва

Методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС) в профиле жирных кислот мочи и вагинальной жидкости у женщин и эякулята у мужчин, обнаружены минорные липидные компоненты (МЛК) (менее 1%), которые не встречаются в клетках млекопитающих. Предполагается, что их происхождение обусловлено микроорганизмами, колонизирующими урогенитальные органы в норме и при инфекционных патологиях. Минорные жирные кислоты (МЖК) биологических жидкостей урогенитального тракта (УГТ) организма человека сопоставлены с составом жирных кислот (ЖК) чистых культур микроорганизмов. Характер статистических изменений концентраций ЖК в 500 пробах биологических жидкостей УГТ показывает, что липидные маркеры микробного происхождения (при воспалительных заболеваниях УГТ) имеют более широкий диапазон количественных изменений, выходящий за пределы значений, характерных для здоровых людей, и коррелируют в ряде случаев с диагнозом заболевания или результатами бактериологического исследования. Достоверность отнесения данных маркерного анализа подтверждена отличием состава микроорганизмов УГТ в норме и патологии, корреляцией с клиникой патологических отклонений, уменьшением (до нуля или нормального значения) концентраций маркеров патогенов в результате лечения антибиотиками, а также адекватностью состава микроорганизмов УГТ, определенного методом маркеров и культурально-биохимическим методом (по литературным данным).

ВВЕДЕНИЕ

Состав основных высших жирных кислот мочи, вагинальной жидкости женщин и семени мужчин известен и содержит, как и другие жидкости и ткани человека, четные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с числом углеродных атомов от 12 до 26 (С 12-С 26). Из нечетных ЖК обнаружены (С 15) пента- и гептадекановые (С 17) в минорных количествах (1-2%), а также С 25 [32].

Липиды микроорганизмов содержат больший набор ЖК в отличие от липидов клеток млекопитающих. Поэтому специфичные для микробов компоненты липидов (маркеры микроорганизмов) можно обнаруживать на фоне биологической жидкости человека. Возможности метода маркера в области практической медицины мало изучены, особенно в детектировании микроорганизмов непосредственно в биологической жидкости без выделения чистых культур. Предпринимались попытки обнаружения микроорганизмов, содержащих β-оксимиристиновую кислоту, контроль менингококка по наличию β-оксилауриновой кислоты в крови [21], диагностика возбудителя гонореи Neisseria gonorrhoae методом ГХ-МС в режиме масс-фрагментографии [46].

Данные состава липидных компонентов микроорганизмов экологического, биотехнологического и клинического значения послужили основой для целей хемодифференциации бактерий в чистых культурах, разработки общего подхода к определению родового и видового состава микробных ассоциаций по липидным маркерам и профилям [4,43] в том числе для предварительного определения микроорганизмов в клинических пробах при микст-инфекции [5, 6]. Микробные липидные маркеры обнаружены в крови людей. Статистически оценено состояние их гомеостаза в норме и изменение концентраций в патологии [1,17]. Метод рекомендован к использованию для диагностики анаэробов при урогенитальных инфекциях Центральным научно-исследовательским кожно-венерологическим институтом [9].

В предлагаемой работе поставлена задача изучения минорных компонентов жирнокислотного состава биологических жидкостей на уровне ниже 1% и поиска липидных маркеров микроорганизмов с целью их последующего использования для экспрессного анализа видового состава микробных сообществ УГТ. Приводятся результаты обобщения данных по определению МЖК в вагинальной жидкости, эякуляте и моче и степени их значимости в оценке состава микрофлоры урогенитальных органов в норме и патологии. Мы не имеем возможности прямого параллельного сопоставления результатов наших исследований с данными идентификации микроорганизмов, полученными традиционными методами, из-за сложности организации подобного эксперимента (пробу для сопоставления пришлось бы адресовать одновременно в различные лаборатории) Поэтому подтверждение факта обнаружения маркера того или иного микроорганизма мы ищем в связи с патологическим процессом в организме пациента в виде корреляции с данными обследования, анамнезом или эффектом последующей терапии.

Материалы и методы.

В работе использованы данные анализа проб вагинальной жидкости и мочи женщин-доноров, а также женщин, пациентов врача-гинеколога; проб эякулята и мочи мужчин из районных поликлиник, диагностических и лечебных центров, а также пациентов, обратившихся к нам через Интернет.

Образцы проб. Мазки вагинального содержимого в количестве 50 мг подвергали кислому метанолизу (КМ) в 0.4 мл 1М HCl в метаноле в течение одного часа при 80°С. Мочу в количестве 5 мл с осадком (после предварительного отстаивания в холодильнике) центрифугировали, осадок отделяли и высушивали с добавлением метанолаи подвергали КМ. Полученные жир-

ные кислоты в виде метиловых эфиров двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 15 мин при 80°С для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот, спиртов и стеринов.

