

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. Иммунол. 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 Минмедбиопроба, 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 большой 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  $\beta$ -оксимиристиновую кислоту, контроль менингококка по наличию  $\beta$ -оксилауриновой кислоты в крови [21], диагностика возбудителя гонореи *Neisseria gonorrhoeae* 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°C. Мочу в количестве 5 мл с осадком (после предварительного отстаивания в холодильнике) центрифугировали, осадок отделяли и высушивали с добавлением метанола и 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°C для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот, спиртов и стероидов.

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 QR-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°C - 2 мин, далее программирование 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 преобладающем 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 C10-C20, выбрав интервалы групп так, чтобы обойти интенсивные пики кислот C16 и C18, доминирующие в жирнокислотном профиле клеточного хозяина. Для определения  $\beta$ -оксикислот в программу вводили общий для гомологического ряда ион 175 и специфические для каждой кислоты ионы типа M-15, а для  $\alpha$ -оксикислот - ионы типа M-59. Соответствующие специфические ионы использовали для жирных спиртов и стероидов. 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 C 20 - C 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 C 15 и C 17, составляет максимум несколько десятых процента. В вагинальной жидкости имеется 19сус (циклонадекановая 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 C 16 и C 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 экзогенного микробного происхождения 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-гидроксидекаановой 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 гидроксидекаановая, 2-гидроксиллауриновая - при псевдомонадной инфекции; изомиристиновая кислота, i14-при выявлении *Peptostreptococcus anaerobius* или гидроксидекаановой 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  $3\sigma$ ) увеличение одного или нескольких МЖК 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 отсутствие. 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 двойной 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 МЖК 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 стафилококк. 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*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corinebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium*. Ранговое расположение доминирующей микрофлоры, исходя из концентраций более  $10^5$  КОЕ/г, имеет следующий порядок: *Lactobacillus* 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 стафилококки, стрептококки, *Pseudomonas aeruginosa*, *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-ОН-2,4,6-триметил-тетракозановая кислота.

**Eubacterium**. Эти бактерии обнаруживаются в 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 гидроксильной группы в положении 3 и алифатического радикала C10-C16 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 изоокислоты 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 C10 и C12 оксикислот, являющиеся факторами видовой хемодифференциации. В качестве родового признака удобно использовать 2-оксидекановую кислоту. [49].

**Clostridium perfringens**. Имеет четкие маркеры, 10-оксистеариновую и 10-оксиоктадеценую [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 тетрадеценая 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 относиться также к *Streptococcus pneumoniae*.

**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 декановую кислоту C10 [47]. Кроме того, есть интенсивные маркеры среди ненасыщенных кислот: 7,8-гексадеценая (16:1Δ7) и 11,12-октадеценая (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 (19сус) кислоте [11].

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

**Микроскопические грибы**. Неспецифическим маркером клинически значимых микроскопических грибов (*Aspergillus*, *Candida*, *Mucor* и др.) являются стеринны: 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 изогептадеценую кислоту i17:1, а также разветвленные нечетные 2-оксикислоты в составе клеточных сфинголипидов (2hi15,

2h17), 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-гексадеценной кислоты 16:1d9t (*Rhodococcus rhodochrous*) [35].

**Helicobacter.** Практически везде в профиле минорных компонентов жидкостей УГТ присутствует оксиктадекановая 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 gonorrhoeae.** 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 нейсерий, 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 (дифтерюды)-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 А-3,А-4, А-5, В-1а, В-3а, В-1б, В3б, *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 также за 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, докторы 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	19сус	120	60	100	40	120
9	17сус	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	Копроста- нол	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)	Кластеры	Моча n=100	
	Краткое* обозначение	Название	Диапазон	Кластеры	Диапазон		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	19сус	Циклононадекановая	0-1,4	0/-	0-0,4	0/-	0-0,6	0/-
9	17сус	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	Гептадеценная	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	Изогептадеценная	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	Тетрадеценная	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. С12N 1/00, 1/20, С12Q 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 кластридиальной 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 микоплазмы. Обзор. Медицина и здравоохранение. 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 Yildirim, Yakut Akycn et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* 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*, *Porphyromonas*, *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 venereal disease 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-Performance 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-Negative Aerobic and Facultatively Anaerobic bacteria.* Second edition. Williams and Wilkins, 1996.
-