

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»
«Научно-исследовательский институт общей реаниматологии
им. В.А. Неговского»**

**В.В. Мороз, Н.В. Белобородова, А.Ю. Оленин, Е.А. Черневская,
А.Ю. Бедова, А.К. Паутова, Ю.Н. Саршор**

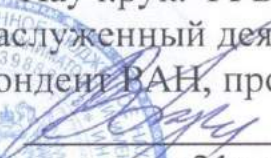
**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ
МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
В АНЕСТЕЗИОЛОГИИ-РЕАНИМАТОЛОГИИ
МЕТОДАМИ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Методические рекомендации

Москва 2017

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей реаниматологии
им. В.А. Неговского»**

«УТВЕРЖДАЮ»

Науч.рук. ФГБНУ «НИИОР»
заслуженный деятель науки РФ
член-корреспондент ВАН, профессор, д.м.н.

В.В. Мороз
«31» октября 2016 г.



**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ
МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
В АНЕСТЕЗИОЛОГИИ-РЕАНИМАТОЛОГИИ
МЕТОДАМИ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Методические рекомендации

одобрены Ученым Советом НИИОР им. В.А. Неговского,
протокол № 11 от 25.10.2016

Москва 2016

УДК (543.544.43+543.51+616.94)
ISBN 978-5-9906781-3-2

Рецензенты: профессор каф. аналитической химии МГУ им. М.В.Ломоносова,
докт.хим.наук И.А.РЕВЕЛЬСКИЙ
зав.каф. анестезиологии-реаниматологии НМХЦ
им. Н.И.Пирогова, докт.мед.наук, профессор М.Н. ЗАМЯТИН

Учреждение-разработчик: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А. Неговского»

Составители: член-корреспондент РАН, профессор В.В. МОРОЗ
зав.лаб.НИИОР, докт.мед.наук, профессор Н.В.БЕЛОБОРОДОВА
ст. науч.сотр. НИИОР, канд.хим.наук А.Ю. ОЛЕНИН
ст. науч.сотр. НИИОР, канд.биол.наук Е.А. ЧЕРНЕВСКАЯ
ст. науч.сотр. НИИОР, канд.биол.наук А.Ю. БЕДОВА
науч.сотр. НИИОР А.К. ПАУТОВА
науч.сотр. НИИОР Ю.Н. САРШОР

Методические рекомендации предназначены для внедрения в клиническую практику методики количественного определения ароматических метаболитов в сыворотке крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Данная лабораторная методика позволяет получать объективную информацию о тяжести состояния, бактериальной интоксикации и органных дисфункций по уровню фенолкарбоновых кислот (ФКК) в сыворотке крови. Опыт показывает, что при оказании диагностической и лечебной помощи больным в критических состояниях мониторинг уровня ФКК позволяет объективно оценивать эффективность проводимого лечения и своевременно осуществлять коррекцию лечебных мероприятий. Методические рекомендации предназначены для специалистов в области газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, работающих в области лабораторной диагностики совместно с анестезиологами-реаниматологами, хирургами, специалистами в области экстракорпоральной детоксикации. Данные методические рекомендации также будут востребованы клиническими фармакологами, специалистами в области антимикробной терапии и клиническими микробиологами.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 15-15-00110.

Данный документ является собственностью ФГБНУ «ФНКЦ РР» и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего согласования с учреждением-разработчиком

СОДЕРЖАНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
РАЗДЕЛ 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ФЕНИЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В КЛИНИКЕ	9
ЭТАП 1. Фенилкарбоновые кислоты при гнойно-воспалительных заболеваниях	9
ЭТАП 2. Фенилкарбоновые кислоты у хирургических больных.....	13
РАЗДЕЛ 2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....	17
Материалы и методы	17
Методика количественного определения фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови	18
РАЗДЕЛ 3. КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ	22
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	33
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	34

СОКРАЩЕНИЯ

АД – артериальное давление
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АЛТ – аланинаминотрансфераза
БК – бензойная кислота
БСТФА – (N,O-бис-триметилсилил)трифторацетамид
ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия
ГХ-ПВД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием
ИВЛ – искусственная вентиляция легких
ИКМТ – инфекция кожи и мягких тканей
ИР – интерквартильный размах
КЩС – кислотнo-щелoчное состояние
ЛПС – липополисахарид
МКБ – международная классификация болезней
ОРИЛ – отделение реанимации и интенсивного лечения
п-ГБК – пара-гидроксibenзойная кислота
п-ГФМК – пара-гидроксифенилмолочная кислота
п-ГФПК – пара-гидроксифенилпропионовая кислота
п-ГФУК – пара-гидроксифенилуксусная кислота
ГВК – гомованилиновая кислота
ПОН – полиорганная недостаточность
СМЖ – спинномозговая жидкость
ТБД – трахеобронхиальное дерево
ТМС – триметилсилильное производное
ФБС – фибро-бронхоскопия
ФКК – фенилкарбоновые кислоты
ФМК – фенилмолочная кислота
ФПК – фенилпропионовая кислота
ФУК – фенилуксусная кислота
ХПН – хроническая почечная недостаточность
ЦВД – центральное венозное давление
ЦНС – центральная нервная система
ЧД – частота дыхательных движений
ЧСС – частота сердечных сокращений
APACHE II – шкала оценки тяжести Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
D5-БК – D5-бензойная кислота
SOFA – шкала оценки тяжести Sepsis-related Organ Failure Assessment
WBC – white blood cells – лейкоциты

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрос интерес зарубежных и российских ученых к фенольным метаболитам микробного происхождения. Показано, что их содержание существенно повышается в сыворотке крови больных при наличии инфекции бактериальной этиологии и сепсисе, что может быть использовано для диагностики и мониторинга эффективности проводимой терапии. Адаптация современных высокотехнологичных методов диагностики к условиям клинических лабораторий является важной задачей научных центров для повышения качества и доступности медицинских услуг.

Путем детального изучения профиля низкомолекулярных соединений в крови реанимационных больных методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС) среди сотни изученных метаболитов выделены несколько, наиболее достоверно коррелирующих с тяжестью состояния и выраженностью симптомов сепсиса [1-3]. Эти клинически значимые соединения условно названы сепсис-ассоциированными ароматическими микробными метаболитами [4]. В микробиологических экспериментах продемонстрирована способность условно-патогенных и госпитальных микроорганизмов (возбудителей гнойно-септических заболеваний) и анаэробных бактерий (основных представителей микробиоты человека) продуцировать эти соединения. На сегодняшний день, по мере накопления фактического материала, наибольшая диагностическая значимость отведена трем низкомолекулярным ароматическим соединениям из группы фенилкарбоновых кислот (ФКК): пара-гидроксифенилмолочной (п-ГФМК), пара-гидроксифенилуксусной (п-ГФУК) и фенилмолочной (ФМК) кислотам [3]. Именно эти три кислоты повышаются в крови больных при развитии послеоперационных осложнений, пневмонии, сепсиса [5].

Концентрации ФКК в крови возрастают до максимальных у больных с сепсисом при неблагоприятном исходе, поэтому оценка суммарного уровня ФКК имеет важное прогностическое значение [6]. Статистически значимые различия между умершими и выжившими больными получены для ФМК и п-ГФМК. Во всех группах больных максимальный вклад в суммарную концентрацию ФКК обуславливали два метаболита — п-ГФМК и п-ГФУК [5], при этом высокий уровень п-ГФУК в большой степени определялся выраженностью почечной недостаточности [7].

На сегодняшний день с использованием метода газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием установлены референсные значения для клинически-значимых ФКК в крови здоровых людей. Показано, что эти ФКК постоянно в очень низких концентрациях присутствуют в сыворотке, тем самым отражая процесс интеграции метаболизма человека и его микробиоты [8,9]. При заболеваниях и состояниях, протекающих без инфекционных осложнений, уровень ФКК в крови остается практически без изменений, в пределах физиологических значений, например — у кардиохирургических больных, после операций с искусственным

кровообращением, при гладком течении послеоперационного периода [5], у пострадавших с изолированной черепно-мозговой травмой [10] и др. Однако у аналогичных больных с осложнениями, в развитии которых существенную роль играет микробный фактор, концентрация ФКК более чем в 3 раза превышала этот показатель у здоровых людей ($p < 0,05$), достигая максимального уровня в последнем образце крови – в случае летального исхода [5, 10].

При критических состояниях наблюдается выраженный дисбаланс профиля ФКК [11]. Связь между метаболическим профилем ФКК и исходом заболевания послужил основой для научной гипотезы о роли микробных метаболитов в механизмах танатогенеза. В настоящее время ведутся фундаментальные исследования в этом направлении, которые поддержаны грантом Российского научного фонда (грант РНФ №15-15-00110). В частности доказано, что в зависимости от химической структуры ФКК по-разному участвуют в развитии митохондриальной дисфункции (продукция ROS, блокирование комплекса I дыхательной цепи, подавление активности ферментов цикла Кребса [12-14]), способствуют развитию органной недостаточности, негативно влияют на фагоцитарную активность нейтрофилов [15] и др.

В 2014 году американские коллеги опубликовали результаты ГХ-МС тестирования 187 низкомолекулярных метаболитов в крови реанимационных больных с целью поиска маркеров – предикторов летального исхода. В данном исследовании выжившие и умершие больные статистически значимо различались по концентрации п-ГФМК и ФМК [16], что еще раз подтверждает необходимость внедрения в клиническую практику современных технологий измерения концентраций ФКК в крови больных.

РАЗДЕЛ 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ФЕНИЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В КЛИНИКЕ

В Методических рекомендациях представлены результаты обследования 219 взрослых людей, из них 147 больных и 72 здоровых (контроль).

Критерии включения: больные хирургического или реаниматологического профиля, с разными нозологическими формами заболеваний – в зависимости от цели исследования.

Критерии исключения: больные моложе 18 и старше 80 лет; больные с хронической почечной недостаточностью; хронической печеночной недостаточностью; больные, находящиеся на лечении иммуносупрессорами.

Получение образца крови: в большинстве случаев использовали сыворотку, полученную в ходе плановых процедур забора крови, так как для исследования ФКК требуется малый объем сыворотки (0,2 мл).