Аппаратура. Реакционную смесь эфиров в количестве 1-2 мкл анализировали в разное время на ГХ-МС системах HP-5985B, 5993, 5973B Хьюлетт-Паккард (США), а также QP-2000 и 5050 фирмы Шимадзу (Япония). Для управления и обработки данных использовали штатные программы приборов. Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой Ультра-1, HP-1, HP-5 Хьюлетт-Паккард длиной 25 м и внутренним диаметром 0.2 мм, а также аналогичных импортных или отечественных колонках. Режим анализа 120°С - 2 мин, далее програмирование температуры 5 град/мин до 300-320 град. Масс-спектрометр - квадрупольный, с ионизации электронами (70эв) работал в режиме полного сканирования при определении состава основных липидных компонентов пробы (низкая чувствительность). Для выборочного детектирования целевых маркеров микроорганизмов в режиме высокой чувствительности и на превалирующем фоне биологической жидкости использовали метод селективных ионов (масс-фрагментографии, МФ) при периодическом сканировании серии аналитических ионов в пяти интервалах времени. Интервалы и ионы выбирали таким образом, чтобы селективно определять маркеры целевых микроорганизмов. В том числе использовали сильный ион m/z = 87 для детектирования малых количеств жирных кислот С10-С20, выбрав интервалы групп так, чтобы обойти интенсивные пики кислот С16 и С18, доминирующие в жирнокислотном профиле клетокхозяина. Для определения β-оксикислот в программу вводили общий для гомологического ряда ион 175 и специфические для каждой кислоты ионы типа М-15, а для α-оксикислот - ионы типа М-59. Соответствующие специфические ионы использовали для жирных спиртов и стеринов. Дополнительными параметрами для идентификации веществ использовали относительные времена хроматографического удерживания и соотношения площадей пиков селективных ионов.

Результаты

Основными компонентами (более 1%) всех исследованных жидкостей УГТ человека являются четные кислоты с 12 - 18 атомами углерода: 18:1, 16:0, 18:2, 18:0, 16:1 (в порядке уменьшения содержания в профиле ЖК), а также холестерин в вагинальном содержимом и семени (Таблица 1).

Иногда величину 1% превышает содержание длинноцепочечных кислот С 20 - С 26 . Нечетные кислоты - 15:0 и 17:0 составляют около 1% каждая. Их содержание постоянно в липидных профилях здоровых и больных людей, что позволяет использовать в качестве инварианта (внутреннего стандарта) при относительных измерениях. Содержание разветвленных кислот, в основном С 15 и С 17, составляет максимум несколько десятых процента. В вагинальной жидкости имеется 19сус (циклононадекановая кислота), как компонент клеток аэробных бактерий рода Lactobacillus (палочки Додерлейна), которые являются нормальными обитателями вагины. 3-Оксикислоты в жидкостях УГТ здоровых людей отсутствуют (менее 0,01 %) за исключением h16 и h18. В семенной жидкости обнаружены жирные альдегиды С 16 и С 18.

Как отмечалось, целью исследования является не только констатация состава жирных кислот изучаемых биологических жидкостей, но и поиска в нем специфических минорных липидных компонентов (маркеров) микроорганизмов и доказательства их специфичности. Действительно, изучение МЖК позволило выявить компоненты, характерные для микробных липидов (Таблица 2).

Ряд веществ - оксикислоты h12, h14, h10, 2h14; циклопропановая кислота 17сус - не обнаруживаются у доноров.

Экспериментальные данные,приведенные в таблицах 2 и 3, нормированы на величину пика гептадекановой кислоты, которая, по нашим многочисленным наблюдениям, имеет постоянную концентрацию в биологических жидкостях человека и животных. Ее содержание составляет 20 мкг/мл в крови и в жидкостях с высоким содержанием липидов, а именно в вагинальной жидкости, семени, гное, мокроте и т.п. Обнаружено, что все МЖК обязательно встречаются у больных пациентов, но содержание МЖК меняется у них в разных пределах

Статистический анализ, проведенный по пакету программ Statistica, показал разделение множества значений концентраций большинства МЖК на два кластера. В таблице 3_приведены абсолютные диапазоны концентраций, а также значения максимумов кластеров. Разделение множества значений их концентраций у разных пациентов на два кластера свидетельствует в пользу экзогеного микробного происхождении МЖК. Первый из них, более узкий, имеющий нормальное распределение, близок к уровню содержания соответствующих МЖК у доноров, по-видимому соответствует норме. Второй кластер с широким, несимметричным распределением содержит множество значений, превышающих уровень содержания МЖК у доноров. Его следует отнести к патологическим отклонениям. Действительно сопоставление данных анализа МЖК с клинической картиной заболевания подтверждает это предположение. Например, для пациентов с диагнозом гонорея характерно наличие 3-гидроксидодекановой кислоты (h12). При вагинитах или других воспалительных процессах наблюдается появление или увеличение по сравнению с нормой маркеров микроорганизмов, вызывающих инфекцию. Например, антеизо-кислоты - при стафилококковой аэробной инфекции или гидроксидекановая, 2-гидроксилауриновая - при псевдомонадной инфекции ; изомиристиновая кислота, i14- при выявлении Peptostreptococcus anaerobius или гидрокси-изо-кислоты - характерные для Bacteroides . Увеличение концентрации 10-метилоктадекановой (туберкулостеариновой) кислоты обнаружено у больных туберкулезом, а увеличение в моче 3-гидроксиоктадекановой кислоты, специфичной для Helicobacter pylori, в большинстве случаев наблюдается у пациентов с гастритом или язвой желудка. Появление 3-гидроксиизоэйкозановой, 3-гидроксиэйкозановой, 3-гидроксидокозановой кислот, содержащихся в клетках Chlamidia trachomatis, характерно для пациентов с хламидиозом.

