

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА, ЛИЗОЦИМА, СПЕРМИНА И СПЕРМИДИНА В ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЬСТВА

Бойко О. В.¹, Ахминеева А. Х.¹, Гудинская Н. И.¹, Бойко В. И.², Козак Д. М.¹,
Алексашина Л. И.²

1. ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань

2. ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Астрахань, e-mail oboyku08@rambler.ru

В статье детально проанализировано наличие в биологических средах организма (сыворотке крови и семенной плазме) резидентных и транзитных носителей различных видов стафилококков, а именно – *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, преципитирующих факторов к лизоциму, лактоферрину, спермину и спермидину. Эти факторы при постановке контрольных реакций отсутствовали у здоровых людей.

Было установлено, что выявленные нами изменения в количественном уровне биохимических параметров биологических жидкостей бактерионосителей, сопровождающиеся при этом фоновой персистенцией бактерий и вступающие в различные взаимоотношения с этими параметрами, сопровождаются реакцией со стороны иммунной системы человека.

Простота, доступность и высокая информативность этих методов делают их весьма перспективными для дальнейших исследований и использования в повседневной практике лабораторий.

Ключевые слова: лизоцим, лактоферрин, спермин, спермидин, преципитация, бактерионосительство.

THE USE OF LACTOFERRIN, LYSOZINE, SPERMINE AND SPERMIDINE FOR IMMUNOCHEMISTRY DIAGNOSTICS OF BACTERIACARRIER

Boiko O. V.¹, Akhmineeva A. Kh.¹, Gudinskaya N. I.¹, Boyko V. I.², Kozak M. D.¹,
Aleksashina L. I.²

1. Astrakhan State Medical Academy, the Ministry of Health of Russia, Astrakhan

2. Astrakhan State University, Astrakhan

The article analyzes in detail the presence of the organism in biological samples (serum and seminal plasma) resident and transient carriers various staphylococci, namely *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, precipitating factors to lysozyme, lactoferrin, spermine and spermidine. These factors in setting the control reactions were absent in healthy individuals.

It has been found that changes in the world identified quantitatively biochemical parameters of biological fluids bacteria carriers accompanied with background bacterial persistence and entering into various relationships with these parameters, followed by a reaction from the human immune system.

Simplicity, accessibility and high information of these methods makes them very promising for further research and routine analysis laboratories.

Keywords: lysozyme, lactoferrin, spermine, spermidine, precipitation, bacteria carrier.

За последние годы проблема отклонения от нормы биохимических и иммунологических показателей у бактерионосителей получила новое направление развития. Наметилась необходимость выявления при этой патологии наиболее значимых в прогностическом плане маркеров, так как нахождение чужеродного возбудителя в организме человека не может не сопровождаться изменениями со стороны состава биологических жидкостей. В результате возможно возникновение различных процессов, природа которых выходит за привычные рамки реакции антиген-антитело [1, 2, 3, 5].

Мы предположили, что в случае персистенции бактерий, когда организм человека длительно контактирует с чужеродным агентом и не может его элиминировать, во внутренней среде будут происходить изменения, которые можно зафиксировать в лаборатории с использованием максимально простых приемов [4]. Поиск подобных маркеров и явился целью нашего исследования.

Материалы и методы. В основу предлагаемого метода легла реакция иммунопреципитации в агаровом геле. Он заключается в том, что в расплавленный и охлажденный до 50°C 1 % агар Дифко с 1 % NaCl вносили биологически активные вещества (лизоцим, лактоферрин, спермин и спермидин), выполняющие, по нашему мнению, одну из ключевых ролей в реализации процесса бактерионосительства. 25 мл агара разливали на стеклянные пластины 9×12 сантиметров. После застывания агара в нем пробойником пробивали лунки и раскапывали в них сыворотку или спермоплазму пациентов. Контролем служили сыворотка и спермоплазма здоровых доноров.

Плашки инкубировали в течение 48 ч при 10°C во влажной камере, после чего проводили чтение результатов.

Результаты и обсуждение Установлено, что у бактерионосителей и в случае со спермой, и в варианте с сывороткой формировались четкие кольца преципитации. В то же время у здоровых лиц они отсутствовали. Диаметр колец не зависит от концентрации общего белка в пробе, так как в спермоплазме, где его концентрация существенно выше, диаметр сопоставим с диаметром колец при постановке реакции с сывороткой. Дальнейший анализ этого феномена показал, что субстраты биологических жидкостей, формирующие *in vitro* кольца преципитации в агаровом геле, являются водорастворимыми, так как последующая инкубация стекол в течение 6 дней в 5 % растворе хлорида натрия с трехкратной сменой раствора привела к исчезновению этих колец.