ЭТАП 1. Фенилкарбонные кислоты при гнойно-воспалительных заболеваниях

Цель: сравнение сывороточных концентраций ФКК в группах больных с разной степенью тяжести гнойно-воспалительного заболевания.

Группа I. Больные с локальной гнойной инфекцией кожи и мягких тканей (n=15, 7 мужчин, 8 женщин), медиана возраста 48 (ИР 31-64) лет. Состояние удовлетворительное или средней тяжести, больные на амбулаторном лечении. Образцы крови взяты до хирургической санации гнойно-воспалительного очага. В группу включены больные со следующими заболеваниями: абсцедирующий фурункул (n=9), абсцесс мягких тканей (n=5), абсцедирующий гидраденит (n=1). Продолжительность заболевания до хирургической санации очага инфекции составила 5 (ИР 4-7) дней (табл. 1).

Группа II. Больные с тяжелой бактериальной инфекцией (n=42, 21 мужчина, 21 женщина). Обследованы больные в тяжелом состоянии, поступившие в отделение реанимации и интенсивного лечения с бактериальным воспалительным процессом – пневмония или/и перитонит. Медиана возраста больных 67 (ИР 57-75) лет. Продолжительность пребывания в ОРИЛ до взятия образца сыворотки крови составила 3 (ИР 2-5) дня (табл. 1). Дополнительно больным производились оценка состояния по международным шкалам APACHE II и SOFA.

Таблица 1. Группы больных и нозологические формы бактериальных инфекций

Группы	Нозологические формы	Число больных (n)
Больные в амбулаторной хирургии (n=15)	• абсцедирующий фурункул	9
	• абсцесс мягких тканей	5
	• абсцедирующий гидраденит	1
Тяжелые больные в реанимационном отделении (n=42)	• пневмония	25
	• перитонит	12
	• перитонит + пневмония	5

Всего: 57

В табл. 2 приведены результаты сравнения сывороточных концентраций ФКК в группах обследованных больных и здоровых доноров, полученные с применением метода газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД).

Таблица 2. Уровни фенолкарбоновых кислот и клинико-лабораторные показатели в группах сравнения

Показатель	Медиана (ИР 25-75)			<i>p</i>		
	1-Доноры (n=72) *	2-Больные амбулатор. хирургии (n=15)	3-ОРИЛ (n=42)	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
ФМК, мкМ	0,6 (0,5-0,8)	0,9 (0,7-1,6)	2,9 (1,6-9,9)	0,005	<0,001	<0,001
п-ГФУК, мкМ	1,0 (0,7-1,5)	2,9 (2,3-3,4)	11,0 (3,2-43,0)	<0,001	<0,001	0,002
п-ГФМК, мкМ	1,5 (1,1-1,8)	3,2 (2,3-4,1)	7,4 (3,3-23,3)	<0,001	<0,001	0,006
WBC, $\times 10^9/\text{л}$	6,2 (5,3-7,5)	11,4 (10,1-12,3)	13,7 (9,2-19,3)	<0,001	<0,001	0,117
T, °C	36,6 (36,6-36,6)	37,3 (37,2-37,5)	37,7 (37,0-39,2)	<0,001	<0,001	0,332
ЧСС, уд. в мин	н/д	78 (72-82)	100 (84-111)	—	—	<0,001

* Данные опубликованы авторами ранее, см [9]

У всех больных с бактериально-воспалительным процессом, включенных в исследование обнаружены статистически значимые повышения в сыворотке крови уровней ряда ФКК (ФМК, п-ГФУК и п-ГФМК) в сравнении со здоровыми людьми. Данные, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о повышении температуры тела и числа лейкоцитов у больных, но достоверных различий с группой здоровых доноров нет. Как видно из таблицы, ФКК, содержащие гидроксильную группу (производные тирозина), лучше отражают тяжесть течения бактериального воспалительного процесса.

Сумма трех клинически-значимых ФКК ($\sum 3$ ФКК) также различалась в подгруппах 2 и 3 по сравнению со здоровыми донорами (рис.1).

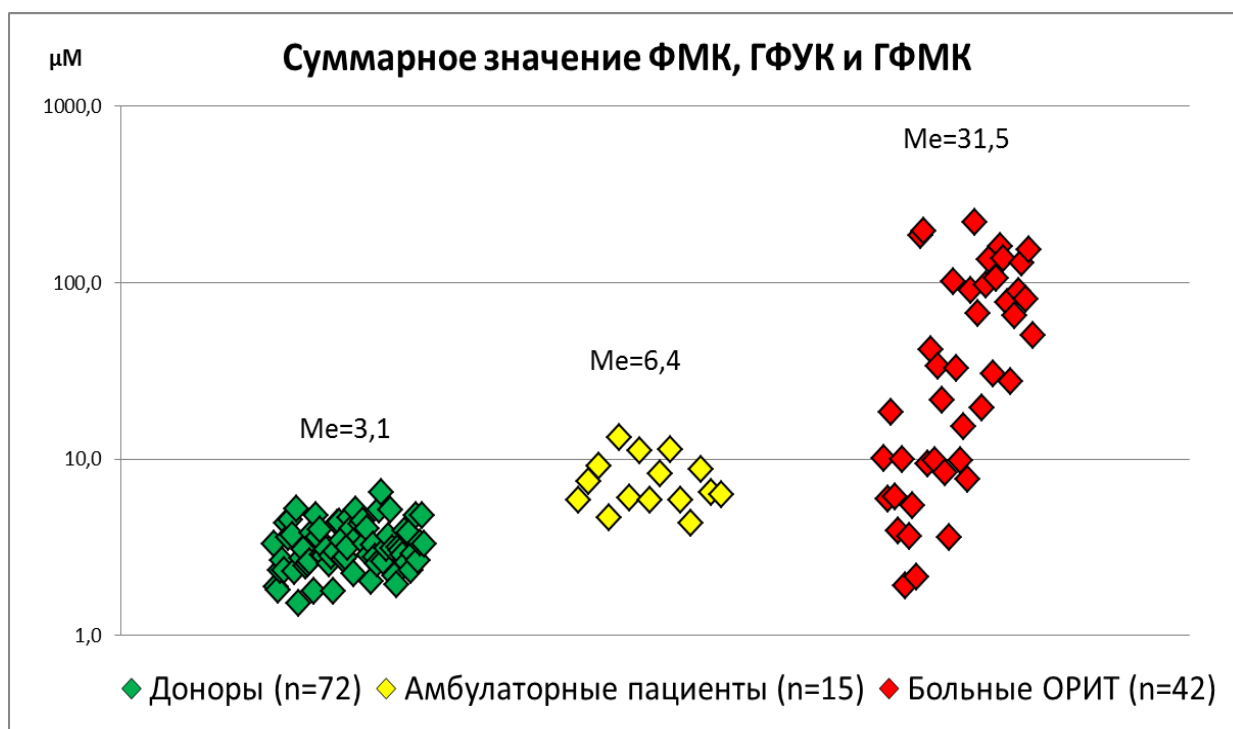
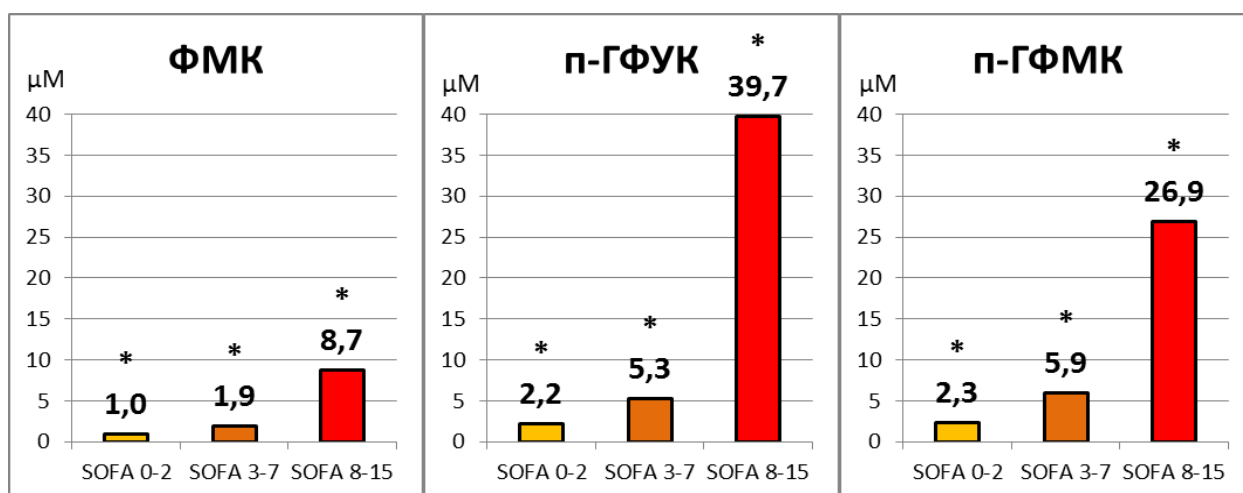


Рисунок 1. Сумма концентраций трех метаболитов: ФМК, п-ГФУК и п-ГФМК ($\sum 3$ ФКК) в сыворотке крови больных и в группах сравнения.

В соответствии с тяжестью состояния реанимационные больные (группа ОРИЛ, n=42) были разделены на три подгруппы:

- Оценка по шкале SOFA 0-2 балла, n=10, в том числе пневмония (n=3), перитонит (n=6), перитонит + пневмония (n=1).
- Оценка по шкале SOFA 3-7 баллов, n=14, в том числе пневмония (n=8), перитонит (n=4), перитонит + пневмония (n=2). В 57% случаев (n=8) бактериальный воспалительный процесс сопровождался развитием двух и более общеклинических признаков системной манифестации инфекции (сепсис).
- Оценка по шкале SOFA > 8 баллов, n=18, в том числе пневмония (n=14), перитонит (n=2), перитонит + пневмония (n=2). В 90% случаев (n=16) бактериальный воспалительный процесс сопровождался развитием двух и более общеклинических признаков системной манифестации инфекции (сепсис).

Уровни ФКК достоверно различались в указанных подгруппах, и по мере нарастания баллов шкалы SOFA в каждой последующей подгруппе были практически в два раза выше, чем в предыдущей. Результаты представлены визуально на рис. 2.