Мы обнаружили, что при обследовании каждого отдельного больного выявляется существенное (на уровне второго кластера, или более чем на 3σ) увеличение одного или нескольких МЛК из 75 постоянно контролируемых. Это привело к предположению, что соответствующие этим маркерам микроорганизмы размножаются сверх нормы, и пациент «болен» по этим микробам, а по остальным «здоров». Естественно, это не относится к строгим патогенам, передаваемым половым путем: гонококку, хламидиям, трепонеме, для которых нормой является их отсутсвие. Можно считать нормой отсутствие большинства грамотрицательных микроорганизмов, так как их маркеры, оксикислоты, у многих пациентов не обнаруживаются (т.е. находятся за пределами чувствительности метода). Маркеры всех прочих микроорганизмов, являющихся симбионтами организма человека и условными патогенами, должны иметь соответственно двоякий статус: симбионта или патогена. Вероятно, переход в патогенное состояние связан с увеличением концентрации клеток микроорганизма в локусе, что проявляется в сдвиге распределения концентраций с образованием отдельного кластера.

Приведенные соображения свидетельствуют в пользу микробного происхождения обсуждаемых минорных жирных кислот и минорных липидных компонентов биологических жидкостей УГТ. А дальнейшее их отслеживание и оценка в качестве маркеров микроорганизмов, для которых они специфичны, имеет диагностическую значимость при инфекционных патологиях.

Для определения диагностической значимости МЛК биологических жидкостей УГТ, относимых нами к микробным, необходимо сопоставить полученные данные концентраций конкретных веществ с известными данными о составе микробиоценозов организма человека и

липидным составом самих микроорганизмов. Здесь мы приводим данные исследования вагинальной микрофлоры, как наиболее изученной, отнеся результаты исследования биологических жидкостей УГТ мужчин к отдельной публикации.

Обобщенные сведения по вагинальному микробиоценозу можно найти в фундаментальном руководстве для клиницистов [33] и в монографии, посвященной изучению этиологии и патогенеза анаэробной инфекции у акушерских и гинекологических больных [13]..

В вагинальном микробном сообществе различают нормальную и условно-патогенную микрофлору, а также возбудителей венерических и других заболеваний, передаваемых половым путем. К нормальной микрофлоре относят лактобациллы, бифидобактерии, коринебактерии и эпидермальный стафиллококк. Количественный бактериологический анализ вагинального сообщества здоровых женщин показал, что в 1г вагинальной жидкости содержится 10^8 клеток аэробных и 10^9 клеток анаэробных бактерий (16). В основном это Lactobacillus, Peptococcus, Bacteroides, Staphilococcus epidermidis, Corinebacterium spp., Peptostreptococcus spp., Eubacterium. Ранговое расположение доминирующей микрофлоры, исходя из концентраций более 10*5 КОЕ/г, имеет следующий порядок: Lactobaccilus spp., Peptococcus spp., Bacteroides spp., Staphylococcus epidermidis, corynebacterium spp., Peptostreptococcus spp., Eubacterium spp.

В зависимости от степени чистоты влагалища в микрофлоре УГТ могут присутствовать гнилостные бактерии родов Bacillus, Proteus, Clostridium, Spirochaeta. Их разделяют с гноеродными бактериями, представляющими как локализованную , так и генерализованную инфекцию. Ее наиболее частые возбудители - патогенные стафиллококки, стрептококки, Pseudomonas aeruguinosa, Proteus, E.coli, Klebsiella, Serratia, Enterobacter, Flavobacterium meningosepticum, Neisseria meningitidis [24]. Кроме того, возможно наличие микроскопических грибов, а также Peptostreptococcus, ассоциированных с Bacteroides и Trichomonas [44]. У женщин с бактериальным вагинитом наиболее часто встречаются Gardnerella vaginalis, Prevotella spp., Bacteroides ureolyticus, Prevotella corporis, Bacteroides levii, Fusobacterium nucleatum, Mobiluncus species, Peptostreptococcus prevotii, Peptostreptococcus tetradius, Peptostreptococcus anaerobius, Streptococcus viridans, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis [8, 25].

Микобактерии туберкулеза не часто выявляют в патологии урогенитальных органов, хотя проблема женского генитального туберкулеза явно существует, судя по литературным данным [2, 29]. Остаются актуальными вопросы диагностики, передачи инфекции половым путем и связанного с ней бесплодия. Отсутствие рутинного контроля микобактерий видимо связано со сложностью культивирования этих микроорганизмов.