Применительно к каждому показателю были получены следующие результаты:

Факторы преципитации лизоцима (ФПЛ)

После инкубации было установлено, что у здоровых доноров в сыворотке крови и в спермоплазме этот показатель не определялся. У носителей патогенных стафилококков признак ФПЛ идентифицирован у 40 % обследованных. Распределение по различным видам носительства выглядит следующим образом (таблица 1).

Таблица 1

Уровень ФПЛ при различных видах носительства ($M \pm m$)

Вид микроорганизма	Вид носительства	Количество обследованных	Диаметр кольца преципитации	Достоверность различий
--------------------	------------------	--------------------------	-----------------------------	------------------------

		(n)	(мм)	
S. aureus	Резидентный	120	2,9±0,2	p<0,05
	Транзиторный	150	1,9±0,19	
S.epidermidis	Резидентный	140	1,79±0,09	p<0,05
	Транзиторный	170	1,19±0,07	

При этом из всех носителей золотистого стафилококка он выявлен у половины больных, а эпидермального – у 30 % пациентов. У резидентных носителей обоих видов стафилококков этот признак на 25 % обнаруживается чаще, чем у транзиторных (p<0,05).

Интересно, что наличие ФПЛ у пациентов коррелирует с таким показателем хронического воспалительного процесса как обнаружение агглютинатов в сперме ($r=0,511$). Считается установленным, что при простатитах, простатовезикулитах и эпидидимитах повышается содержание в спермоплазме мукополисахаридов, которые способны, взаимодействуя со скаферрином, изменять его физико-химические свойства, что и приводит к агглютинации сперматозоидов. Таким образом, получено дополнительное подтверждение высказанного нами ранее предположения о принадлежности ФПЛ к маркерам бактерионосительства, часто выражающегося в хронически протекающих воспалительных реакциях. В связи с этим логичными выглядят следующие результаты: при резидентном носительстве S. aureus диаметр кольца преципитации был наибольшим и составил 2,8 мм против 1,33 мм при резидентном носительстве S. epidermidis (p<0,01). В случае транзиторного носительства этот показатель отличается на 12,5 %. Таким образом, средний диаметр кольца преципитации у носителей золотистого стафилококка, вызывающего в организме человека более выраженные изменения, в среднем составляет 2,4 мм, а эпидермального – 1,49 мм (p<0,05).

Факторы преципитации лактоферрина (ФПЛФ)

В сыворотке и спермоплазме здоровых доноров определяемый показатель не идентифицирован.

У носителей патогенных стафилококков он выявлен в 55 % случаев. Интересно, что независимо от вида носительства он практически одинаково часто обнаруживался в случае инфицирования S. aureus – у 60 % пациентов, а S. epidermidis – у 50 %. Концентрация преципитирующих агентов в сыворотке носителей S. aureus достоверно выше, чем у

носителей *S. epidermidis* (2,9 мм против 1,34 мм $p<0,05$). Распределение по различным видам носительства представлено в таблице 2.

Таблица 2

Уровень ФПЛФ при различных видах носительства ($M\pm m$)

Вид микроорганизма	Вид носительства	Количество обследованных (n)	Диаметр кольца преципитации (мм)	Достоверность различий
<i>S. aureus</i>	Резидентный	120	3,0±0,1	$p<0,05$
	Транзиторный	150	1,9±0,06	
<i>S. epidermidis</i>	Резидентный	140	2,17±0,07	$p<0,05$
	Транзиторный	170	1,51±0,03	

Интересно, что показатель ФПЛФ в известной степени зависит от биологических параметров выделенного от пациента возбудителя, так как он обратной связью сильно коррелирует с антилизоцимной активностью стафилококка ($r=-0,726$). Параллельно установлена взаимосвязь наличия преципитирующих факторов с характеристиками самого организма – носителя, например, с возрастом обследуемого: расчет коэффициента детерминации установил, что величина ФПЛФ на 23,7 % зависит от возраста обследуемого: он выявлялся только у лиц старше 29 лет и ни разу не был обнаружен у более молодых пациентов. Кроме того, в ходе анализа спермограммы, выявлена прямая сильная связь регистрируемого показателя с количеством клеток сперматогенеза ($r=0,606$).

Факторы преципитации спермидина (ФПСД)

Этот признак наиболее часто встречался среди пациентов-бактерионосителей. Он выявлен у 65 % обследованных, при этом у не носителей он не обнаружен. Он несколько чаще встречался в сыворотке крови носителей золотистого стафилококка, чем эпидермального. При этом диаметр кольца преципитации и, следовательно, концентрация преципитирующих агентов также выше в среднем в первой группе и равна 3,28 мм, в то время, как во второй – 2,84 мм ($p<0,05$).