* $p < 0,05$ в сравнении с другими подгруппами

Рисунок 2. Сравнение концентраций фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови больных в подгруппах разной степени тяжести по шкале SOFA.

Сравнение других традиционных клинико-лабораторных показателей сепсиса, таких как лейкоцитоз, температура и ЧСС в тех же подгруппах показало достоверное повышение данных показателей только в подгруппе больных с оценкой по шкале SOFA > 8. Следовательно, в данном исследовании уровень ФКК достоверно отражал тяжесть инфекционного процесса.

В группе ОРИЛ (n=42) проведена оценка корреляционной взаимосвязи уровней ФКК с показателями шкал оценки тяжести состояния больных (табл.3).

Таблица 3. Корреляционная взаимосвязь с показателями тяжести состояния больных (n=42).

Показатель	Значение показателя Медиана (25-75%)	Коэффициент корреляции		
		ФМК	п-ГФУК	п-ГФМК
Креатинин, мкМ	118 (83-257)	0,643 ³	0,674 ³	0,754 ³
Общий билирубин, мМ	14,6 (10,6-25,0)	0,386 ¹	0,037	0,302
Систолическое артериальное давление, мм рт.ст.	121 (112-130)	-0,484 ²	-0,228	-0,588 ³
Диастолическое артериальное давление, мм рт.ст.	68 (60-73)	-0,338 ¹	-0,349 ¹	-0,555 ³
APACHE II, баллы	16 (9-26)	0,740 ³	0,733 ³	0,872 ³
SOFA, баллы	7 (3-12)	0,810 ³	0,668 ³	0,834 ³

Примечание: коэффициент корреляции Спирмена ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$.

В соответствии со шкалой Чеддока высокой считается корреляционная взаимосвязь в диапазоне 0,7-0,9. Таким образом, в результате исследований выявлена высокая прямая корреляция ФКК со шкалами APACHE II и SOFA (табл. 3), что позволяет рекомендовать использование трех ФКК (ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК) в качестве маркеров, объективно оценивающих тяжесть состояния больных в реаниматологии.

Результаты исследования показали, что больные с бактериальной инфекцией характеризуются статистически значимым повышением в сыворотке крови уровня ФМК, п-ГФУК и п-ГФМК в сравнении со здоровыми людьми (Табл.2). В то же время рутинные показатели воспаления и инфекции (лейкоцитоз, гипертермия) у больных достоверно не различаются с группой здоровых. Таким образом, уровни ФКК, содержащих гидроксильную группу, объективно отражают тяжесть состояния на фоне бактериальной интоксикации и имеют преимущества по сравнению с общепринятыми показателями.

На основании проведенных ранее исследований в отличие от ФМК, п-ГФУК и п-ГФМК уровень фенилпропионовой кислоты (ФПК) не только не повышался, но и полностью исчезал у большинства больных в критическом состоянии. По нашим данным, ФПК регистрируется практически у 100% здоровых доноров, несколько реже – у амбулаторных больных с локальной инфекцией кожи и мягких тканей – в 80% случаев (у 12 из 15 больных), и крайне редко встречается у больных группы ОРИЛ. Исчезновение ФПК из сыворотки крови больных с тяжелым инфекционным процессом (сепсисом) согласуется с полученными ранее данными [17, 18]. Можно полагать, что отсутствие ФПК является одним из индикаторов выраженных нарушений гомеостаза в организме больного.

ЭТАП 2. Фенилкарбоновые кислоты у хирургических больных

Цель: оценить диагностическую значимость ФКК у наиболее тяжелого контингента абдоминальных хирургических больных.

Исследовались образцы крови больных (n=58, 26 мужчин, 32 женщины), поступивших в отделение реаниматологии после экстренных полостных операций, выполненных в связи с перфорацией (n=35) и острой непроходимостью (n=24) кишечника (табл.4). Медиана возраста 64 (ИР 52-78) лет. При поступлении в ОРИЛ тяжесть состояния больных по шкале APACHE II составила 8 (ИР 5-16) баллов. Летальность за период лечения в отделении реаниматологии составила 41% (n=24).

Таблица 4. Структура болезней у обследованных хирургических больных

Хирургические заболевания	Осложнение хирургического заболевания	Летальность в ОРИЛ, %
Язвенная болезнь 12-перстной кишки (n=5)	Перфорация кишечника (n=35)	43
Травма кишечника (n=5)		
Дивертикулярная болезнь кишечника (n=4)		
Острые сосудистые болезни кишечника (n=5)		
Опухоль кишечника (n=10)		
Острый аппендицит (n=6)	Острая непроходимость кишечника (n=23)	39
Спайки брюшной полости (n=6)		
Опухоль кишечника (n=15)		
Грыжа брюшной стенки (n=2)		
Всего	58	41

При поступлении в отделение реаниматологии органная дисфункция (нарушение функции двух или более жизненно важных систем органов) была выявлена в 64% случаев (n=37), бактериально-воспалительные осложнения - в 60% случаев (n=35), в процессе интенсивного лечения в ОРИЛ в 22% случаев (n=13) присоединились кардиальные осложнения (декомпенсация хронической сердечной недостаточности или острый инфаркт миокарда с развитием полиорганной недостаточности).

Установлено, что у больных с острыми хирургическими заболеваниями органов брюшной полости уровень ФМК в сыворотке крови отражает тяжесть состояния. Выявлена корреляционная связь ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК и их суммарного уровня в сыворотке крови с оценкой тяжести состояния по шкале APACHE II (r_s 0,624; 0,757; 0,763 и 0,804, соответственно, $p < 0,05$). При наличии у больных полиорганной недостаточности (ПОН) уровень ФМК в сыворотке крови повышен в сравнении со здоровыми донорами ($p < 0,05$) и больными без ПОН ($p < 0,05$).

Сывороточные концентрации ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК, а также их суммарный показатель обладают высокой информативностью для оценки тяжести состояния и прогнозирования летального исхода у больных с острыми хирургическими заболеваниями органов брюшной полости, осложненных перфорацией и острой непроходимостью кишечника. Важно отметить, что однопараметрический способ прогнозирования на основе сывороточной концентрации одной п-ГФМК по своей точности не уступает общепринятым шкалам APACHE II и SOFA, которые являются многопараметрическими, более трудоемкими и дорогостоящими.

В группе абдоминального сепсиса, а именно у больных с острыми хирургическими заболеваниями, осложненных перфорацией и острой

непроходимостью кишечника, показано, что динамика суммарной концентрации ФКК в сыворотке крови объективно отражает эффективность лечения. Так, интенсивное лечение больных с абдоминальным сепсисом к 3 суткам следует считать эффективным при снижении суммарной концентрации трех ФКК не менее чем на 30%. Напротив, при нарастании суммарной концентрации трех ФКК на 60% и более лечение следует считать неадекватным, с риском летального исхода >30%, что требует от врача незамедлительной переоценки клинической ситуации и коррекции интенсивной терапии.

Обобщенные результаты обследования 147 больных представлены графически (рис.3) и наглядно демонстрируют у больных многократное возрастание в крови (по сравнению со здоровыми) концентраций гидроксилированных ФКК наряду с исчезновением ФПК.

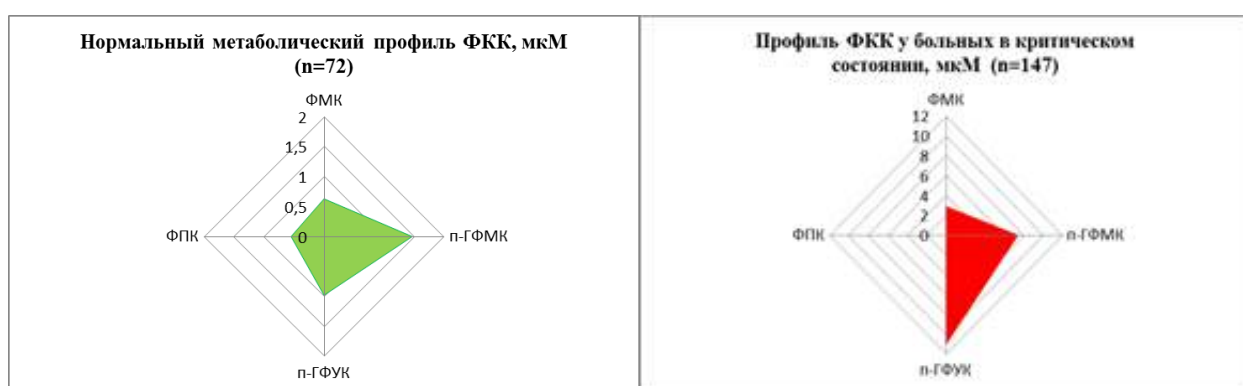


Рисунок 3. Графическое изображение профиля ФКК по четырем клинически-значимым метаболитам: ФПК, ФМК, п-ГФМК, п-ГФУК (значение медианы, мкМ) у больных по сравнению со здоровыми.

Для качественного и количественного определения наиболее значимых ФКК – ФМК, п-ГФУК и п-ГФМК – в сыворотке крови разработана методика жидкость-жидкостной экстракции с последующими дериватизацией и анализом на ГХ-ПВД [19], а также определены значения ФКК в сыворотках крови здоровых доноров [9]. Кроме того получено свидетельство об аттестации «Методики измерений молярной концентрации фенолкарбоновых кислот: 2-гидрокси-3-фенилпропановой кислоты, 4-гидроксибензилуксусной кислоты, 3-(4-гидроксифенил)-2-гидроксипропановой кислоты, в образцах сыворотки крови методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием» [20].

Однако использование ГХ-МС имеет ряд преимуществ, что особенно важно при проведении поисковых и научно-исследовательских работ:

1) Пламенно-ионизационный детектор является универсальным детектором, позволяющим проводить идентификацию соединений исключительно по временам удерживания. Поскольку определение ФКК проводится в экстракте из сыворотки крови, то, несмотря на условия пробоподготовки, нивелировать влияние матрицы оказывается затруднительным: количественное определение БК, ФУК и ФПК в

разработанных условиях в большинстве случаев невозможно из-за наложения пиков искомым веществ и посторонних компонентов матрицы.