Изучение клеточных компонентов микроорганизмов УГТ показало, что многие бактерии имеют четкие маркеры (по литературным данным).

***Lactobacillus*.** Нормальная микрофлора вагины предполагает наличие лактобацилл - палочек Дедерлейна. Аэробные лактобациллы имеют в качестве маркера лактобацилловую кислоту [48], которая может встречаться и у других бактерий, псевдомонад и некоторых энтеробактерий. Однако, другие микроорганизмы редко обнаруживаются в вагинальной жидкости в заметных концентрациях и могут быть учтены, как будет видно позднее, в уравнении баланса концентраций жирных кислот.

Chlamydia trachomatis. Этот внутриклеточный паразит имеет сразу три маркерных оксикислоты: 3-оксиэйкозановую (3h20), 3-окси-изоэйкозановую (3hi20) и 3-оксидокозановую кислоту (3h22) [52], которые удобны для масс-спектрометрического детектирования.

Mycobacterium tuberculosis. Неспецифическим тестом на микобактерии, выполняемом методом ГХ или ГХ-МС, является детектирование туберкулостеариновой кислоты в очаге инфекции[33]. Дополнительные данные, полученные недавно по 3-оксикислотам липидов микобактерий позволяют его сделать специфичным для *M.tuberculosis* и других представителей рода [14] . Маркером *M.tuberculosis* при этом оказалась 3-OH-2,4,6-триметил-тетракозановая кислота.

Eubacterium. Эти бактерии обнаруживаютсяв урогенитальных изолятах. Их маркер, дегидрохолестерол (копростанол) присутствует в вагинальной жидкости [6]. Известно также, что копростанол является продуктом интерактивного метаболизма *Eubacterium* и клеток организма-хозяина [40]. Он легко определяется хроматографически и используется в качестве маркера фекальных загрязнений окружающей среды [41].

Corinebacterium urealyticum. Этот нормальный обитатель вагины имеет специфические маркерные вещества - миколовые кислоты. Они обладают уникальным строением - наличием гидроксила в положении 3 и алифатического радикала С10-С16 в положении 2 молекулы. Для *C.urealyticum* известны кислоты вида 28:2, 28:1, 30:3, 30:2, 32:3, 32:2, причем таксономически значимыми являются 30:3 и 28:1 [27].

Klebsiella. *K.pneumoniae* имеет отличительный признак - 2-оксимиристиновую кислоту в составе ЛПС, которая в данном сообществе оказывается маркером рода (собственные измерения).

Peptostreptococcus anaerobius. Показано, что этот микроорганизм имеет в профиле ЖК редко встречающиеся четные изокислоты с числом атомов углерода от десяти до шестнадцати [39]. Максимальной в профиле является изотетрадекановая кислота i14, которую можно использовать в качестве маркера.

Bacillus. Присутствие бацилл можно детектировать по специфическим разветвленным кислотам с 13 атомами углерода: i13 и a13.

Pseudomonas. Псевдомонады имеют четкие маркеры из состава С10 и С12 оксикислот, являющиеся факторами видовой хемодифференциации. В качестве родового признака удобно использовать 2-оксидекановую кислоту. [49].

Clostridium perfringens. Имеет четкие маркеры, 10-оксистеариновою и 10-оксиоктадеценовою [6, 8] характерные для группы клостридий, включающей, кроме *C.perfringens*, также *C.histolyticum* и *C.oedematiens*. Эти вещества не являются клеточными компонентами самих клостридий, а связаны с разложением клеток ткани макроорганизма бактериальными ферментами [31].

Clostridium sp. В исследуемых пробах обнаруживается тетрадеценовая кислота, которую по нашему банку данных следует отнести к группе клостридий, включающей *C.histolyticum, C.lentoputrescens* и другие [38]. В некоторых случаях этот маркер может относится также к *Streptococcus pneumonia*.

Bacteroides fragilis. Анаэробные бактерии группы *B.fragilis* имеют в качестве маркера три оксикислоты: изогептадекановую (основную), гексадекановую и антеизогептадекановую [22].

Streptococcus. Группа оральных стрептококков *S.mutans, S.salivarius* и др. имеют в составе деканову кислоту С10 [47]. Кроме того, есть интенсивные маркеры среди ненасыщенных кислот: 7,8-гексадеценовая (16:1Δ7) и 11,12-октадеценовая (18:1Δ11). Эти кислоты были обнаружены нами при анализе клинических штаммов *S.mitis, S.oralis, S.intermedius*. Энтерококки группы *S.faecalis, S.faecium* также могут быть обнаружены при их лидерстве в сообществе по лактобацилловой (19cyc) кислоте [11].

Candida albicans. Специфическим признаком этих микроскопических грибов в липидной фракции биологических жидкостей человека является гептадеценовая кислота (17:1).

Микроскопические грибы. Неспецифическим маркером клинически значимых микроскопических грибов (*Aspergillus, Candida, Mucor* и др.) являются стерины: эргостерол [15], кампестерол и ситостерол [26].