Дальнейшая статистическая обработка результатов показала, что независимо от вида микроорганизма с достоверностью $p<0,05$ ФПСД чаще встречается у резидентных носителей.

Необходимо подчеркнуть, что диаметр кольца преципитации также выше у резидентных носителей независимо от вида возбудителя (таблица 3).

Таблица 3

Уровень ФПСД при различных видах носительства ($M \pm m$)

Вид микроорганизма	Вид носительства	Количество обследованных (n)	Диаметр кольца преципитации (мм)	Достоверность различий
S.aureus	Резидентный	120	3,9±0,2	p<0,05
	Транзиторный	150	2,66 ±0,27	
S.epidermidis	Резидентный	140	3,37±0,4	p<0,05
	Транзиторный	170	2,3±0,18	

Факторы преципитации спермина (ФПСМ)

Существующие в настоящее время тесты для определения патологии, вызванной хроническим воспалением, в организме бактерионосителя наибольшим образом связаны со следующим предлагаемым нами критерием, а именно – ФПСМ. Постановка самой реакции преципитации, а так же концентрация взятых веществ аналогична ФПСД.

Диаметр кольца преципитации и, следовательно, концентрация преципитирующих агентов выше в среднем в группе носителей золотистого стафилококка и равна 3,93 мм, в то время как в группе носителей эпидермального она составляет только 2,01 мм ($p < 0,05$).

Распределение признака в зависимости от вида носительства представлено в таблице 4.

Таблица 4

Уровень ФПСМ при различных видах носительства ($M \pm m$)

Вид микроорганизма	Вид носительства	Количество обследованных (n)	Диаметр кольца преципитации (мм)	Достоверность различий
S.aureus	Резидентный	120	4,8±0,4	p<0,05
	Транзиторный	150	3,06 ±0,24	
S.epidermidis	Резидентный	140	3,99±0,6	p<0,05
	Транзиторный	170	2,6±0,1	

Анализ результатов показал, что ФПСМ в большей степени, чем предыдущие, связан с возрастом обследуемого ($h=27,8$ %). Установлено, что этот показатель коррелирует с количеством активно подвижных сперматозоидов ($r=0,532$), а также уровнем неподвижных

($r=0,756$), патологических ($r=0,714$) форм, сперматозоидов с цитоплазматической каплей ($r=0,570$). Предлагаемый тест обратно связан со скоростью сперматозоидов ($r=-0,697$). Все это позволяет отнести РПСМ к факторам, отражающим фертильные свойства спермы.

Наличие корреляции с такими характеристиками эякулята как вязкость ($r=0,64$), pH ($r=0,697$), лейкоцитозом ($r=0,612$) и наличием агглютинатов ($r=-0,570$) свидетельствует о принадлежности РПСМ к характеристикам, напрямую отражающим наличие воспаления в организме бактерионосителя.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ в рамках проведения научных исследований по проекту № 13-06-00008 «Повышение качества жизни больных хроническим простатитом: медицинский и социальный аспекты».

Список литературы

1. Бойко В. И., Кондрашова Ю. И., Бойко О. В., Доценко Ю. И., Алексашина Л. И., Журихин А. В. Методы комплексной оценки иммунного статуса работающего населения // Клиническая лабораторная диагностика. – М. – № 10. – 2011. – С. 5-6.
2. Бойко О. В., Терентьев А. А., Бойко В. И. Молекулярные механизмы бактерионосительства (Характеристика и подробный анализ) // Palmarium academic publishing, Saarbrucken, Germany. – 2012. – 175 с.
3. Бойко О. В., Николаев А. А., Алексашина Л. И., Бойко В. И., Кондрашова Ю. В., Журихин А. В., Доценко Ю. И. Морфологические изменения семенной плазмы при носительстве различных видов стафилококков // Клиническая лабораторная диагностика. – М. – № 9. – 2012. – С. 80-81.
4. Хараева З. Ф., Канакова К. Г. Факторы персистенции *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных при различных нозологических формах заболевания // Журнал успехи современного естествознания. – 2003. – № 3. – С. 51– 52.
5. Шевченко Ю. Л., Онищенко Г. Г. Микроорганизмы и человек. Некоторые особенности взаимодействия на современном этапе // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 2. – С. 94– 104.

Рецензенты:

Николаев А. А., д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и биоорганической химии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань.

Кривенцев Ю. А., д-р мед. наук, доцент кафедры биохимии с курсом КЛД ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань.