

## ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ И ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЙ ДЕТЕКТОР ВОСПАЛЕНИЯ

В. Ю. Титов✉, М. В. Крейнаина, В. А. Петров, А. Н. Осипов, П. Р. Камчатнов, Р. И. Шалина

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Воспаление является ведущим звеном патогенеза многих заболеваний. Ранняя диагностика воспаления может рассматриваться как важный способ предотвращения развития заболеваний и их осложнений. Очень остро эта проблема стоит при контроле состояния больных в стационарах, особенно неврологического, психиатрического, реанимационного профиля, когда больные часто не могут сами сообщить врачу о своем состоянии. Очевидно, что необходим высокочувствительный, высокоспецифичный и в то же время высокопроизводительный, дешевый и легкий в освоении диагностический метод. В статье представлен метод ранней диагностики воспаления, разработанный на кафедре биофизики РНИМУ им. Н. И. Пирогова и испытанный на кафедрах хирургии, неврологии, акушерства и гинекологии университета. Метод основан на оценке состава нитрозосоединений плазмы крови. Содержание в плазме крови человека нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в концентрации свыше 100 нМ — однозначный признак воспаления. Разработанный высокоспецифичный ферментный детектор, имеющий чувствительность 50 нМ, позволяет производить определение в течение нескольких минут. Для анализа требуется не более 1 мл крови. Основное внимание уделено эффективности данной разработки, возможности ее внедрения в практическое здравоохранение.

**Ключевые слова:** оксид азота, нитрит, нитрат, динитрозильные комплексы железа, N-нитрозосоединения, активные формы кислорода, нейтрофилы, воспаление

✉ Для корреспонденции: Владимир Юрьевич Титов  
117997, Москва, ул. Островитянова, 1; vtitov43@yandex.ru  
Статья поступила: 13.09.2015 Статья принята в печать: 20.11.2015

## HIGH SENSITIVITY AND HIGH SPECIFICITY INFLAMMATION DETECTOR

Titov VY✉, Kreynina MV, Petrov VA, Osipov AN, Kamchatnov PR, Shalina RI

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Inflammation is a major component in the pathogenesis of many diseases. Early inflammation diagnosis can be seen as an important means of preventing the development of a disease and its complications. This issue is pressing when considering control over inpatients condition, especially in neurological, psychiatric, and intensive care facilities where patients are often unable to inform the doctor about their state. Obviously, a high sensitivity and high specificity diagnostic tool is essential that at the same time would be high performing, cost effective and easy to use. This article introduces a method for early detection of inflammation designed by the Department of Biophysics of Pirogov Russian National Research Medical University and tested by the Departments of Surgery, Neurology, Obstetrics and Gynecology. The method is based on the evaluation of nitroso compounds constituents in blood plasma. Elevated levels of nitrite and non-thiolate compounds in blood plasma (over 100 nM) are a definite sign of inflammation. A high specificity enzyme detector with a sensitivity of 50 nM allows to perform the test within a few minutes. No more than 1 ml of blood is required for the assay. The article focuses on the effectiveness of this invention and the possibility of its implementation into practical healthcare.

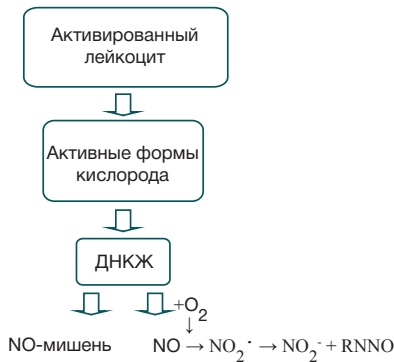
**Keywords:** nitric oxide, nitrite, nitrate, dinitrosyl iron complexes, N-nitroso compounds, active oxygen forms, neutrophils, inflammation

✉ Correspondence should be addressed: Vladimir Titov  
1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997; vtitov43@yandex.ru  
Received: 13.09.2015 Accepted: 20.11.2015

### Содержание нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме крови человека как индикатор воспаления

Одним из общих признаков воспаления является активация нейтрофилов и макрофагов [1, 2]. Последние при активации продуцируют активные формы кислорода (АФК). В отсутствие активации лейкоцитов АФК практически не продуцируются [1, 2]. Таким образом, продукция лейкоцитами АФК — высокоспецифичный признак воспаления. Но как использовать этот феномен для диагностики? Регистрация продуктов перекисного окисления липидов, индуцируемого АФК, едва ли пригодна для экспресс-диагностики в практическом здравоохранении, как и регистрация хемилюминесценции лейкоцитов, продуцирующих АФК. В работах А. Ф. Ванина и

соавт. [3, 4] установлено, что оксид азота (NO), а также динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) — физиологическое депо NO, являются эффективными ловушками супероксидного анион-радикала: константа скорости взаимодействия порядка  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Таким образом, для диагностики вполне возможно использовать этот феномен, при условии что в случае взаимодействия NO или ДНКЖ с супероксидным радикалом образуется продукт, которого в норме в живых тканях нет или он присутствует в следовых количествах. Нами показано, что при инкубации ДНКЖ с плазмой крови, содержащей активированные лейкоциты, последние трансформируются в соединения, определяемые как нитрит ( $\text{NO}_2^-$ ) и N-нитрозосоединения (RNNO), при этом в норме  $\text{NO}_2^-$  и RNNO регистрируются в плазме крови в следовых количествах (рисунок)