Flavobacterium (Sphingobacterium) Представители этого рода известны в патологии воспалительных процессов половых органов женщин [54], а также в инфекционной патологии новорожденных. В последнем случае инфекция передается плоду от матери. Поэтому мы сочли необходимым их контролировать. Флавобактерии имеют изогептадеценове. кислоте i17:1, а также разветвленные нечетные 2-оксикислоты в составе клеточных сфинголипидов (2hi15,

2hi17), которые могут служить маркерами в клинических пробах [49].

Streptomyces. В клетках представителей порядка *Actinomycetales* (актиномицетов) рода *Streptomyces* присутствует значительное количество изогексадекановой кислоты i16 [35]. В литературе есть данные об участии стрептомицетов в воспалительных процессах в организме человека [3, 36].

Другие актиномицеты Обнаружены и часто встречаются особенно у мужчин жирные кислоты с разветвлением у десятого атома углерода 10Me16 (*Rhodococcus*), 10Me14 (*Actinomadura*), а также транс-изомер 9,10-гексадеценовой кислоты 16:1d9t (*Rhodococcus rhodochrous*) [35].

Helicobacter. Практически везде в профиле минорных компонентов жидкостей УГТ присутствует оксиоктадекановая кислота h18. Известны два вида микроорганизмов, для которых характерна эта оксикислота: *Francisella tularensis* и *Helicobacter pylori* [23]. *Francisella* является возбудителем туляремии и ее присутствие у обследуемых нами пациентов маловероятно. Поэтому наличие h18 следует отнести к *Helicobacter pylori* или к неизвестному пока источнику. *H.pylori* традиционно связывают с язвой желудка и двенадцатиперстной кишки, но обнаружен также в изъязвлениях языка [19] и склеротических бляшках сосудов [20].

Neisseria gonorrhoaea. Гонококк характеризуется высоким содержанием 3-оксилауриновой кислоты, которое составляет 10-20% суммарного профиля ЖК. Несколько меньше содержание 3-оксимиристиновой кислоты [46, 49]. Эти кислоты являются частью липида А в ЛПС нейссерий, а также псевдомонад и ацинетобактера, являющихся возможными членами микробного сообщества УГТ. Их перекрывание может быть учтено в простой формуле, поскольку альтернативные организмы имеют маркеры. Кроме того, они обычно отсутствуют в пробах (нет 2h12) и вся величина 3h12 приходится на долю гонококка. Как показывает статистическая обработка данных (n=150) содержание 3h12 не коррелирует ($k<0,05$) с 2h12 и 3h14, что означает, что при данных условиях анализа и профиле жирных кислот реальных клинических штаммов гонококка и конкурирующих микроорганизмов 3-оксидодекановая кислота является специфическим маркером гонококка.

Bacteroides urealyticum. Этот микроорганизм может быть ассоциирован с 3-оксигексадекановой кислотой в биологических жидкостях человека. Его содержание составляет 12% в составе клеточных ЖК [22].

Fusobacterium, Haemophylus. Единственным отличительным компонентом в клеточных ЖК этих бактерий является 3-оксимиристиновая кислота (3h14) [28], которая к тому же встречается и у других грамотрицательных организмов клинического значения, таких как *E.coli, Klebsiella, Serratia* и другие. Поэтому *Fusobacterium, Haemophylus* могут быть определены лишь по остатку 3h14 после учета указанных выше бактерий.

Staphylococcus. Известно, что стафилококки содержат нечетные изо- и антеизо-разветвленные кислоты с числом атомов углерода 15,17 и 19 [45]. Три клинически важных вида этого рода бактерий (*S.aureus, S.haemolyticus, S.epidermidis*) могут быть приближенно разделены при использовании разницы в соотношении этих кислот в профиле ЖК.

Corinebacterium (дифтероиды)-Listeria. После учета всех микроорганизмов, имеющих в составе ЖК антеизо-гептадекановую кислоту, часто наблюдается остаток. Представляется наиболее вероятным отнести его за счет неучтенных коринебактерий, известных особенно высоким содержанием кислот a15 и a17, и по этому признаку выделенных в отдельную группу CDC A-3,A-4, A-5, B-1a, B-3a, B-1b, B3b, *Corinebacterium aquaticum* (а также листерий и бревибактерий) [18].

Обсуждение

Проведенное исследование состава ЖК биологических жидкостей пациентов гинеколога и уролога показало, что все они содержат минорные количества (менее 1% от суммы жир-

ных кислот) липидных компонентов – оксикислот, разветвленных и циклопропановых кислот и стеринов. Ряд из них имеет бесспорно микробное происхождение. Статистическая обработка данных позволила выявить два множества (кластера) значений концентраций минорных ЖК. Один из них с меньшим значением средних величин можно отнести к норме, а другой – с высоким средним уровнем – к патологии, т.е. к воспалительному процессу. Мы считаем эту работу началом исследования минорных липидных компонентов (МЛК) биологических жидкостей УГТ, , поскольку их содержание в УГТ с большой долей вероятности может быть обусловлено микроорганизмами. Сведения, полученные с учетом знания МЖК, могут быть использованы в целях контроля за инфекционными заболеваниями, дисбиозом и воспалительными процессами УГТ организма человека, а такжеза заболеваниями, передающимися половым путем.