2) Поиск новых низкомолекулярных биомаркеров является актуальной задачей, выполнение которой возможно только с использованием селективного детектора, такого как масс-спектрометр.

Использование ГХ-МС позволило расширить перечень исследуемых ФКК и включить такие ФКК, как бензойную (БК), пара-гидроксибензойную (п-ГБК), пара-гидроксифенилпропионовую (п-ГФПК) и гомованилиновую (ГВК) кислоты, поскольку имеются экспериментальные и литературные данные об их потенциальной клинической значимости [21- 23].

В настоящих методических рекомендациях включены результаты ГХ-МС анализа по выявлению калибровочных зависимостей ароматических метаболитов (БК, ФПК, ФМК, п-ГБК, п-ГФУК, п-ГФПК, п-ГФМК и ГВК), построенных по методу добавок на сыворотке здорового добровольца; определению содержания перечисленных ФКК у здоровых доноров и количественному определению данных ФКК у больных в реаниматологии.

РАЗДЕЛ 2. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Средства измерений

- Газовый хромато-масс-спектрометр фирмы Thermo Scientific, включающий газовый хроматограф Trace GC 1310 и масс-спектральный детектор ISQ LT.
- Кварцевая капиллярная колонка TR-5ms фирмы Thermo Scientific.
- Весы лабораторные, абсолютная погрешность не выше $\pm 0,001$ г, цена деления не выше 0,0001 г.
- Дозаторы пипеточные одноканальные с переменным объемом дозирования вместимостью (0,5 - 5) мл; (100 - 1000) мкл; (20 - 200) мкл; (10 - 100) мкл.
- Колбы мерные со стеклянной крышкой.
- Микрошприц для газовой хроматографии. Диапазон дозируемого объема (1 - 10) мкл.

Вспомогательные устройства

- Перемешивающее устройство типа вортекс-шейкера для пробирок, диапазон регулирования скорости (500 - 3000) об/мин.
- Лабораторная центрифуга, скорость вращения (100 - 3500) об/мин.
- Термостат твердотельный, максимальная температура нагрева 120 °С, отклонение температуры от заданной не выше $\pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Холодильник бытовой.
- Морозильная камера.
- Бюксы (стаканчики для взвешивания).
- Виалы стеклянные для хроматографии с винтовыми крышками и уплотнителем из политетрафторэтилена вместимостью 1,5 см³.
- Пробирки центрифужные.

Реактивы

- Гелий газообразный в баллонах под давлением марки «6.0».
- Вода для инъекций.
- Ацетон квалификации «ос.ч.».
- Эфир диэтиловый квалификации «ч.д.а.».
- Кислота серная квалификации «ос.ч.».
- Натрий хлористый квалификации «х.ч.».
- (N,O-бис-триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), CAS № 25561-30-2, массовая доля основного компонента 99 %, массовая доля триметилхлорсилана 1 %.

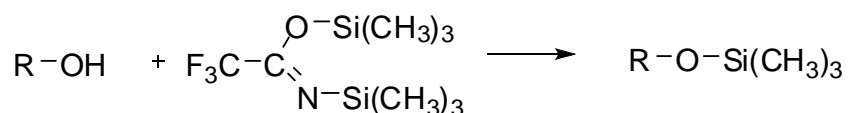
- н-Гексан, CAS № 110-54-3.
- 3,4-дигидроксибензойная кислота, CAS № 99-50-3.
- бензойная кислота (БК), CAS № 65-85-0.
- 2,3,4,5,6-d5-бензойная кислота (D5-БК), CAS № 1079-02-3.
- 3-фенилпропионовая кислота (ФПК), CAS № 501-52-0.
- 4-гидроксибензойная кислота (п-ГБК), CAS № 99-96-7.
- 3-(4-гидроксифенил)пропионовая кислота (п-ГФПК), CAS № 501-97-3.
- 3-метокси-4-гидроксифенилуксусная кислота (или гомованилиновая кислота - ГВК), CAS № 306-08-1.
- 2-гидрокси-3-фенилпропионовая кислота (ФМК), CAS № 20312-36-1.
- 4-гидроксифенилуксусная кислота (п-ГФУК), CAS № 15-38-7.
- 3-(4-гидроксифенил)-2-гидроксипропионовая кислота (п-ГФМК), CAS № 6482-98-0.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Методика жидкость-жидкостной экстракции

Замороженные образцы сыворотки крови хранили при температуре минус 20 °С в холодильнике до проведения анализа не более двух месяцев. Образец замороженной сыворотки крови размораживали при комнатной температуре, помещали 200 мкл в стеклянную пробирку (10 мл), разбавляли 800 мкл воды для инъекций. Добавляли два внутренних стандарта: 100 мкл водного раствора 3,4-дигидроксибензойной кислоты, содержащего 400 нг кислоты, и 100 мкл водного раствора D₅-БК, содержащей 400 нг кислоты. При использовании метода добавок к полученному раствору добавляли соответствующее количество водного раствора ФКК в известных концентрациях. Для денатурации белков в раствор добавляли 0.3–0.5 г твердого NaCl до образования насыщенного раствора и 15 мкл конц. H₂SO₄ до pH 2. Далее проводили трехкратную экстракцию органических соединений диэтиловым эфиром (3 × 1 мл). Эфирный экстракт упаривали досуха при 40°C, сухой остаток обрабатывали 20 мкл БСТФА при 80 °С в течение 15 мин. Полученный раствор охлаждали в холодильнике при 5 °С в течение 30 мин, затем разбавляли 100 мкл н-гексана и 1 мкл конечного раствора вводили в инжектор ГХ-МС.

Дериватизация с БСТФА необходима для перевода полярных групп ФКК, таких как –ОН и –COOH в триметилсилильные (ТМС) производные, обладающие лучшими хроматографическими характеристиками и имеющие значение m/z в области более высоких и характеристичных значений. Схема реакции дериватизации соединений, содержащих подвижный водород в полярных функциональных группах, с БСТФА:



Методика ГХ-МС определения ФКК

В работе использовали газовый хромато-масс-спектрометр фирмы Thermo Scientific, включающий газовый хроматограф Trace GC 1310 и масс-спектральный детектор ISQ LT. Хроматографическое разделение компонентов проводили на кварцевой капиллярной колонке TR-5ms (95% диметилполисилоксан + 5% фенилполисилоксан, толщина неподвижной фазы – 0.25 мкм, длина – 30 м, внутренний диаметр – 0.25 мм). Условия хроматографического разделения: температура инжектора – 200 °С, расход газа-носителя – 1.5 мл/мин, режим с делением потока (1:20). Режим программирования температуры термостата колонок: начальная температура – 80 °С, время выдержки термостата при этой температуре – 4 мин, скорость нагрева – 10 °С/мин до 250 °С, время выдержки – 4 мин. Условия масс-спектрального анализа: электронная ионизация, энергия электронов – 70 эВ, температура интерфейса – 250 °С, температура ионизационной камеры – 200 °С, диапазон сканирования m/z – 50–450 а.е.м., скорость сканирования – 3 скана в секунду, задержка включения катода – 4 мин, время выключения катода – 20 мин.

Площади пиков ТМС производных ФКК, нормированные на стандарты и полученные на m/z хроматограммах по характеристичным ионам (табл.5), использовали в количественном анализе: площади пиков ТМС производных БК и ФПК кислоты делились на площадь пика D₅-БК; площади пиков ТМС производных ФМК, п-ГБК, п-ГФУК, п-ГФПК, п-ГФМК и ГВК делились на площадь пика ТМС производного 3,4-дигидроксибензойной кислоты.

Таблица 5. Характеристичные значения m/z и времена удерживания ТМС производных ФКК и стандартов.

Кислоты	Время удерживания, мин	Значения m/z
D ₅ -БК	9,90	110, 184
БК	9,93	105, 179
ФПК	12,49	104, 207
ФМК	14,49	193
п-ГБК	15,07	223, 267
п-ГФУК	15,21	179, 296
п-ГФПК	16,60	179, 192
ГВК	16,68	179, 326
3,4-дигидрокси-бензойная кислота	17,13	193, 370
ГФМК	17,93	179

Определение содержания ФКК в сыворотках здоровых добровольцев

В сыворотке здоровых людей также присутствуют ФКК, поэтому для определения нормы исследованы образцы сывороток 20 добровольцев и определены значения медиан и интерквартильных размах (ИР 25-75), представленные в табл. 6.

Таблица 6. Концентрации ФКК в сыворотке крови здоровых людей (ГХ-МС)

Показатель	Медиана (ИР 25-75), мкМ
БК	0,66 (0,57-0,78)
ФПК	0,36 (0,16-0,68)
ФМК	0,08 (0,06-0,12)
п-ГБК	0
п-ГФУК	0,05 (0,03-0,06)
п-ГФПК	0
ГВК	0
п-ГФМК	0,45 (0,35-0,53)

Построение калибровочных зависимостей ФКК в диапазоне 0-7 мкМ

Приоритетным диапазоном определяемых концентраций ФКК, на основании данных, полученных с использованием ГХ-ПИД, является 0–7 мкМ, поэтому для построения калибровочных зависимостей использовали добавки ФКК в сыворотку крови здорового добровольца в указанном диапазоне. В табл. 7 приведены уравнения линейных зависимостей и коэффициенты корреляции, полученные с использованием программы Microsoft Excel.

Таблица 7. Уравнения линейных зависимостей и коэффициенты корреляции, полученные с использованием метода добавок в диапазоне 0–7 мкМ для 9 ФКК.

Кислоты	Уравнение зависимости	Коэффициент корреляции
БК*	$y = 9,2x$	0,99
ФПК*	$y = 15,3x$	1,00
ФМК	$y = 26,0x$	1,00
п-ГБК	$y = 24,4x$	0,99
п-ГФУК	$y = 17,4x$	0,99
п-ГФПК	$y = 12,5x$	1,00
ГВК	$y = 24,2x$	0,99
п-ГФМК*	$y = 19,9x$	0,99

В сыворотке здорового добровольца содержались исходно кислоты, помеченные звездочкой (*) – БК, ФПК и п-ГФМК, поэтому для построения калибровочных зависимостей из каждого полученного значения

относительного сигнала сыворотки с добавкой соответствующей кислоты вычиталось значение относительного сигнала в сыворотке без добавки.