Предполагаемый механизм появления нитрита и RNNO в плазме крови при воспалении (исходя из собственных данных)

**Таблица 1.** Концентрация нитро- и нитрозосоединений в плазме крови здоровых доноров и пациентов, страдающих различными воспалительными заболеваниями (мкМ)

| Группа обследуемых                     | ДНКЖ/SH | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + RNNO |
|--|---------|-------------------------------------|
| Здоровые лица (n = 10)                 | 3–20    | Следы                               |
| ЛОП-больные (n = 6)                    | 6–20    | 1–2,5                               |
| Острый панкреатит (n = 8)              | 6–15    | 0,8–3                               |
| Острый холецистит (n = 1)              | 5,5     | 0,9                                 |
| Абсцесс печени (n = 1)                 | 8       | 0,6                                 |
| Острый аппендицит (n = 2)              | 4–10    | 2,5–10                              |
| Острая кишечная непроходимость (n = 1) | 5,5     | 4,5                                 |
| ОРЗ (n = 4)                            | 7,5–15  | 0,3–1,2                             |

**Примечание:** RSNO и RNO<sub>2</sub> во всех образцах присутствовали в следовых количествах. Концентрация нитрата у здоровых и больных варьировала от 10 до 150 мкМ.

**Таблица 2.** Концентрация нитро- и нитрозосоединений в плазме крови больных, страдающих воспалительными заболеваниями, при поступлении в стационар и при выписке (мкМ)

| Пациент, № | Диагноз           | ДНКЖ/SH     |            | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + RNNO |         | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |              |
|------------|-------------------|-------------|------------|-------------------------------------|---------|------------------------------|--------------|
|            |                   | Поступление | Выписка    | Поступление                         | Выписка | Поступление                  | Выписка      |
| 1          | Острый гайморит   | 15,0 ± 0,9  | 7,0 ± 0,5  | 1,5 ± 0,08                          | Следы   | 150,0 ± 13,0                 | 120,0 ± 12,0 |
| 2          | То же             | 25,0 ± 2,0  | 20,0 ± 2,0 | 1,0 ± 0,05                          | Следы   | 45,0 ± 5,0                   | 20,0 ± 1,8   |
| 3          | То же             | 12,5 ± 1,0  | 7,0 ± 0,8  | 1,2 ± 0,07                          | Следы   | 84,0 ± 7,8                   | 60,0 ± 5,5   |
| 4          | Острый холецистит | 5,5 ± 0,45  | 4,0 ± 0,3  | 0,9 ± 0,05                          | Следы   | 38,0 ± 2,8                   | 55,0 ± 2,5   |
| 5          | ОРЗ               | 10,0 ± 0,75 | 7,5 ± 0,3  | 1,2 ± 0,08                          | Следы   | 32,0 ± 1,6                   | 54,0 ± 3,0   |

**Примечание:** данные представлены как M ± m, n = 4.

[5, 6]. Для определения состава нитро- и нитрозосоединений крови использовался разработанный и запатентованный нами ферментный сенсор, позволяющий с высокой точностью (до 50 нМ) и с высокой специфичностью определить основные группы метаболитов NO в биологических объектах без предварительной очистки. Метод основан на уникальном свойстве нитрита, N-нитрозосоединений, S-нитрозотиолов (RSNO) и ДНКЖ ингибировать каталазу в присутствии галогид-ионов и на утрате ими этого свойства под действием определенных химических агентов, различных для каждой группы соединений [5, 7–10]. Так, ДНКЖ разрушаются хелаторами железа (ЭДТА, о-фенантролин), а высвобождающийся NO связывается оксигемоглобином — ловушкой NO, в связи с чем ингибирующий эффект утрачивается. RSNO можно трансформировать в ДНКЖ в присутствии закисного железа. Нитрит и RNNO не продуцируют в нейтральной среде нитрозильных комплексов железа и не теряют способности ингибировать каталазу в среде, содержащей хелатор железа и ловушку NO ни до, ни после добавления закисного железа и тиолов. Других эффективных ингибиторов каталазы биологические объекты в норме не содержат [10, 11]. Высокомолекулярные нитраты (RNO<sub>2</sub>), в отличие от неорганического нитрата, могут приобретать ингибирующие свойства ДНКЖ в присутствии закисного железа и тиолов [12]. Под действием треххлористого ванадия все нитрозосоединения восстанавливаются до нитрозосостояния и приобретают способность ингибировать каталазу [11].

При помощи ферментного сенсора установлено, что в норме концентрация нитрита и RNNO в плазме крови составляет менее 50 нМ. Однако при воспалении, в связи с трансформацией содержащихся в плазме ДНКЖ под действием продуцируемых активированными лейкоцитами АФК, содержание нитрита и RNNO резко возрастает при пропорциональном снижении содержания ДНКЖ, которые в норме в плазме крови регистрируются в микромолярных концентрациях [6, 10, 11, 13]. Концентрация в плазме крови нитрита и RNNO, превышающая 100 нМ, — однозначный признак воспаления, поскольку у всех исследованных нами больных с выраженными симптомами воспаления суммарное содержание нитрита и RNNO (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO) в плазме было значительно выше 100 нМ. При

купировании воспалительного процесса содержание этих соединений возвращалось к норме. В то же время повышение концентрации NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO в плазме крови наблюдалось задолго до наступления клинических симптомов [14–16].

