ПОЛИТЕХ
Санкт-Петербургский
политехнический университет
Петра Великого

На правах рукописи

ДМИТРИЕНКО Марина Александровна

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ЧЕЛОВЕКА ПО ГАЗООБРАЗНЫМ МЕТАБОЛИТАМ

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени доктора технических наук

Санкт-Петербург
2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)».

Научный консультант:

Гинак Анатолий Иосифович,
доктор химических наук, профессор, профессор кафедры молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)».

Официальные оппоненты:

Конопелько Леонид Алексеевич,
доктор технических наук, профессор, профессор кафедры «Теоретическая и прикладная метрология» ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева»;

Медведев Олег Стефанович,
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ФГОБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

Ермаков Сергей Сергеевич,
доктор химических наук, старший научный сотрудник, профессор кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

Васильев Алексей Андреевич,
доктор технических наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Защита состоится 13 сентября 2021 года в 14.00 на заседании диссертационного совета У.03.01.06 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 194021, Санкт-Петербург, Новороссийская ул., д.48, ауд. 201.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д.29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» www.spbstu.ru

Автореферат разослан « »___ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат технических наук, доцент Е.Б. Аронова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Согласно паспорту специальности 03.01.06, одним из приоритетных направлений биотехнологии является разработка принципов регулирования, контроля и автоматического управления процессами биосинтеза, включая создание приборов и компьютеризованных систем для измерения различных параметров.

Живые организмы, начиная с одноклеточных и заканчивая Homo Sapiens, являются идеальными биореакторами. Химические превращения в них подчиняются фундаментальным законам природы, описываются уравнениями термодинамики и химической кинетики, служат объектом изучения биотехнологии.

Последняя четверть XX века ознаменовалась расцветом аналитической биотехнологии. Активно развивается новое биотехнологическое направление – диагностика заболеваний и патологических состояний человека по газообразным легколетучим метаболитам-биомаркерам (A.Amann, D.Smith, 2013). Образующиеся в процессе жизнедеятельности газообразные вещества в большинстве случаев являются конечными продуктами длинной метаболической цепи превращений в макроорганизме. Скорость, количество и место образования биомаркеров свидетельствуют о состоянии организма и служат молекулярными индикаторами произошедших метаболических реакций (S. Das, M. Pal, 2020).

Особенность летучих метаболитов заключается в том, что, выходя из зоны реакции в газообразном состоянии, они делают химический процесс необратимым. Данные об их генерации исследуемым объектом весьма информативны с диагностической точки зрения. Газообразные биомаркеры позволяют исследовать патологический процесс на молекулярном уровне, выявить его лимитирующую стадию, описать кинетику, составить математическую модель, определить механизм и на этой основе разработать технологию диагностики заболевания.

Актуальность темы

Запах, исходящий от больного человека, издавна воспринимался врачами как диагностический признак. По мере развития аналитических методов стало возможным не только описывать характерные запахи, но и идентифицировать вызывающие их химические соединения. Возникло понятие биомаркеров – объективных признаков медицинского состояния, наблюдаемых вне пациента, которые могут быть измерены точно и воспроизводимо (Strimbu K, 2010). Низкомолекулярные газообразные биомаркеры при нормальных условиях стабильны и могут быть достоверно детектированы современной аналитической техникой в широких временных и концентрационных диапазонах.

В связи с потребностью обнаруживать заболевания своевременно, а лучше – на ранних этапах развития патологии, чрезвычайно актуальной является разработка прецизионных, надежных, простых методов специфической диагностики заболеваний и патологических состояний человека по газообразным биомаркерам.

Степень разработанности темы исследования

Существует взаимосвязь между текущим состоянием здоровья человека и наличием биомаркеров в его жидких, твердых или газообразных биологических пробах. Биомаркеры патологии в образцах тканей, кала, крови, мочи и т.п. активно

используются в медицинской диагностике. Газообразные биомаркеры применяются гораздо реже. Развитие аналитического и инструментального оборудования позволяет более активно использовать анализ газовых проб (S.Das, M.Pal, 2020).

Научными исследованиями в области диагностики заболеваний по газообразным метаболитам занимались такие ученые, как Anton Amann, Jonathan Beauchamp, Boguslaw Buszewski, В.Л. Вакс, Antonio и Giovanni Gasbarrini, Raed Dweik, Wojciech Filipiak, Haick Hossam, И.Л. Кляритская, М.Р. Конорев, Е.А. Корниенко, Marcis Leja, И.В. Маев, Markus Metsala, Anil Modak, Н.И. Паролова, Michael Phillips, Joachim Pleil, С.И. Рапопорт, Norman Ratcliffe, Terence Risby, Veronika Ruzsanyi, David Smith, Agnieszka Smolinska, Patrick Spanel, Е.В. Степанов.

На основе определения газообразных биомаркеров, содержащихся в выдыхаемом воздухе пациентов, практической медицине в конце XX века были предложены методы диагностики таких распространенных заболеваний, как диабет, хроническая почечная недостаточность, хеликобактериоз, галитоз и др. (Степанов Е.В., 2009). Однако разработанные методы газового анализа осуществляются на дорогой аналитической аппаратуре, с труднодоступными изотопными реактивами, сложны в применении, что затрудняет их использование практикующими врачами в повседневной практике. Кроме того, ряд методов (например, с применением изотопа ^{13}C) показывает интегральную концентрацию биомаркера, не только в «точке боли», но и в других местах организма по параллельным путям метаболизма, не позволяя определить место его генерации.

Основная цель работы:

Теоретическое и экспериментальное обоснование моделирования биотехнологических процессов в желудочно-кишечном тракте человека для диагностики заболеваний и патологических состояний по газообразным метаболитам, апробация полученной модели и разработка новой диагностической медицинской техники на ее основе.

Для выполнения поставленной цели необходимо решить следующие **целевые задачи**:

- изучить механизмы биотехнологических процессов образования и экскреции газообразных метаболитов в желудке при персистировании в нем бактерии *Helicobacter pylori* (HP) и обосновать принципы моделирования этих процессов при инвазии HP;
- разработать метод специфической диагностики хеликобактериоза и новые варианты аммиачного дыхательного теста;
- изучить механизмы протекания биотехнологических процессов образования низкомолекулярных газообразных метаболитов в кишечнике при нарушении переваривания углеводов и обосновать принципы их моделирования;
- разработать метод диагностики патологических состояний кишечника и прибор для осуществления этого метода;
- разработать пригодные для широкого применения инструментальные варианты устройств для диагностики инфекции HP, а также патологии кишечника по газообразным маркерам и внедрить их в практику.

Научная новизна работы

В основу научной концепции работы положено теоретическое и экспериментальное обоснование методологии исследования процессов ферментативного катализа, происходящих в различных отделах желудочно-кишечного тракта человека, что позволяет построить биотехнологические модели данных процессов.

Впервые применены научные основы биотехнологии для установления механизмов образования, трансформации и экскреции газообразных метаболитов в желудочно-кишечном тракте человека.

Впервые использовано интегрирование биотехнологических и медико-биологических методов, газоаналитической сенсорики и цифровых методов обработки данных для диагностики заболеваний и патологических состояний человека по составу газообразных биомаркеров.

Разработана методология диагностики патологических состояний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) на примере инфекции HP и заболеваний кишечника по газообразным маркерам.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Сформирован алгоритм разработки нового метода диагностики патологического состояния человека по наличию газообразных веществ-биомаркеров.

Разработан метод специфической диагностики инфекции HP на основе определения неспецифического газообразного метаболита аммиака; предложен способ непрерывной регистрации содержания аммиака в воздухе ротовой полости и контроля кинетики реакции ферментативного гидролиза карбамида в желудке *in vivo*.

Разработан метод неинвазивной диагностики непереносимости углеводов на основе детектирования содержания водорода в выдыхаемом человеком воздухе, обоснован выбор эффективных детекторных систем.

Методология диагностики заболеваний ЖКТ по газообразным маркерам апробирована и внедрена в лечебных учреждениях России и за рубежом. Разработано диагностическое оборудование: тест-системы и приборы АМА RUT, АМА RUT Expert, ХЕЛИК-аппарат, ХЕЛИК-Скан, АМА-Трио. Освоено их серийное производство, разработаны методы контроля выпускаемой продукции, изготовлено и аттестовано испытательное оборудование.

Разработана и утверждена техническая документация на Устройство для экспресс-диагностики хеликобактериоза дыхательным методом тест-система ХЕЛИК® с индикаторной трубкой ТУ9398-002-45564088-2003; Систему комбинированную ХЕЛИК®-скан-М ТУ9443-007-59483502-2014; Индикатор компьютеризированный содержания аммиака в воздухе, извлекаемом из ротовой полости, для экспресс-диагностики хеликобактериоза ХЕЛИК®-аппарат ТУ9442-003-59483502-2009; Анализатор выдыхаемого воздуха ЛАКТОФАН2, ТУ9441-004-59483502-2010.

Разработанное диагностическое оборудование прошло необходимые технические и клинические испытания и зарегистрировано в России Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (РОСЗДРАВНАДЗОР): № ФСР 2007/00378, № ФСР 2009/05180, № ФСР 2010/07907, № ФСР 2011/10258, № РЗН 2015/2536. Получены регистрационные удостоверения на продукцию в Казахстане, Республике Беларусь, а также декларации соответствия на Украине, декларации о

соответствии Техническому регламенту Таможенного союза, сертификат Европейского содружества на IVD Medical Device.

Разработанные медицинские изделия внедрены в широкую медицинскую практику, используются в более чем трех тысячах лечебных учреждений России, а также экспортируются в более чем 50 зарубежных стран.