В этой статье мы хотели показать возможность предварительной экспрессной оценки широкого спектра микроорганизмов УГТ по их химическим маркерам и перспективу его использования в качестве альтернативного метода экспрессного контроля инфекции и воспалительных процессов.

Таблица 2 .
Состав минорных липидных компонентов биологических жидкостей урогенитального тракта (нг/мл)

№	Вещество, краткое* обозначение	Вагинальная жидкость, пациентки гинеколога n=47	Вагинальная жидкость, доноры, женщины n=9	Моча, пациенты уролога n=59	Моча, доноры, мужчины n=7	Семя, пациенты уролога n=59
1	10h18*	3400	500	800	400	720
2	hi17	80	0	280	0	20
3	a13	80	60	240	40	140
4	a19	120	140	80	80	160
5	i14	520	400	800	580	680
6	i15	680	620	1700	280	1300
7	hi20	0	0	20	0	20
8	19cyc	120	60	100	40	120
9	17cyc	20	0	40	0	20
10	h14	60	40	160	0	120
11	a15	1020	1520	4120	1000	3340
12	h12	20	0	80	0	60
13	10Me18	60	40	60	60	60
14	17:1	1200	860	620	460	560
15	h16	400	640	1580	0	1240
16	hi15	40	40	40	0	20
17	h10	20	0	40	0	20
18	i17:1	0	0	40	0	20

19	18:d11	280	40	620	100	700
20	17:0	20000	20000	20000	20000	20000
21	2h14	60	0	40	0	40
22	10:0	280	400	720	380	400
23	Копростанол	80	40	180	60	180
24	h16	380	240	520	140	440
25	14:1	140	20	480	0	320
26	2h12	40	0	80	0	20
27	a17	4540	3260	5280	4520	4760
28	h18	180	40	380	20	280

* Обозначение веществ как в сноске к таблице 1

Таблица 3.
Пределы концентраций (мкг/мл) микробных маркеров в биологических жидкостях урогенитальных органов и максимумы кластеров.

	Жирная кислота		Вагинальная жидкость (n=47)		Семя (n=59)		Моча n=100	
№	Краткое* обозначение	Название	Диапазон	Кластеры	Диапазон	Кластеры	Диапазон	Кластеры
1	10h18	10-оксистеариновая	0-20	0,4/4	0,2-7	0,4/1,2	0,2-6,4	0,4/0,8
2	hi17	Изогептадекановая	0-2,8	0**	0-0,6	0	0-3,6	0/-
3	a13	Антеизотридекановая	0-0,8	0	0-1	0,1/-***	0-1,6	0,06/0,4
4	a19	Антеизононадекановая	0-0,8	0	0,04-1,2	0,2/0,4	0-0,4	0/-
5	i14	Изомиристиновая	0-2,6	0,4/1,6	0,1-3,6	0,1/-	0,16-2,8	0,4/0,9
6	i15	Изопентадекановая	0,04-0,4	0,6/-	0,1-5,2	1/0,4	0,4-5	1,2/2,6
7	hi20	Гидроксиизоарахиновая	0-0,2	0/-	0-0,3	0/-	0-0,8	0/-
8	19cyc	Циклононадекановая	0-1,4	0/-	0-0,4	0/-	0-0,6	0/-
9	17cyc	Циклогептадекановая	0-0,4	0/-	0-0,3	0/-	0-0,34	0/-
10	h14	Гидроксимиристиновая	0-0,4	0/-	0-1,4	0/-	0,02-5,2	0,06/0,3
11	a15	Антеизопентадекановая	0,4-7	0,4/1,4	0,2-8	2,2/2,4	0,8-10,4	4/8
12	h12	Гидроксилауриновая	0-0,2	0/-	0-0,4	0/-	0-0,8	0/-
13	10Me18	Туберкулостеариновая	0-0,6	0/-	0-2,4	0,05/-	0-0,4	0/-
14	17:1	Гептадеценовая	0,06-6,6	0,8/2	0,1-3	0,4/0,8	0,2-1,4	0,3/0,8
15	i16	Изостеариновая	0-6,4	0,2/1	0-4	0,8/4	0,4-2,6	0,5/1,8
16	hi15	Гидроксиизопентадекановая	0-0,5	0/-	0-0,2	0/-	0-0,8	0/-
17	h10	Гидроксидекановая	0-0,4	0/-	0-0,4	0/-	0-0,4	0/-
18	i17:1	Изогептадеценовая	0-0,2	0/-	0-0,3	0/-	0-0,8	0/-
19	18:d11	цис-Вакценовая	0-4,6	0,2/1	0-2,4	0,6/1,2	0-3,6	0,36/1,8
20	17:0	Маргариновая (инвариант)	20	20	20	20	20	20
21	2h14	2-Гидроксимиристиновая	0-0,6	0/-	0-0,6	0/-	0-0,6	0,2/-