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что суммарная концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO в плазме крови больных с воспалительными заболеваниями варьировала от 0,3 мкМ (больной с ОРЗ) до 10 мкМ (больной с острым аппендицитом). По мере выздоровления концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO снижалась до следовой (табл. 2, 3). В содержании других нитро- и нитрозосоединений каких-либо достоверных изменений не отмечено (табл. 2). Концентрация нитрата в плазме крови здоровых лиц и больных колебалась от 10 до 150 мкМ [10]. Каких-либо достоверных изменений его содержания при выздоровлении больных с воспалительными заболеваниями также не выявлено (табл. 2). Таким образом, установлено, что содержание нитрита и нитролатных нитрозосоединений (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO) в плазме крови человека, превышающее 100 нМ, — однозначный признак воспаления.

**Таблица 3.** Концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO в плазме крови пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, при поступлении в стационар и при выписке (мкМ)

| Пациент, № | Диагноз           | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + RNNO при поступлении | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + RNNO при выписке |
|------------|-------------------|---|---|
| 1          | Острый гайморит   | 1,5 ± 0,15  | Следы   |
| 2          | Острый гайморит   | 1,1 ± 0,09  | Следы   |
| 3          | Острый гайморит   | 0,9 ± 0,05  | Следы   |
| 4          | Острый холецистит | 0,9 ± 0,05  | Следы   |
| 5          | Абсцесс печени    | 0,6 ± 0,05  | Следы   |
| 6          | Острый аппендицит | 10,0 ± 0,9  | 0,8 ± 0,08                                      |
| 7          | Острый аппендицит | 2,5 ± 0,2   | Следы   |
| 8          | Панкреонекроз     | 0,85 ± 0,07   | Следы   |
| 9          | Панкреонекроз     | 2,7 ± 0,3   | 0,5 ± 0,03                                      |
| 10         | Панкреонекроз     | 1,25 ± 0,15   | 0,45 ± 0,03                                     |
| 11         | ОРЗ               | 0,3 ± 0,08  | Следы   |
| 12         | ОРЗ               | 1,2 ± 0,08  | Следы   |
| 13         | ОРЗ               | 1,7 ± 0,1   | Следы   |

**Примечание:** данные представлены как M ± m, n = 4.

**Применение ферментного сенсора для контроля состояния больных в неврологическом стационаре**

Под наблюдением находились 29 больных с острым ишемическим инсультом (ИИ) (15 мужчин и 14 женщин, средний возраст — 71,9 ± 10,8 года), госпитализированных в течение первых суток от момента развития заболевания в клинику кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Диагноз ИИ, локализацию и объем поражения устанавливали на основании клинической картины и подтверждали результатами компьютерной томографии или магнитно-резонансной томографии головного мозга. В исследование не включали больных с геморрагическим или смешанным характером инсульта, локализацией очага в вертебрально-базиллярной системе, со сроком ИИ более 24 ч с момента развития, с онкологическими заболеваниями.

Для диагностики воспалительного процесса в бронхолегочной или мочевыделительной системе использовали стандартные критерии клинического осмотра: повышение температуры тела до 37–39 °С, кашель со слизисто-гнойной мокротой; поллакиурия (учащенное мочеиспускание), изменение цвета и состава мочи (мутная, зловонная), увеличение количества лейкоцитов в периферической крови, повышение СОЭ, лейкоцитурия и протеинурия. Для подтверждения диагноза также использовали рентгенографию легких, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, бактерио-

логическое исследование биологических сред (мокрота, моча, кровь). Определение концентрации NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO проводили на 1, 5 и 21-е сутки с момента поступления в стационар.

При поступлении в стационар концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO, превышающая 0,1 мкМ, была зарегистрирована у 9 больных — № 1, 3, 8, 11, 14, 17, 19, 20, 24 (табл. 4). Клинические симптомы воспаления были отмечены у 3 из них — № 14, 17, 24. У этих же больных были также зафиксированы повышенные показатели количества лейкоцитов и СОЭ. Однако эти показатели были повышенными еще у 6 больных, у которых не было клинических симптомов воспаления; концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO у них была менее 0,1 мкМ (№ 4, 5, 6, 16, 27, 28).

На 5-е сутки клинические симптомы воспаления проявились еще у 4 больных из числа тех, у кого при поступлении содержание NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO было повышенным. В 2 случаях было выявлено обострение хронического пиелонефрита (№ 8, 19), в 1 случае — обострение хронического бронхита (№ 1) и в 1 — пневмония (№ 20). Повышенная концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO была зафиксирована еще у 5 больных, у которых при поступлении этот показатель был в норме (№ 2, 6, 12, 22, 23). Во всех случаях отмечены симптомы воспаления (табл. 5).

Как видно из табл. 6, к 21-м суткам вследствие проведенной антибактериальной и противовоспалительной терапии симптомы воспаления сохранились только у 4 больных — № 7, 17, 22, 23. Им соответствовало повышенное содержание NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO в плазме крови. У остальных больных

**Таблица 4.** Концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + RNNO в плазме крови, клинические и лабораторные показатели у больных с ИИ при поступлении в стационар

| Номер наблюдения | Концентрация NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + RNNO, мкМ | Наличие клинических симптомов воспаления | Проводимая антибактериальная и противовоспалительная терапия | Лейкоциты, тыс/мм <sup>3</sup> (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15) |
|------------------|---|--|--|---|-------------------------|
| 1                | 0,4   | Нет                                      | –  | 6,7   | 8                       |
| 2                | <0,1  | Нет                                      | –  | 7,9   | 10                      |
| 3                | 0,5   | Нет                                      | –  | 8,8   | 9                       |
| 4                | <0,1  | Нет                                      | –  | 9,7   | 10                      |
| 5                | <0,1  | Нет                                      | –  | 15,7  | 11                      |
| 6                | <0,1  | Нет                                      | –  | 10,5  | 20                      |
| 7                | <0,1  | Нет                                      | –  | 7,0   | 9                       |
| 8                | 0,8   | Нет                                      | –  | 8,9   | 8                       |
| 9                | <0,1  | Нет                                      | –  | 7,8   | 8                       |
| 10               | <0,1  | Нет                                      | –  | 5,8   | 11                      |
| 11               | 1,0   | Нет                                      | –  | 17,0  | 9                       |
| 12               | <0,1  | Нет                                      | –  | 7,2   | 4                       |
| 13               | <0,1  | Нет                                      | –  | 6,6   | 9                       |
| 14               | 2,5   | Госпитальная двусторонняя пневмония      | Цефтриаксон, тиамфениколаглицинат ацетилцистеинат            | 4,7   | 18                      |
| 15               | <0,1  | Нет                                      | –  | 9,4   | 3                       |
| 16               | <0,1  | Нет                                      | –  | 10,5  | 17                      |
| 17               | 1,2   | Левосторонняя нижнедолевая пневмония     | Цефтриаксон  | 12,1  | 22                      |
| 18               | <0,1  | Нет                                      | –  | 4,5   | 3                       |
| 19               | 0,5   | Нет                                      | –  | 9,4   | 15                      |
| 20               | 0,6   | Нет                                      | –  | 5,2   | 9                       |
| 21               | <0,1  | Нет                                      | –  | 9,2   | 10                      |
| 22               | <0,1  | Нет                                      | –  | 10,9  | 10                      |
| 23               | <0,1  | Нет                                      | –  | 7,0   | 11                      |
| 24               | 1,2   | Острый пиелонефрит                       | –  | 11,7  | 25                      |
| 25               | <0,1  | Нет                                      | –  | 6,5   | 8                       |
| 26               | <0,1  | Нет                                      | –  | 9,1   | 7                       |
| 27               | <0,1  | Нет                                      | –  | 15,7  | 10                      |
| 28               | <0,1  | Нет                                      | –  | 11,1  | 8                       |
| 29               | <0,1  | Нет                                      | –  | 7,0   | 13                      |

Таблица 5. Концентрация  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови, клинические и лабораторные показатели у пациентов с ИИ на 5-е сутки после поступления в стационар

| Номер наблюдения | Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ , мкМ | Наличие клинических симптомов воспаления                                 | Проводимая антибактериальная и противовоспалительная терапия       | Лейкоциты, тыс/мм <sup>3</sup> (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15) |
|------------------|--|--|--|---|-------------------------|
| 1                | 0,3  | Обострение хронического бронхита   | –  | 7,7   | 23                      |
| 2                | 1  | Тромбоз глубоких вен левой голени, тромбофлебит левой голени             | –  | 7,9   | 10                      |
| 3                | 0,4  | Нет  | –  | 7,4   | 30                      |
| 4                | <0,1   | Нет  | –  | 13,8  | 4                       |
| 5                | <0,1   | Нет  | –  | 11,3  | 8                       |
| 6                | 0,9  | Обострение хронического пиелонефрита                                     | Цефтриаксон, цiproфлоксацин, нитроксолин                           | 11,3  | 10                      |
| 7                | <0,1   | Нет  | –  | 8,8   | 12                      |
| 8                | 0,8  | Обострение хронического пиелонефрита, тромбоз вен правой голени          | Цiproфлоксацин, нитроксолин  | 7   | 20                      |
| 9                | <0,1   | Нет  | –  | 7,7   | 6                       |
| 10               | <0,1   | Нет  | –  | 4,7   | 10                      |
| 11               | 1,2  | Нет  | –  | 10  | 14                      |
| 12               | 0,45   | Обострение хронического пиелонефрита, обострение хронического простатита | Индометацин, цiproфлоксацин  | 8,1   | 22                      |
| 13               | <0,1   | Нет  | –  | 6,5   | 30                      |
| 14               | 0,25   | Нет  | Цефтриаксон, тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат                 | 6,5   | 18                      |
| 15               | <0,1   | Нет  | –  | 9,9   | 5                       |
| 16               | <0,1   | Нет  | –  | 9,2   | 20                      |
| 17               | 1,0  | Левосторонняя нижнедолевая пневмония                                     | Дексаметазон, кларитромицин, цiproфлоксацин                        | 13,3  | 27                      |
| 18               | <0,1   | Нет  | –  | 6,4   | 8                       |
| 19               | 0,25   | Обострение хронического пиелонефрита                                     | Цiproфлоксацин, тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, нитроксолин | 14,8  | 20                      |
| 20               | 0,7  | Правосторонняя нижнедолевая пневмония                                    | Цефтриаксон  | 4,1   | 19                      |
| 21               | <0,1   | Нет  | –  | 4,7   | 25                      |
| 22               | 0,6  | Двусторонняя нижнедолевая пневмония                                      | Тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, цефтриаксон                 | 11,3  | 12                      |
| 23               | 0,7  | Двусторонняя полисегментарная пневмония                                  | Офлоксацин, кларитромицин  | 9,5   | 40                      |
| 24               | 0,4  | Острый цистит, тромбоз суральных и малоберцовых вен левой голени         | Цiproфлоксацин   | 9,7   | 38                      |
| 25               | <0,1   | Нет  | –  | 6,2   | 30                      |
| 26               | <0,1   | Нет  | –  | 6,4   | 15                      |
| 27               | <0,1   | Нет  | –  | 12,3  | 25                      |
| 28               | <0,1   | Нет  | –  | 11,2  | 18                      |
| 29               | <0,1   | Нет  | –  | 7,9   | 25                      |

воспалительных симптомов не отмечалось и содержание  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  было менее 0,1 мкМ. Показательно, что при общей нормализации как клинических показателей, так и содержания  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в большинстве случаев регистрируются повышенные значения СОЭ, а в ряде случаев и повышенное количество лейкоцитов. В то же время не зафиксировано ни одного случая, когда при наличии симптомов воспаления показатель  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  оставался в пределах нормы, — как в данном исследовании, так и в других [14–16].

Таким образом, концентрация в плазме крови  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  более 100 нМ — высокочувствительный и высокоспецифичный показатель наличия воспалительного процесса, превосходящий используемые в настоящее время лабораторные показатели. Нитрит и RNNO появляются в крови до возникновения клинических признаков и исчезают позже нормализации клинической картины. На примере 29 больных с острым ИИ показано, что использование показателя суммарного содержания нитрита и N-нитрозосоединений в плазме крови в качестве теста на наличие генерализованного воспалительного процесса позволяет своевременно и однозначно опреде-

лять его начало до появления клинических признаков воспаления, а также осуществлять оперативный контроль за ходом лечения. Последнее особенно важно в связи с ограниченной коммуникабельностью неврологических больных.

#### Применение ферментного сенсора для диагностики хориоамнионита при преждевременном излитии околоплодных вод

Актуальной проблемой современного акушерства являются преждевременные роды, при которых перинатальная смертность и заболеваемость в 2–3 раза выше, чем при своевременных родах. Досрочные роды в 25–54 % случаев начинаются с преждевременного излития околоплодных вод (ПИОВ) [17, 18]. Хориоамнионит и внутриутробное инфицирование могут быть как следствием, так и причиной ПИОВ. В связи с этим важна своевременная диагностика воспаления и внутриутробного инфицирования. Такие показатели, как СОЭ и число лейкоцитов в периферической крови, не всегда являются достаточно информативными критериями [19]. Широко

**Таблица 6.** Концентрация  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови, клинические и лабораторные показатели у пациентов с ИИ на 21-е сутки после поступления в стационар

| Номер наблюдения | Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ , мкМ | Наличие клинических симптомов воспаления  | Проводимая антибактериальная и противовоспалительная терапия       | Лейкоциты, тыс/мм <sup>3</sup> (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15) |
|------------------|--|---|--|---|-------------------------|
| 1                | <0,1   | Нет   | –  | 7,7   | 23                      |
| 2                | <0,1   | Нет   | –  | 7,6   | 13                      |
| 3                | <0,1   | Нет   | –  | 7,5   | 27                      |
| 4                | <0,1   | Нет   | –  | 6,5   | 5                       |
| 5                | <0,1   | Нет   | –  | 13,9  | 32                      |
| 6                | <0,1   | Нет   | Цефтриаксон, цiproфлоксацин, нитроксолин                           | 7,5   | 20                      |
| 7                | 0,2  | Обострение хронического цистита   | –  | 5,4   | 32                      |
| 8                | <0,1   | Нет   | Цiproфлоксацин, нитроксолин  | 7,6   | 26                      |
| 9                | <0,1   | Нет   | –  | 8,1   | 8                       |
| 10               | <0,1   | Нет   | –  | 6,0   | 12                      |
| 11               | <0,1   | Нет   | –  | 9,4   | 18                      |
| 12               | <0,1   | Нет   | Индометацин, цiproфлоксацин  | 7,2   | 21                      |
| 13               | <0,1   | Нет   | –  | 8,0   | 36                      |
| 14               | <0,1   | Нет   | –  | 4,5   | 11                      |
| 15               | <0,1   | Нет   | –  | –   | –                       |
| 16               | <0,1   | Нет   | –  | –   | –                       |
| 17               | 0,7  | Левосторонняя нижнедолевая пневмония, стадия разрешения   | Дексаметазон, кларитромицин, цiproфлоксацин                        | 4,7   | 20                      |
| 18               | <0,1   | Нет   | –  | 5,6   | 6                       |
| 19               | <0,1   | Нет   | Цiproфлоксацин, тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, нитроксолин | 6,4   | 10                      |
| 20               | <0,1   | Нет   | Цефтриаксон  | 6,4   | 30                      |
| 21               | <0,1   | Нет   | –  | 4,0   | 31                      |
| 22               | 0,8  | Двусторонняя нижнедолевая пневмония   | Тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат, цефтриаксон                 | 13,8  | 64                      |
| 23               | 1,25   | Полисегментарная двусторонняя пневмония, тромбоз глубоких вен правой голени, обострение хронического пиелонефрита | Офлоксацин, кларитромицин  | 7,7   | 40                      |
| 24               | <0,1   | Нет   | Цiproфлоксацин   | 21,1  | 45                      |
| 25               | <0,1   | Нет   | –  | 7,1   | 25                      |
| 26               | <0,1   | Нет   | –  | 7,1   | 18                      |
| 27               | <0,1   | Нет   | –  | 8,7   | 32                      |
| 28               | <0,1   | Нет   | –  | 9,8   | 13                      |
| 29               | <0,1   | Нет   | –  | 7,6   | 20                      |

используемый сегодня показатель содержания С-реактивного белка (СРБ) имеет большой разброс значений у здоровых людей [19]. Таким образом, существует большая потребность в разработке метода ранней диагностики воспаления, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью.

Согласно полученным данным, при нормально протекающей беременности без диагностированных воспалительных осложнений концентрация  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови находится в пределах нормы и составляет менее 0,1 мкМ. В то же время у всех пациенток с ПИОВ концентрация  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  была существенно выше и составляла от 0,4 до 2,5 мкМ (табл. 7). Повышенное содержание  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  однозначно свидетельствует о наличии неспецифического воспаления [14–16]. Увеличение концентрации  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  отмечено и у некоторых пациенток, у которых не было диагностировано ПИОВ, что может быть связано с воспалительными процессами, непосредственно не связанными с беременностью (табл. 7). Важно отметить, что у всех беременных с ПИОВ зарегистрировано значительное увеличение концентрации  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови — до 2,5 мкМ; ранее такие концентрации фиксировались нами только при остром аппенди-

ците или остром панкреатите [14]. При этом такие показатели, как количество лейкоцитов в крови и СРБ у обследованных пациенток были либо в норме, либо слегка ее превышали (табл. 8 и 9). Заметим, что у беременных показатель СОЭ в норме может быть умеренно повышен — до 20–30 мм/ч. Тот факт, что во всех 33 наблюдениях ПИОВ выявлено увеличение содержания  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови, позволяет предполагать, что оно связано именно с внутриутробным инфицированием и воспалением. В табл. 9 представлены данные об изменении концентрации  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови под действием противовоспалительных и антибактериальных препаратов. Назначенная терапия способствовала снижению содержания  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  до 0,1 мкМ и менее.

**Таблица 7.** Концентрация  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови беременных

| Группа обследуемых                   | $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ , мкМ |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Здоровые беременные (n = 6)          | <0,1                                |
| ПИОВ (n = 33)                        | 0,4–2,5                             |
| Угроза преждевременных родов (n = 4) | <0,1–0,8                            |



Таблица 8. Концентрация  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови и лабораторные показатели у беременных с ПИОВ

| Номер наблюдения | Возраст, лет | Срок беременности, нед | $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ , мкМ | Лейкоциты, тыс/мм <sup>3</sup> (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма — 2–15, при беременности до 30) | СРБ, мг/л (норма: 0,068–8,2) |
|------------------|--------------|------------------------|-------------------------------------|---|--|------------------------------|
| 1                | 39           | 30–31                  | 0,6                                 | 5,8   | 27   | –                            |
| 2                | 39           | 35–36                  | 1,6                                 | 10,7  | –  | –                            |
| 3                | 29           | 27–28                  | 0,45                                | 7,3   | 25   | 1,2                          |
| 4                | 36           | 36                     | 1,2                                 | 8,3   | –  | –                            |
| 5                | 28           | 29                     | 2,5                                 | 9,7   | –  | 3,1                          |
| 6                | 33           | 28–29                  | 1,25                                | 13  | 24   | 1,8                          |
| 7                | 26           | 30–31                  | 0,8                                 | 11  | –  | 1,0                          |

Таблица 9. Изменение концентрации  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  в плазме крови и лабораторных показателей у беременных с ПИОВ на фоне антибактериальной и противовоспалительной терапии

| Номер наблюдения, срок исследования | Срок беременности, нед | Антибактериальная и противовоспалительная терапия                         | $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$ , мкМ | Лейкоциты, тыс/мм <sup>3</sup> (норма: 4–9) | СОЭ, мм/ч (норма: 2–15, при беременности до 30) | СРБ, мг/л (норма: 0,068–8,2) |
|-------------------------------------|------------------------|---|-------------------------------------|---|---|------------------------------|
| 1: исходные показатели              | 29–30                  | Фортум (1,0 г, 3 раза в день, в/м), клафобрин (1,0 г, 3 раза в день, в/м) | 2,5                                 | 9,7   | 28  | 3,1                          |
| 1: через 4 дня лечения              |                        |   | 0,8                                 | 8,4   | 26  | 1,2                          |
| 2: исходные показатели              | 28–29                  | Цефазолин (1,0 г, 3 раза в день, в/м)                                     | 1,25                                | 13,2  | 25  | 1,8                          |
| 2: через 4 дня лечения              |                        |   | <0,1                                | 9,6   | 24  | 2,0                          |
| 3: исходные показатели              | 30–31                  | Амоксиклав (1,2 г, 3 раза в день, в/м)                                    | 0,8                                 | 11,7  | 23  | 1,0                          |
| 3: через 4 дня лечения              |                        |   | <0,1                                | 15,6  | 27  | 3,2                          |