Построение калибровочных зависимостей ФКК в диапазоне 0–40 мкМ

Для наиболее клинически значимых кислот, а именно ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК, концентрации которых для некоторых категорий больных могут в несколько раз превышать значение в 7 мкМ, построены калибровочные зависимости в диапазоне 0–40 мкМ (табл. 8). Обнаружена нелинейная зависимость относительного сигнала от концентрации добавки для интересующих кислот в данном диапазоне концентраций, поэтому диапазон концентраций разбит на два линейных участка: 0-7 мкМ и 7-40 мкМ.

Таблица 8. Уравнения линейных зависимостей и коэффициенты корреляции, полученные с использованием метода добавок в диапазоне 0–7 и 7–40 мкМ для ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК.

Кислота	Диапазон 0–7 мкМ		Диапазон 7–40 мкМ	
	Уравнение зависимости	Коэффициент корреляции	Уравнение зависимости	Коэффициент корреляции
ФМК	$y = 25,96x$	1,00	$y = 6,6x + 7,8$	0,98
п-ГФУК	$y = 17,36x$	0,99	$y = 10,8x + 7,3$	0,99
п-ГФМК*	$y = 19,94x$	0,99	$y = 4,0x + 6,3$	0,99

Концентрации изучаемых соединений представляют в мкмоль/л (мкМ) и рассчитывают по отношению площади определяемого вещества к площади внутреннего стандарта с использованием полученных градуировочных коэффициентов и уравнений зависимости.

РАЗДЕЛ 3. КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Клиническое наблюдение №1

Больной К., 56 лет, 03.08.14 доставлен в отделение реаниматологии из отделения нейрохирургии в связи с нарастанием дыхательной недостаточности.

Диагноз при поступлении: закрытая черепно-мозговая травма; острая субдуральная гематома в правой гемисфере головного мозга.

Диагноз после экстренной операции от 02.06.14 г.: декомпрессионная трепанация черепа. Удаление острой субдуральной гематомы справа.

Состояние при поступлении крайне тяжелое, по шкале АРАСНЕ II – 21 баллов, SOFA – 12 баллов. В связи с персистированием дыхательной недостаточности начата ИВЛ. При аускультации легких дыхание жесткое, проводится во все отделы, ослаблено справа, выслушиваются хрипы во всех отделах. При санации ТБД – гнойное отделяемое в большом количестве. ЧСС – 93 в мин, ритм правильный, АД – 74/52 мм рт. ст. Подключен норадреналин – 100 нг/кг/мин. ЦВД – 30 мм водн. ст. Язык сухой. Живот участвует в акте дыхания, при пальпации мягкий, безболезненный. Перистальтика выслушивается. Печень не пальпируется. По катетеру моча желтого цвета. У больного выявлены осложнения: двусторонний гнойный бронхит; двусторонняя пневмония; сепсис; септический шок.

Тяжесть состояния обусловлена дыхательной недостаточностью на фоне пневмонии, сердечно-сосудистой недостаточностью, интоксикацией вследствие сепсиса.

В отделении реанимации больной обследован клинически, лабораторно, инструментально (табл. 9). Выполнена рентгенография грудной клетки (двусторонняя пневмония), ФБС (двусторонний гнойный бронхит).

Таблица 9. Данные лабораторных исследований для клинического случая №1.

Дата	03.08.14	04.08.14	07.08.14
Клинический анализ крови:			
Лейкоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	28	21	16
Эритроциты, ($\times 10^{12}/\text{л}$)	3,9	3,7	3,6
Гемоглобин, (г/л)	91	85	90
Гематокрит, доли	0,29	0,26	0,28
Тромбоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	528	501	432
Биохимический анализ крови:			

АСТ, ед/л	37	30	57
АЛТ, ед/л	26	27	22
Билирубин, мкМ/л	13	15	18,8
Прямой билирубин, мкМ/л	-	-	8,2
Белок, г/л	65	60	58
Прокальцитонин, нг/мл	0,5	-	-
Амилаза, ед/л	88	90	50
Креатинин, мкМ/л	74	101	160
Мочевина, мкМ/л	6	10	13
Na, ммоль/л	142	140	146
K, ммоль/л	2,5	3,8	5,2
Глюкоза мМ/л	4,5	5,1	5,8

Проводилась инфузионная, антибактериальная терапия, направленная на коррекцию КЩС, водно-электролитных нарушений, реологии крови, профилактику тромбоэмболических осложнений, вазопрессорная поддержка, ИВЛ, медикаментозная седация, парентеральное питание, профилактическая гастропротективная, гепатопротективная терапия.

За время нахождения в отделении реаниматологии состояние больного ухудшалось. Несмотря на проводимую терапию, прогрессировала ПОН (церебральная, дыхательная, сердечно-сосудистая, почечная) нарастала интоксикация. 09.08.2014 констатирована смерть.

Качественное и количественное определение ФКК, проведенное с использованием метода ГХ-МС, представлено в табл. 10 и проиллюстрировано на рис. 4.

Таблица 10. Данные ГХ-МС по содержанию фенолкарбоновых кислот для клинического случая №1.

Показатель	Концентрация, мкМ		
	03.08.14	04.08.14	07.08.14
БК	0,71	0,72	0,59
ФПК	0	0	0
ФМК	0,23	0,53	0,35
п-ГБК	0	0	0
п-ГФУК	0,96	3,63	14,40
п-ГФПК	0	0	0
ГВК	0,12	0,12	2,35
п-ГФМК	1,30	2,81	1,98

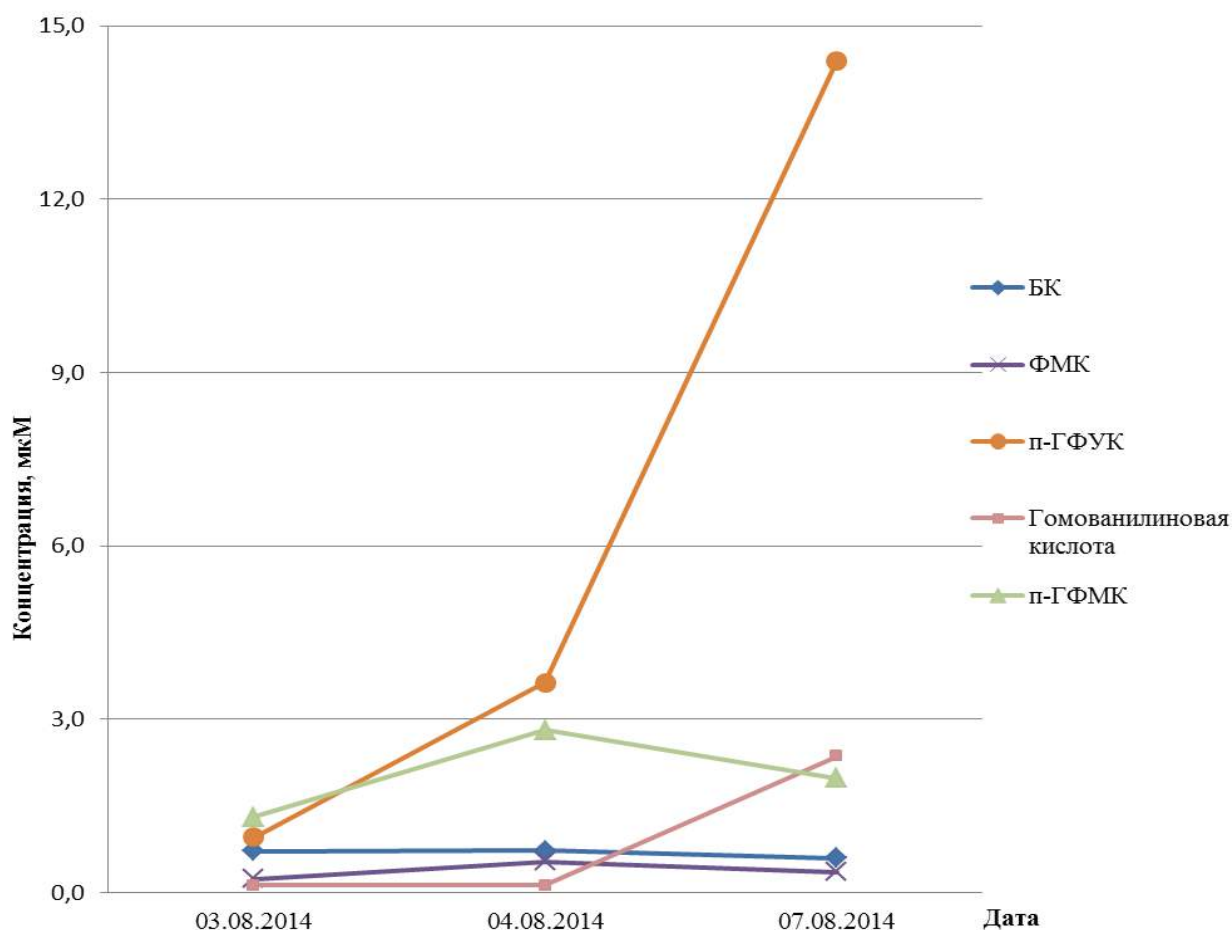


Рис. 4. Содержание фенолкарбоновых кислот для клинического случая №1.

Данный клинический пример демонстрирует отрицательную динамику септического процесса, прогрессирование сердечно-сосудистой, почечной недостаточности и неблагоприятный исход. По данным ГХ-МС анализа отмечаются нарастание п-ГФУК почти до 15 мкМ, а также ГВК, в меньшей степени п-ГФМК и ФМК. Метаболит характерный для здоровых людей – ФПК – у данного больного отсутствует во всех пробах.

Клиническое наблюдение №2

Больная О., 75 лет, 14.03.2014 доставлена в отделение реаниматологии после операции: лапаротомия, ушивание перфоративной язвы желудка, санация, дренирование брюшной полости.

Диагноз: перфоративная язва антрального отдела желудка; распространенный гнойный перитонит; гипертоническая болезнь 2 стадии; желчекаменная болезнь; хронический калькулезный холецистит; хронический панкреатит; постгеморрагическая анемия.