22	10:0	Декановая	0-3,4	0,2/0,8	0-2,6	0,04	0-6	0,4/1,2
23	Копро-станол	Дигидрохолестерол	0-1,6	0/-	0-1,4	0/0,2	0-0,9	0/0,1
24	h16	Гидроксипальмитино-вая	0-2,2	0,2/0,6	0-1,2	0,4/-	0-3,6	0,5/-
25	14:1	Тетрадеценовая	0-1	0,2/-	0-2,8	0,4/0,8	0-4,6	0,1/0,4
26	2h12	2-гидроксилауриновая	0-1,4	0/-	0-0,4	0/-	0-1,7	0/-
27	a17	Антеизогептадекановая	1-13,2	4,2/-	1,2-13,4	4,8/-	1,6-8,8	4,8/-
28	h18	Гидроксистеариновая	0-1,8	0/-	0-0,8	0/-	0-2,8	0/-

* Обозначение веществ как в сноске к таблице 1
** Один кластер при нулевом значении в случаях патогенных или условно-патогенных микроорганизмов
*** Второй кластер не выявлен

Литература

1. Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином. Вестник РАМН. 1999, 16(7): 25-31.
2. Колачевская Е.Н. Клиническое течение и диагностика женского генитального туберкулеза. Проблемы туберкулеза. 1994, 6: 26-29.
3. Минскер О.Б., Егорова Е.В. Актиномикоз женских половых органов. Сов. Мед. 1967, 6: 102-107.
4. Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов. Патент РФ № 2086642. 1997. C12N 1/00, 1/20, C12Q 1/4/. Приоритет от 24 дек.1993 г.
5. Осипов Г.А., Белобородова Н.В. Способ выявления возбудителя инфекционного процесса в стерильных биологических средах макроорганизма. Патент РФ № 2146368 от 10.03.2000. Бюл.№ 7 Кл. 7G ol N 33/48, 33/52. Приоритет от 21.10.97 г.
6. Осипов Г.А., Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах. Вестник РАМН. 1996,13 (2): 52-59.
7. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Богомолов П.О. Сравнительное хромато-масс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и биоптатах слизистой оболочки кишечника. Российский гастроэнтерол.журнал. 2001, 1:54-69
8. Осипов Г.А.,Шабанова Е.А., Бабайцева В.А., Недорезова Т.П. Ходорковская В.А., Истратов В.Г., Сергеева Т.И., Чирикова Е.В. Способ диагностики клостридиальной анаэробной газовой инфекции. Патент РФ № 2021608 кл. G01N 33/50/- Зарегистрировано в гос.реестре 15.10.94. - Бюл.№ 19.
9. Роль анаэробов в возникновении урогенитальных инфекций. Пособие для врачей. ЦНИКВИ, 1998, 16 с.
10. Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Урогенитальные микоплазмозы. Обзор. Медицина и здравохранение. Серия: «Акушерство и гинекол.» 1990,1.
11. Седов В.И., Пинчук Л.М. Состав высших жирных кислот энтерококков. Журн.Микроб.Эпидем.Иммун. 1982, 9: 49-59.
12. Турова Е.С., Осипов Г.А. Изучение структуры микробного сообщества, активного в биотрансформации минералов железа в каолине. Микробиология, 1996, 65(5), 682-689.