### Возможности использования показателя концентрации метаболитов оксида азота в плазме крови в клинической диагностике

Вследствие высокой чувствительности метода (возможность определения концентрации  $\text{NO}_2^- + \text{RNNO}$  до 50 нМ) для проведения анализа достаточно 1,0 мл крови. Производительность зависит исключительно от используемого метода определения активности каталазы. Оптимальным представляется калориметрический метод, основанный на регистрации кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение перекиси водорода каталазой [5, 20, 21].

В этом случае ни мутность, ни окраска образца не являются помехой в определении, а потому нет необходимости в предварительной подготовке образца, отсутствует также потребность в использовании дорогостоящих реактивов. Необходимы следующие реактивы: физиологический рас-

твор (0,15 М NaCl, 20 мМ фосфатный буфер, pH 6,0); раствор нитрита для калибровки; гемолизированные эритроциты (полученные от того же больного, чья плазма исследуется [14]), являющиеся источником и каталазы, и оксигемоглобина — ловушки NO; перекись водорода (3 % раствор); ЭДТА (для разрушения ДНКЖ), раствор железа (II) — для перевода RSNO в ДНКЖ [9, 12, 21]. На исследование одного образца уходит от 1 до 3 мин, вследствие чего один оператор за 1 ч может измерять до 15 образцов. Указанные параметры анализа позволяют осуществлять непрерывный контроль больных, находящихся в стационаре. Особенно ценным такой мониторинг может быть в неврологических, психиатрических, реанимационных стационарах — в случаях больных с ограниченной коммуникабельностью, когда применение рассматриваемого метода представляется единственным эффективным способом вовремя диагностировать больничную пневмонию и прочие воспалительные заболевания.

### Литература

- Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994; 341 (1): 65–8.
- McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J.* 1989; 261 (1): 293–6.
- Gudkov LL, Shumaev KB, Kalenikova EI, Gubkina SA, Vanin AF, Ruuge EK. Antioxidant and prooxidant action of nitric oxide donors and metabolites. *Biofizika.* 2007; 52 (3): 503–9.
- Shumaev KB, Gubkin AA, Gubkina SA. Interaction between albumin-bound dinitrosyl iron complexes and reactive oxygen species. *Biofizika.* 2007; 52 (3): 534–8.
- Титов В. Ю., Осипов А. Н., Крейнина М. В., Ванин А. Ф. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при воспалении. *Биофизика.* 2013; 58 (5): 857–70.
- Титов В. Ю., Болдырихин В. С., Иванова А. В., Осипов А. Н. Возможный механизм образования нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме крови при воспалительных процессах. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2014; 155 (4): 479–82.
- Titov VY, Petrenko YM. Nitrite-catalase interaction as an important element of nitrite toxicity. *Biochemistry (Mosc).* 2003; 68 (6): 627–33.
- Titov VY. Interaction of nitrite with hydrogen peroxide-destroying enzymes as an important element of nitrite toxicity. *Curr Enzym Inhib.* 2006; 2 (1): 1–17.
- Titov VY, Petrenko YM, Vanin AF. Mechanism of inhibition of catalase by nitro and nitroso compounds. *Biochemistry (Mosc).* 2008; 73 (1): 92–6.
- Титов В. Ю., Петренко Ю. М., Ванин А. Ф. Ферментативный сенсор для определения содержания нитро- и нитрозосоединений в биологических объектах. *Клин. лаб. диагностика.* 2009; 9: 6–14.
- Titov V. The enzymatic technologies open new possibilities for studying nitric oxide (NO) metabolism in living systems. *Curr Enzym Inhib.* 2011; 7: 56–70.

12. Titov VY. Mechanisms of interaction of nitric oxide (NO) and its metabolites with enzymes responsible for the physiological effects of NO. *Curr Enzym Inhib.* 2008; 4 (2): 73–81.
13. Титов В. Ю., Иванова А. В., Петров В. А., Сerezhenkov В. А., Микоян В. Д., Ванин А. Ф. и др. Может ли суммарное содержание нитрита и нитрата служить показателем интенсивности синтеза оксида азота (NO) в тканях организма? *Бюл. экспер. биол. и мед.* 2012; 153 (6): 816–9.
14. Титов В. Ю., Иванова А. В., Агапов М. А., Петров В. А. Содержание нитрита и N-нитрозосоединений плазмы как важный диагностический показатель. *Клин. лаб. диагностика.* 2011; 11: 13–9.
15. Титов В. Ю., Иванова А. В., Петров В. А., Балякин Ю. В., Осипов А. Н., Камчатнов П. Р. и др. Ранняя диагностика воспалительных заболеваний у больных с острым ишемическим инсультом. *Журн. неврол. и психиатр.* 2012; 7: 4–9.
16. Титов В. Ю., Осипов А. Н., Балицкий С. П., Шалина Р. И. Ранняя диагностика хориоамнионита и внутриутробного инфицирования при преждевременном излитии околоплодных вод по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме. *Клин. лаб. диагностика.* 2013; 12: 7–10.
17. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371 (9606): 75–84.
18. Mathew TJ, MacDorman MF. Infant mortality statistics from the 2003 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep.* 2006; 54 (16): 1–29.
19. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342 (20): 1500–7.
20. Титов В. Ю., Осипов А. Н., Горский В. А., Агапов М. А., Иванова А. В., Балякин Ю. В., Камчатнов П. Р., Жданова С. Г., авторы; ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», патентообладатель. Способ диагностики острого неспецифического воспалительного процесса. Патент РФ № 2461831. 20.09.2012.
21. Титов В. Ю., Петренко Ю. М., Петров В. А. Калориметрическое исследование окисления аскорбиновой кислоты пероксидазой хрена. *Биофизика.* 1992; 37 (1): 17–22.