Состояние при поступлении: крайне тяжелое, по шкале APACHE II – 31 баллов, SOFA – 8 баллов. Проводилась медикаментозная седация, ИВЛ. Температура тела 36.7 °С. Кожные покровы и видимые слизистые бледные. АД – 116/56 мм рт.ст. на фоне применения норадrenalина – 900 нг/кг/мин + добутамина 3 мкг/кг/мин. Тоны сердца приглушены, ритм правильный,

Ps=120 в минуту. ЦВД +160 мм водн ст. Язык сухой. Живот не вздут, при пальпации мягкий, на пальпацию не реагирует. По дренажам геморрагическое отделяемое – следы. Диурез без особенностей.

Тяжесть состояния обусловлена интоксикацией, сердечно-сосудистой недостаточностью на фоне разлитого перитонита, гипоксией вследствие острой постгеморрагической анемии, объемом и сроком операции.

В отделении реанимации больная обследована клинически, лабораторно, инструментально (табл. 11).

Таблица 11. Данные лабораторных исследований для клинического случая №2.

Дата	14.03.14	16.03.14	17.03.14	20.03.14
Клинический анализ крови:				
Лейкоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	21,1	20,9	17	17,9
Эритроциты, ($\times 10^{12}/\text{л}$)	3,9	2,3	2,1	2,8
Гемоглобин, (г/л)	38	57	55	60
Гематокрит, доли	0,11	0,16	0,15	0,13
Тромбоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	798	281	259	198
Биохимический анализ крови:				
АСТ, ед/л	139	63	55	19,5
АЛТ, ед/л	86	150	60	43,5
Билирубин, мкМ/л	10	17	18	-
Прямой билирубин, мкМ/л	-	11,3	12	-
Белок, г/л	27	41	39	41
Прокальцитонин, нг/мл	0,5	-	-	-
Амилаза, ед/л	394	66	75	70
Креатинин, мкМ/л	167	100	170	257
Мочевина, мкМ/л	12	17,5	20	42
Na, ммоль/л	129	148	146	146
K, ммоль/л	3,3	4,8	5,2	7
Глюкоза мМ/л	4,5	10,1	5,8	12,8
КЩС (вена):				
pH	7,008	-	-	-
pCO ₂ , мм рт.ст.	48	-	-	-
pO ₂ , мм рт.ст.	57	-	-	-
sO ₂ , %	70	-	-	-
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	11	-	-	-
ABE, ммоль/л	-17	-	-	-

Проводилась комплексная (инфузионная, гемотрансфузионная, антибактериальная, гастропротективная, гепатопротективная) терапия, направленная на коррекцию КЩС, водно-электролитных нарушений, реологии крови, профилактику тромбозомболических осложнений, обезболивание, деконтаминация кишечника, инотропная, вазопрессорная поддержка, ИВЛ, парентеральное питание.

Качественное и количественное определение ФМК, проведенное с использованием метода ГХ-МС, представлено в табл. 12 и проиллюстрировано на рис. 5.

Таблица 12. Данные ГХ-МС по содержанию фенилкарбоновых кислот для клинического случая №2.

Показатель	Концентрация, мкМ			
	14.03.14	16.03.14	17.03.14	20.03.14
БК	0,89	1,07	1,03	1,16
ФМК	0	0	0	0
ФМК	0,45	0,41	0,56	1,29
п-ГБК	0	0	0	0
п-ГФУК	1,08	1,84	2,43	37,10
п-ГФПК	0	0	0	0
ГВК	0,13	0,03	0,12	21,09
п-ГФМК	5,77	1,75	1,93	3,31

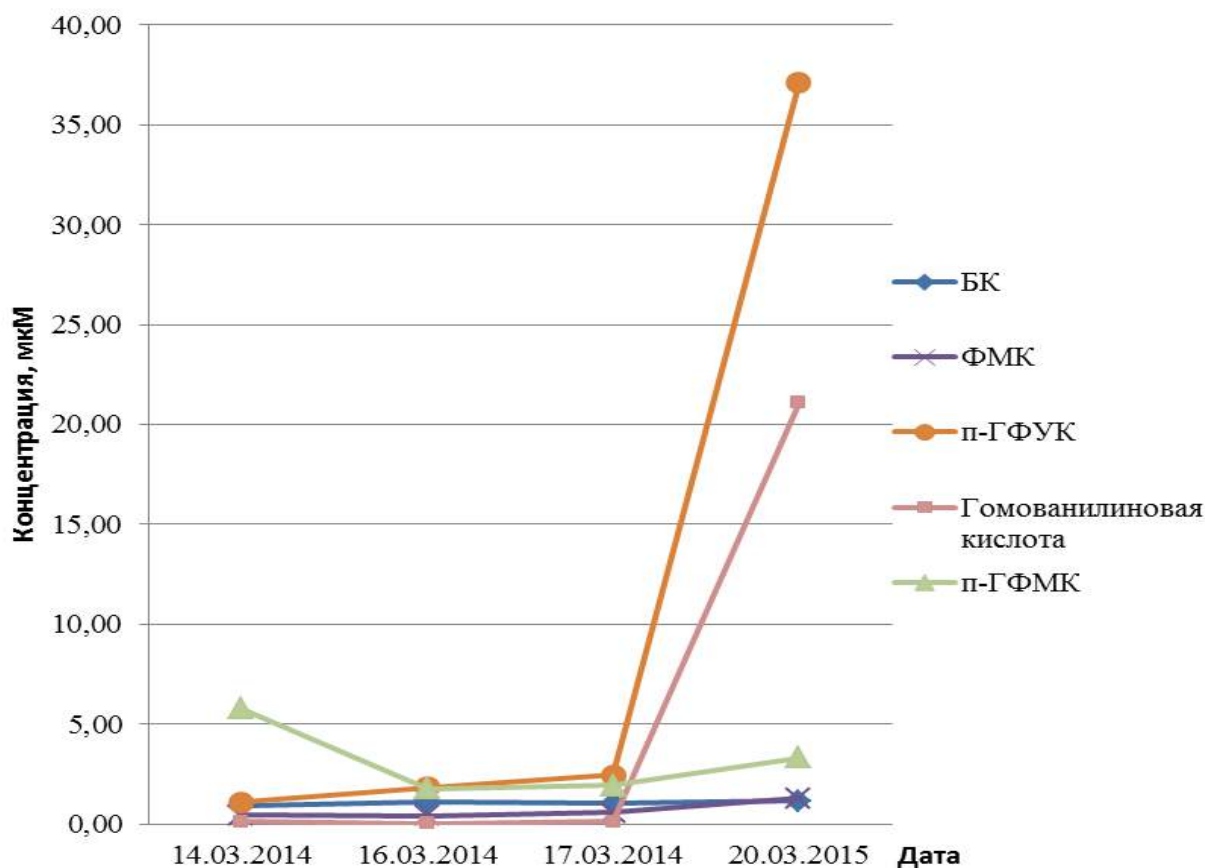


Рис. 5. Содержание фенилкарбоновых кислот для клинического случая №2.

За время нахождения в отделении реаниматологии состояние больной ухудшалось. Несмотря на проводимую терапию, прогрессировала полиорганная недостаточность (церебральная, дыхательная, сердечно-сосудистая, почечная) нарастала интоксикация. 20.03.2014 на фоне нестабильной гемодинамики зафиксирована асистолия, реанимационные мероприятия без эффекта, констатирована смерть больной.

Представленный клинический случай свидетельствует о неблагоприятном течении инфекционного процесса. Несмотря на проводимую терапию, у больной после 17.03. нарастает полиорганная недостаточность, что подтверждается существенным повышением уровня ФКК, особенно гидроксированных метаболитов – п-ГФУК, п-ГФМК и ГВК. ФПК в крови этой больной также отсутствует, как и в клиническом наблюдении №1.

Клиническое наблюдение №3

Больной Н. 09.07.2014 доставлен в отделение реаниматологии из приемного отделения с диагнозом: синдром Гайя-Вернике, абстинентный синдром. В отделении реаниматологии состояние при поступлении тяжелое, обусловлено церебральной недостаточностью. Больной обследован клинически, лабораторно, инструментально (табл. 13).

Таблица 13. Данные лабораторных исследований для клинического случая № 3.

Дата	21.07.14	22.07.14	24.07.14	28.07.14
Клинический анализ крови:				
Лейкоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	13,4	6,4	9,2	9,3
Эритроциты, ($\times 10^{12}/\text{л}$)	2,65	3	2,71	2,5
Гемоглобин, (г/л)	93	105	92	83
Гематокрит, доли	0,276	0,3	0,273	0,24
Тромбоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	400	283	208	213
Биохимический анализ крови:				
АСТ, ед/л	118	94	42	46
АЛТ, ед/л	21,5	22,2	9	11
Билирубин, мкМ/л	21,1	15,3	10,8	12
Прямой билирубин, мкМ/л	10	-	4,2	-
Белок, г/л	74	78	73	67
Амилаза, ед/л	56	36	16	15
Креатинин, мкМ/л	46	72	43	47
Мочевина, мкМ/л	8,3	3	5,4	4
Глюкоза мМ/л	5,5	4,1	4,8	5,2

По шкале APACHE II - 9 баллов, SOFA – 2 баллов. Больной в сознании, дезориентирован, неадекватен. Температура тела 37,0°C. При аускультации легких - без особенностей. Гемодинамически стабилен. Органы брюшной полости, диурез – без особенностей. С 20.07.14 г. у больного клинически и рентгенологически отмечается пневмония, диагноз: левосторонняя очаговая пневмония в нижней доле.

Качественное и количественное определение ФКК, проведенное с использованием метода ГХ-МС, представлено в табл. 14 и проиллюстрировано на рис. 6.

Таблица 14. Данные ГХ-МС по содержанию фенилкарбоновых кислот для клинического случая № 3.

Показатель	Концентрация, мкМ				
	21.07.14	22.07.14	24.07.14	28.07.14	29.10.14
БК	0,96	0,96	0,73	0,86	0,89
ФПК	0,20	0,21	0,13	0,05	0,05
ФМК	0,11	0,12	0,07	0,10	0,08
п-ГБК	0,05	0,02	0,01	0,02	0,02
п-ГФУК	0,05	0,10	0,04	0,16	0,18
п-ГФПК	0,18	0,05	0,04	0,01	0
ГВК	0	0,04	0,02	0,05	0,03
п-ГФМК	0,94	0,65	0,35	0,43	0,28

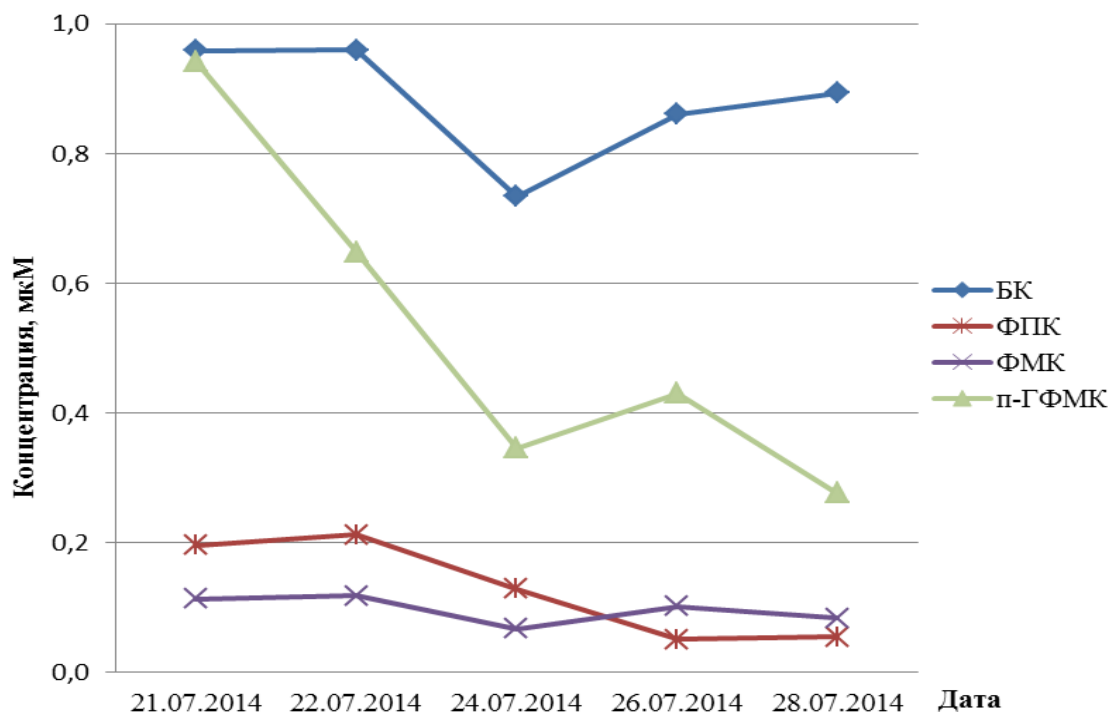


Рис. 6. Содержание фенилкарбоновых кислот для клинического случая №3.

Проводилась инфузионная, антибактериальная, церебропротективная, гепатопротективная, гастропротективная, терапия, направленная на коррекцию водно-электролитных нарушений, реологии крови, профилактику

тромбоэмболических осложнений. В отделении реаниматологии наблюдался неврологом в связи с токсической полинейроэнцефалопатией, психиатром в связи с синдромом отмены алкоголя с делирием, органическим галлюцинозом.

В данном клиническом примере демонстрируется благоприятное течение заболевания. У больного с локальной инфекцией определяются невысокие концентрации п-ГФМК и п-ГФУК в сыворотке крови, не превышающие 1 мкМ. Уже к третьему дню ГФМК быстро снижается почти в 3 раза по сравнению с исходным уровнем, что отражает адекватность проводимого лечения. ГВК практически отсутствует; ФПК, характерная для здоровых доноров, выявляется и у данного больного. Уровень ФМК близок к нормальным значениям, что свидетельствует о низком риске летального исхода. Больной 28.07 благополучно переведен из отделения реаниматологии. Исход – выздоровление.

Клиническое наблюдение №4

Больная П., 65 лет, с 29.03.2014 находилась в отделении реаниматологии с диагнозом: ХОБЛ, обострение; хронический бронхит в стадии обострения; эмфизема лёгких; пневмосклероз; двусторонняя полисегментарная пневмония. Дыхательная недостаточность – II-III ст. ИВЛ с 30.03.14 г. Трахеостомия 04.04.14 г. Гипертоническая болезнь II ст., артериальная гипертензия III ст., риск сердечно-сосудистых осложнений – 3. Недостаточность кровообращения – IIА. Хроническая ишемия головного мозга. Инфаркт головного мозга от 2003 г. в правом каротидном бассейне с левосторонней пирамидной недостаточностью. Дисциркуляторная гипоксическая энцефалопатия. Ожирение. Хронический панкреатит. Киста левой почки. Инфекция мочевыводящих путей. Язвенная болезнь 12-типерстной кишки (в анамнезе). Анемия средней степени тяжести. ASA IV (6 баллов).

Доставлена в реанимационное отделение в связи с дыхательной недостаточностью минуя приёмный покой, с подозрением на внебольничную правостороннюю нижнедолевую пневмонию. При поступлении состояние тяжелое. По шкале APACHE II 9 баллов, SOFA – 5 баллов. В ясном сознании. Дыхание самостоятельное, подключено дыхание кислородом, поток 5л/мин. Над легкими дыхание аускультативно жесткое; справа дыхание ослаблено в нижних отделах, хрипы не выслушиваются; слева дыхание резко ослаблено в нижних отделах, в нижних отделах выслушиваются влажные мелкопузырчатые хрипы, единичные сухие хрипы над всеми отделами слева. Гемодинамика стабильная. Органы брюшной полости, диурез без особенностей. По данным рентгенограммы органов грудной клетки – двусторонняя полисегментарная пневмония. С 30.03.14 г. в связи с прогрессированием дыхательной недостаточности – респираторная поддержка во вспомогательном режиме. С 31.03.14 г. к терапии подключена инотропная поддержка. 06.04.14 г. инотропная поддержка прекращена.

Тяжесть состояния обусловлена дыхательной недостаточностью, эндогенной интоксикацией у больной с декомпенсацией ХОБЛ, двусторонней полисегментарной пневмонией, сопутствующей соматической патологией. За время нахождения в отделении реанимации состояние больной тяжёлое, с 06.04.14 - стабильное. Отмечаются подъёмы температуры до фебрильных цифр. В связи с нейтрофильным лейкоцитозом, по данным бактериального исследования (выявлены золотистый стафилококк и клебсиелла) с 07.04.14 г. больная получает амикацин, с 14.04.14 г. зивокс. За время нахождения в отделении реанимации больная обследована клинически, лабораторно, инструментально (табл. 15).

Таблица 15. Данные лабораторных исследований для клинического случая №4.

Дата	31.03.14	01.03.14	03.03.14	09.03.14	17.04.14
Клинический анализ крови:					
Лейкоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	31,03	1,04	3,04	9,04	17,04
Эритроциты, ($\times 10^{12}/\text{л}$)	4,36	3,85	3,43	3,02	2,85
Гемоглобин, (г/л)	121	109	97	86	82
Гематокрит, доли	0,365	0,328	0,298	0,256	0,236
Тромбоциты, ($\times 10^9/\text{л}$)	307	328	283	264	368
Биохимический анализ крови:					
АСТ, ед/л	47,7	25	9,5	18,3	57,9
АЛТ, ед/л	20,6	21,3	12,7	25,2	35,4
Билирубин, мкМ/л	5,7	8,3	5,1	7,7	9,5
Белок, г/л	65	60	52	48	56
Амилаза, ед/л	39	24	31	40	37
Креатинин, мкМ/л	81	91	64	53	89
Мочевина, мкМ/л	2,9	10	6,5	6,1	5,5
Na, ммоль/л	133	141	138	137	128
K, ммоль/л	4,7	4,8	4,6	4,7	3,4
Cl, ммоль/л	93,2	101,9	98	97,5	84,7
Глюкоза мМ/л	8,7	7,9	8,4	7,9	6,5
КЩС:				артерия	вена
pH	-	-	-	7,395	7,374
pCO ₂ , мм рт.ст.	-	-	-	44,5	58,5
pO ₂ , мм рт.ст.	-	-	-	257	48
sO ₂ , %	-	-	-	99,6	80,2
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	-	-	-	26,4	31,3
ABE, ммоль/л	-	-	-	2,2	7,7

Липополисахарид-связывающий белок (LBP) от 02.04.14 г. – 38,1 мкг/мл; LBP от 08.04.14 г. - 55,5 мкг/мл; LBP от 15.04.14 г. - 53,5 мкг/мл.

В отделении проводилась интенсивная инфузионная, дезинтоксикационная, антибактериальная, антикоагулянтная, симптоматическая терапия, респираторная, вазопрессорная поддержка, зондовое питание. 04.05.2014 больная переведена в терапевтическое отделение с положительной динамикой.

Качественное и количественное определение ФКК, проведенное с использованием метода ГХ-МС, представлено в табл. 16 и проиллюстрировано на рис. 7.

Таблица 16. Данные ГХ-МС по содержанию фенилкарбоновых кислот для клинического случая № 4.