13.Цвелев Ю. В., Кочеровец В. И., Кира Е. Ф., Баскаков В. П. Анаэробная инфекция в акушерско-гинекологической практике. Спб: Питер Пресс, 1995, -320с.-(Серия "Практическая медицина") .
14.Allugupalli S., Portaels F., Larsson L. Systematic study of the 3-hydroxy fatty acid composition of mycobacteria. J.Bacteriol. May 1994, 176(10): 2962-296.
15.Axelsson B.-O., Saraf A., Larsson L. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography - mass spectrometry. J.Chromatogr.B. 1995, 666(1):77-84.
16.Bartlett J.G., Polk B.F. Bacterial flora of the vagina: quantitative study.-Rev.Infect.Dis. 1984, 6,Suppl. 1, 67-72.
17.Beloborodova N.V., Osipov G.A. 2000. Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship. Microb.Ecol.Heal.Dis., SCUP, 12: 12-21.
18.Bernard K.A, Bellefeuille M., Ewan E.P. Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporooogenous, aerobic gram-positive rods. J.Clin.Microbiol. 1991, 29(1): 83-89
19.Birek C., Grandhi R., McNeil K. et al. Detection of Helicobacter pylori in oral aphthous ulcers. J.Oral.Pathol.Med. 1999, 28(5): 197-203
20.Bora Farsak, Aylin Yildirir, Yakut Akycn et al. Detection of Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylory DNA in Human Atherosclerotic Plaques by PCR. - J.Clin.Microbiol. 2000V.38,№ 12: 4408-4411.
21.Brandtzaeg P., Bryn K., Kierulf P. et.al. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. J.Clin.Invest. 1992,89:816-823.
22.Brondz I., Olsen I. Multivariate analyses of cellular fatty acids in Bacteroides, Prevotella, Porhyromonas, Wolinella and Campylobacter spp. - J.Clin.Microb., 1991, V 29 (1) :183-89.
23.Geis G., Leying H., Suerbaum S., Opferkuch W. Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of Helicobacter pylori. J.Clin.Microbiol. 1990, 28(5): 930-932
24.Hammann R. A Predssessment of the microbial flora of the female genital tract with special reference to the occurrence of Bacteroides spp. -J.Med.Microbiol. 1982, V.15, 3: 239-302 .
25.Hillier S.L., Krohn M.A., Rabe L.K. et al. Clin Infect Dis. 1993, June (16),Supp.4: 273-81.
26.Howell S.A., Moore M.K., Mallet A.I., Noble W.C. Sterols of fungi responsible for superficial skin and nail infection. J.Gen.Microbiol. 1990, 136,241-47.
27.Herrera-Alcaras E., Valero-Guillen P., Martin-Luengo F., Canteras-Jordana M. Numerical analysis of fatty and mycolic acid profiles of Corynebacterium urealyticum and other related corynebacteria. 1993, Microbiologia Sem.(9): 53-62.
28.Jantzen E., Berdal B.P., Omland T. Fatty acid taxonomy of Haemophilus species, Pasteurella multocida, Actinobacillus actino-mycetemcomitans and Haemophilus vaginalis (Corinebacterium vaginale). Acta Path.Microbiol.Scand. 1991, 88B: 89-93.
29.Kabra S.K. Congenital tuberculosis. N.Engl.J.Med.1994, 331(8):548.
30.Kaneda T. Fatty acids in the genus bacillus: an example of branched chain preferences. Bacteriol.Rev. 1977, 41:391-418.
31.Koichi T. On the production of hydroxy fatty acids and fatty acids oligomers in the course of adipocere formation. Nippon Hoigaku Zasshi.1984,38(3):257-272.
32.Lenzi A et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy.- Hum.Reprod.Update, 1996, May-June 2(3) : 246-56.
33.Manual of Clinical Microbiology. 5-th ed. Editor in Chief - Albert Balows. Washington, 1991.
34.Maitza S.K., Schotz M.C., Yoshikawa T.T., Guze L.B. Defermination of lipid A and endotoxin in serum by mass-spectroscopy. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.1978,V.75: 3993.

35.McNabb A., Shuttleworth R., Behme R.et al. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as means of identification. J. Clin.Microbiol. 1997, 35(6), 1361-1368.
36.McNeil M.M., Brown J.M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin.Microbiol.Rev. 1994, 7(3): 357-417.
37.Miyagawa E. Cellular fatty and fatty aldehyde composition of rumen bacteria. J.Gen.Appl.Microbiol. 1982, 28: 389-408.
38.Moss C.W. Characterization of clostridia by gas chromatography. 1. Differentiation of species by cellular fatty acids. -Appl.Microbiol. 1967, 15(2), 390-397.
39.Moss C.W., Lambert M.A. Lombard G.L. Cellular fatty acids of Peptococcus variabilis and Peptostreptococcus anaerobius.. J.Clin.Microbiol. 1977, 5(6): 665-7.
40.Mott G.E., Brinkley A.W. Plasmonylethanolamin: growth factor for cholesterol-reducing Eubacterium. J.Bacteriol. 1979,139(3):755-760.
41.Nichols P.D., Leeming R., Rayner M.S., Latham V. Use of capillary gas chromatography for measuring fecal-derived sterols. J.Chrom., 1996, A 733: 497-509.
42.Nurminen M. Chemical characterization of Chlamydia trachomatis LPS. - Infection and Immunity. 1985, 48(2): 573-75.
43.Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry. Microbial community of kaolin. FEMS Microbiol.Rev. 1997, 20: 437-446.
44.Person K. et al. Prevalence of 9 different microorganisms in the female genital tract. A comparison between women from a venerial decease clinic and from a health control department. Brit.J.Vener.Dis.,1979, 55(6), 429-33
45.Stoakes L., John M.A., Lannigan R. et al. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. Clin.Microbiol. 1994 Aug.; 32(8): 1908-10
46.Sud I.J., Feingold D.S. Detection of 3-hydroxy fatty acids of picogram levels in biologic specimens. A chemical method for the detection of Neisseria gonorrhoeae?// The Journal of Investigative Dermatology. 1979,v.73,p521-526.
47.Tsuchiya H., Masaru S., Kato M. et al. High-Perfomance Liquid Chromatographic analysis of bacterial fatty acid composition for chemotaxonomic characterization of oral streptococci. J.Clin.Microbiol. 1986, 24(1): 81-85.
48.Veerkamp J.H. Fatty acid composition of Bifidobacterium and Lactobacillus. J.Bacteriol. 1971, 108(2): 861-867.
49.Weyant R.S., Moss C.W., Weaver R.E., Hollis D.G., Jordan J.G., Cook E.C., Daneshvar M.J. Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negativ Aerobic and Facultatively Anaerobic bacteria. Second edition. Williams and Wilkins, 1996.