## References

1. Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994; 341 (1): 65–8.
2. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J.* 1989; 261 (1): 293–6.
3. Gudkov LL, Shumaev KB, Kalenikova EI, Gubkina SA, Vanin AF, Ruuge EK. Antioxidant and prooxidant action of nitric oxide donors and metabolites. *Биофизика.* 2007; 52 (3): 503–9.
4. Shumaev KB, Gubkin AA, Gubkina SA. Interaction between albumin-bound dinitrosyl iron complexes and reactive oxygen species. *Биофизика.* 2007; 52 (3): 534–8.
5. Titov VY, Osipov AN, Kreynina MV, Vanin AF. Osobennosti metabolizma oksida azota v norme i pri vospalenii. *Биофизика.* 2013; 58 (5): 857–70. Russian.
6. Titov VY, Boldyrikhin VS, Ivanova AV, Osipov AN. Vozmozhnyj mekhanizm obrazovaniya nitrita i netiolatnykh nitrozosoedineniy v plazme krovi pri vospalitel'nykh protsessakh. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2014; 155 (4): 479–82. Russian.
7. Titov VY, Petrenko YM. Nitrite-catalase interaction as an important element of nitrite toxicity. *Biochemistry (Mosc).* 2003; 68 (6): 627–33.
8. Titov VY. Interaction of nitrite with hydrogen peroxide-destroying enzymes as an important element of nitrite toxicity. *Curr Enzym Inhib.* 2006; 2 (1): 1–17.
9. Titov VY, Petrenko YM, Vanin AF. Mechanism of inhibition of catalase by nitro and nitroso compounds. *Biochemistry (Mosc).* 2008; 73 (1): 92–6.
10. Titov VY, Petrenko YM, Vanin AF. Fermentativnyj sensor dlya opredeleniya sodержaniya nitro- i nitrozosoedinenij v bioob'ektakh. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2009; 9: 6–14. Russian.
11. Titov V. The enzymatic technologies open new possibilities for studying nitric oxide (NO) metabolism in living systems. *Curr Enzym Inhib.* 2011; 7: 56–70.
12. Titov VY. Mechanisms of interaction of nitric oxide (NO) and its metabolites with enzymes responsible for the physiological effects of NO. *Curr Enzym Inhib.* 2008; 4 (2): 73–81.
13. Titov VY, Ivanova AV, Petrov VA, Serezhenkov VA, Mikoyan VD, Vanin AF et al. Mozhet li summarnoe sodержanie nitrita i nitrata sluzhit' pokazatelem intensivnosti sinteza oksida azota (NO) v tkanyakh organizma? *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2012; 153 (6): 816–9. Russian.
14. Titov VY, Ivanova AV, Agapov MA, Petrov VA. Soderzhanie nitrita i N-nitrozosoedinenij plazmy kak vazhnyj diagnosticheskij pokazatel'. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2011; 11: 13–9. Russian.
15. Titov VY, Ivanova AV, Petrov VA, Balyakin YV, Osipov AN, Kamchatnov PR et al. Rannaya diagnostika vospalitel'nykh zabolevanij u bol'nykh s ostrym ishemicheskim insul'tom. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S. S. Korsakova.* 2012; 7: 4–9. (In Russian).
16. Titov VY, Osipov AN, Balitskij SP, Shalina RI. Rannaya diagnostika khorioamniionita i vnutriutrobnogo infitsirovaniya pri prezhdevremennom izlitiu okoloplodnykh vod po sodержaniyu nitrita i netiolatnykh nitrozosoedinenij v plazme. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2013; 12: 7–10. Russian.
17. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371 (9606): 75–84.
18. Mathew TJ, MacDorman MF. Infant mortality statistics from the 2003 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep.* 2006; 54 (16): 1–29.
19. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342 (20): 1500–7.
20. Titov VY, Osipov AN, Gorskij VA., Agapov MA., Ivanova AV., Balyakin YV, Kamchatnov PR, Zhdanova SG, inventors; Russian State Medical University of Federal Agency for Health and Social Development, assignee. Sposob diagnostiki ostrogo nespetsificheskogo vospalitel'nogo protsessa. Russian Federation patent RF 2461831. 2012 Sep 20.
21. Titov VY, Petrenko YM, Petrov VA. Kalorimetriceskoe issledovanie okisleniya askorbinovoj kisloty peroksidazoj khrena. *Биофизика.* 1992; 37 (1): 17–22. Russian.