Показатель	Концентрация, мкМ			
	31.03.14	01.03.14	03.03.14	09.03.14
БК	1,02	1,14	1,07	0,79
ФПК	0,12	0,16	0,28	0
ФМК	0,25	0,27	0,17	0,18
п-ГБК	0	0	0	0
п-ГФУК	0,94	0,30	1,49	1,44
п-ГФПК	0	0,11	0	0
ГВК	0	0	0	0
п-ГФМК	1,74	1,50	0,96	1,38

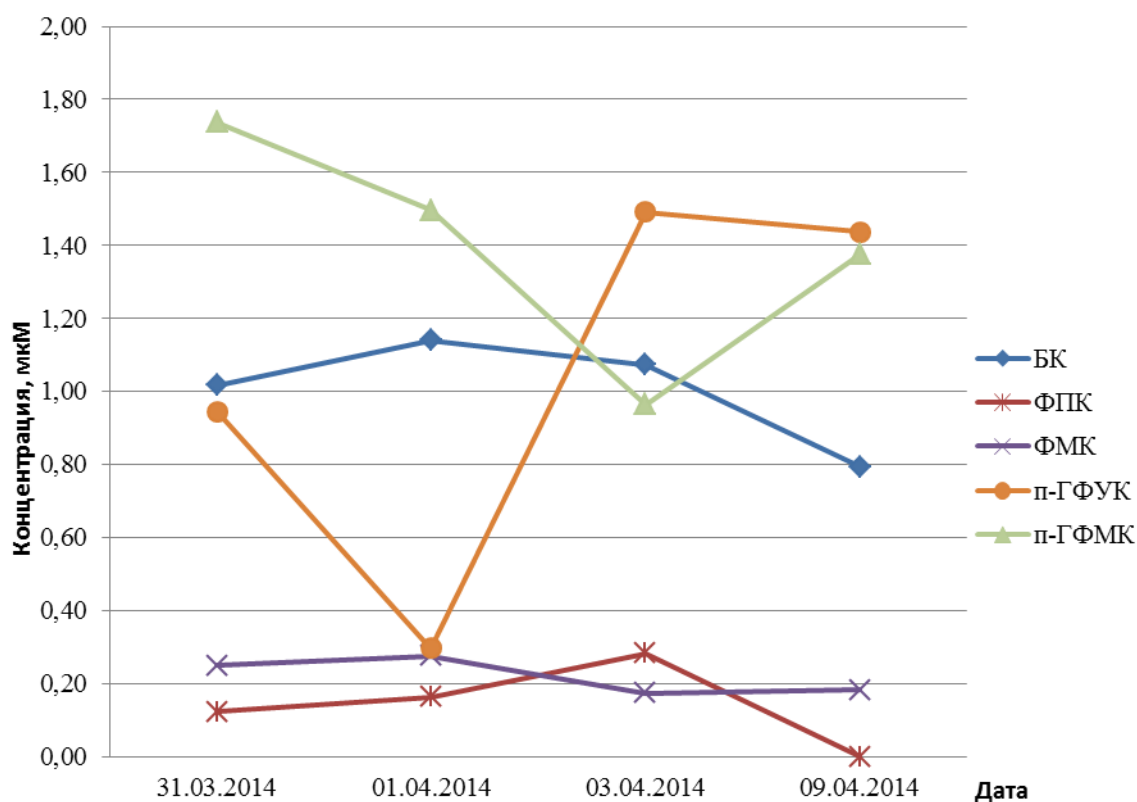


Рис. 7. Содержание фенилкарбоновых кислот для клинического случая №4.

Данный клинический пример демонстрирует благоприятное течение заболевания. У больной с локальной инфекцией, несмотря на наличие сопутствующей соматической патологии, уровни всех измеряемых ФКК не выходят за пределы 1,8 мкМ. Уровень ГФМК невысокий, в динамике на фоне проводимого лечения снижается. что может быть расценено как низкий риск летального исхода. ФПК обнаруживается почти во всех пробах. Больная переведена из отделения реаниматологии, исход благоприятный.

Резюме

Обобщая результаты ГХ-МС исследований сыворотки крови у больных в приведенных выше клинических наблюдениях, следует отметить, что:

- Концентрации ФМК, п-ГФМК и п-ГФУК в сыворотке крови больных с тяжелой бактериальной инфекцией и сепсисом (клинические случаи №1, №2) существенно выше по сравнению с больными, где имела место локальная инфекция (клинические случаи №3 и №4).
- Уровни ФКК значительно выше у больных с инфекцией по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует об участии микробного фактора в патогенезе и тяжести заболевания. Уровни указанных ФКК и их сумма коррелируют с летальностью у больных.
- Содержание п-ГФУК нарастает по мере прогрессирования почечной недостаточности, что прослеживается на клинических примерах №1 и №2.
- ГВК присутствует в сыворотке крови больных с инфекционным процессом тяжелой степени (клинические случаи №1 и №2), а при наличии инфекции легкой степени (клинические случаи №3 и №4) не обнаруживается.
- ФПК практически всегда выявляется у здоровых людей, а ее обнаружение у больных с локальной инфекцией (клинические случаи №3 и №4) можно расценивать как благоприятный признак. ФПК отсутствует в крови больных с сепсисом, тяжелым течением инфекции и неблагоприятным прогнозом (клинические случаи №1 и №2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика количественного определения фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови с применением метода ГХ-МС позволяет получать объективные результаты об уровне ароматических метаболитов. Методика полностью подготовлена к внедрению, содержит подробное описание пробоподготовки, ГХ-МС анализа и количественного расчета концентрации целевых фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови больных. Клинический опыт применения данной методики, полученный авторским коллективом, подтверждает целесообразность и перспективность широкого внедрения рекомендованной методики в клинику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beloborodova N.V., Osipov G.A. Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes–host relationship. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2000, Т. 12, № 1, С. 12-21.
2. Белобородова Н.В., Архипова А.С., Белобородов Д.М., Оленин А.Ю., Бойко Н.Б., Мелько А.И. Хромато-масс-спектрометрическое определение низкомолекулярных ароматических соединений микробного происхождения в сыворотке крови больных сепсисом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2006, №2. С. 3-6.
3. Khodakova A.S., Beloborodova N.V. Microbial metabolites in the blood of patients with sepsis. *Critical Care*, 2007, Т. 11, № Supple 4: P5, С. 3.
4. Белобородова Н.В., Ходакова А.С., Байрамов И.Т., Оленин А.Ю. Микробный путь образования фенолкарбоновых кислот в организме человека. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, Т. 74, № 12, С. 1657-1663.
5. Белобородова Н.В., Оленин А.Ю., Ходакова А.С., Черневская Е.А., Хабиб О.Н. Происхождение и клиническое значение низкомолекулярных фенольных метаболитов в сыворотке крови человека. *Анестезиология и реаниматология*, 2012, № 5, С. 65-72.
6. Beloborodova N.V., Moroz V.V., Osipov A.A., Vlasenko A.V., Fateev K.M., Sarshor Yu.N., Pautova A.K., Bedova A. Yu. Prognostic value of phenyl carboxylic acids level in patient serum with acute abdomen Shock, Sep 2015, 10, 44, Suppl 2.
7. Хорошилов С. Е., Белобородова Н. В., Никулин А. В., Бедова А. Ю. Влияние экстракорпоральной детоксикации на уровень ароматических микробных метаболитов в сыворотке крови при сепсисе. *Общая реаниматология*, 2015, Т. 11, № 5, С. 6-14.
8. Белобородова Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях. *Общая реаниматология*, 2012, Т. 8, № 4, С. 42-54.
9. Белобородова Н.В., Мороз В.В., Осипов А.А., Бедова А.Ю., Оленин А.Ю., Гецина М.Л., Карпова О.В., Оленина Е.Г. Нормальный уровень сепсис-ассоциированных фенолкарбоновых кислот в сыворотке крови. *Биохимия*, 2015, Т. 80, № 3, С. 449-455.
10. Осипов А.А., Власенко А.В., Черневская Е.А., Бедова А.Ю., Гецина М.Л., Саршор Ю.Н., Белобородова Н.В. Участие метаболитов микробиоты в развитии критического состояния у пострадавших с черепно-мозговой травмой. *Медицинский алфавит. Неотложная медицина*, 2013, Т. 4, № 26, С. 12-15.
11. Beloborodova N., Moroz V., Bedova A., Sarshor Y., Osipov A., Chernevskaya K. High levels of phenylcarboxylic acids reflect the severity in ICU patients and affect phagocytic activity of neutrophils. *Critical Care* 2016, Volume 20 Suppl 1, P.3.

12. Белобородова Н., Теплова В., Федотчева Н. Роль микробных метаболитов в дисфункции митохондрий при сепсисе. Издательство LAP, 2013, С. 96.
13. Fedotcheva N., Chernevskaya E., Beloborodova N. The role of bacterial phenolic metabolites in mitochondrial dysfunction *Critical Care* 2016, 20 (Suppl 1), P4.
14. Beloborodova N., Bairamov I., Olenin A., Shubina V., Teplova V., Fedotcheva N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *Journal of Biomedical Science*, 2012, Т. 19, С. 89.
15. Бедова А. Ю. Фенилкарбоновые кислоты при бактериальных воспалительных процессах: дис. канд. биол. наук: 14.03.03 / А. Ю. Бедова, Москва, 2015., С. 93.
16. Rogers AJ, McGeachie M, Baron RM, Gazourian L. et al. Metabolomic derangements are associated with mortality in critically ill adult patients. *PLoS One*. 2014 Jan 30; 9(1): e87538.
17. Белобородова Н.В., Осипов А.А., Бедова А.Ю. Биологические свойства некоторых низкомолекулярных микробных метаболитов, ассоциированных с сепсисом. *Антибиотики и химиотерапия*, 2013, Т. 58, № 7-8, С. 48-61.
18. Белобородова Н.В., Байрамов И.Т., Оленин А.Ю., Федотчева Н.И. Экзометаболиты некоторых анаэробных микроорганизмов микрофлоры человека. *Биомедицинская химия*, 2011, Т. 57, № 1, С. 95-105.
19. Мороз В.В., Белобородова Н.В., Бедова А.Ю., Ревельский А.И., Гецина М.Л., Осипов А.А., Саршор Ю.Н., Бучинская А.А., Оленин А.Ю. Разработка и адаптация к условиям клинической лаборатории методик газохроматографического определения фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови. *Журнал аналитической химии*, 2015, Т. 70, № 4, С. 418-425.
20. Свидетельство № 01.00225/205-38-15 об аттестации методики измерения выдано ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» от 07 августа 2015 г.
21. Патент №2423704 от 8 октября 2001 г. Белобородова Н.В., Ходакова А.С., Оленин А.Ю. Способ лабораторной диагностики сепсиса.
22. Kopple, J.D. Phenylalanine and Tyrosine Metabolism in Chronic Kidney Failure. *Journal of Nutrition*. 2007, Vol 137, №6. P. 1586S–1590S.
23. Leibich H.M., Pickert A. Gas chromatographic profiling of phenolic acids in urine of patients with cirrhosis of the liver. *Journal of Chromatography*. 1985. Vol. 338, №1, P. 25–32.