Методики обследования пациентов на хеликобактериоз, непереносимость углеводов и синдром избыточного бактериального роста внедрены в медицинскую практику.

Новизна предлагаемых методов и устройств подтверждена 3 патентами РФ на изобретения, 4 патентами РФ на полезные модели и 1 европейским патентом.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Научные основы методологии диагностики патологического состояния человека по газообразным метаболитам;
- Механизм образования и экскреции газообразных метаболитов и доказательство их ключевой роли в молекулярной диагностике состояния человека;
- Биотехнологическая модель процессов образования газообразных биомаркеров в ротовой полости, желудке и кишечнике;
- Оптимизация систем детектирования для средств диагностики заболеваний и патологических состояний по реперным газообразным метаболитам экскретируемого организмом волатолома;
- Методики проведения обследования пациентов на хеликобактериоз, непереносимость углеводов, синдром избыточного бактериального роста.

Апробация результатов работ

Основные положения работы доложены на 89 конференциях: рабочей группы по изучению инфекции *Helicobacter pylori* и микробиоты EHMSG (Стокгольм, Швеция, 3-6 сентября 2003г., Вена, Австрия, 22-24 сентября 2004г., Вроцлав, Польша, 7-9 сентября 2006г., Стамбул, Турция, 20-22 сентября 2007г., Порто, Португалия, 17-19 сентября 2009г., Дублин, Ирландия, 11-13 сентября 2011г., Любляна, Словения, 13-15 сентября 2012г., Рим, Италия, 10-13 сентября 2014г., Никосия, Кипр, 24-26 сентября 2015г., Магдебург, Германия, 16-18 сентября 2016г., Бордо, Франция, 6-9 сентября 2017г., Каунас, Литва, 13-15 сентября 2018 г., Инсбрук, Австрия5-7 сентября 2019 г, виртуальная конференция, 12 сентября 2020 г.); саммитах по дыхательному анализу BREATH ANALYSIS (Торунь, Польша, 6-9 июля 2014г., Вена, Австрия, 14-16 сентября 2015г., Цюрих, Швейцария, 14-16 сентября 2016г., Маастрихт, Нидерланды, 17-20 июня 2018г.); Неделе Заболеваний Пищеварительной системы DDW, Орландо, США, 18-21 мая 2013г.; Конгрессе по детским инфекциям, Мельбурн, Австралия, 2013г.; 11 Международном симпозиуме по патогенезу и реакции макроорганизма при хеликобактерной инфекции (WHPI), Эльсинор, Дания, 2-5 июля 2014г.; Болгарской Национальной конференции по гастроэнтерологии, Варна, Болгария, 2-4 июня 2016г.; I Международном семинаре «Новые технологии скрининга раннего рака и некоторых других заболеваний на основе анализа выдыхаемого воздуха», Миккели, Финляндия, 8-9 ноября 2016г.; Российской научной конференции «Педиатрия: из XIX в XX Век», Санкт-Петербург, 2005г.; Юбилейном XX и XXI Международных конгрессах детских гастроэнтерологов России

и стран СНГ, Москва, 19-21 марта 2013г. и 18-20 марта 2014г.; Российской Гастроэнтерологической неделе, Москва, 2005, 2007, 2008, 2015, 2017гг.; Славяно-Балтийском научном форуме, Санкт-Петербург, 2003, 2007, 2008, 2016гг.; I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина», Москва, 9-12 ноября 2015г.; XX Менделеевском съезде, Екатеринбург, 26-30 сентября 2016г., V Междисциплинарной конференции МОБИ-ХимФарма 2019, Судак, Крым, 15-18 сентября 2019г., V Международной конференции «Постгеномные технологии: от теории к практике», Воронеж, 8-9 октября 2019г.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 127 работ, в том числе 10 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ, 6 – в изданиях, индексируемых в Scopus, 51 тезисы докладов на международных конференциях, из них 31– в изданиях, индексируемых в Web of Science, 38 тезисов докладов на Российских конгрессах, конференциях и симпозиумах, а также 22 публикации в иных изданиях. Получен 1 европейский и 3 российских патента на изобретения, 4 патента на полезную модель в соавторстве.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 366 страницах и состоит из введения, аналитического обзора, а также 3 глав по различным аспектам изучаемой темы и заключения. Текст завершается списком сокращений, перечнем использованной литературы из 381 источника (из них 114 российских и 267 зарубежных) и 50 приложений. Работа содержит 29 таблиц и 50 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации и сущность решаемой проблемы, описана степень ее разработанности, обозначены цель и задачи исследований, сформулированы научная концепция, новизна работы, ее теоретическая и практическая значимость, описаны методология и методы исследования, апробация и реализация полученных результатов, изложены основные положения, выносимые на защиту.

Методология и организация экспериментальных исследований

Разработанная методология заключается в построении единого алгоритма действий, принципов логической организации и временной последовательности экспериментальных исследований, биотехнологического моделирования и практической реализации полученных знаний.

Лабораторные исследования кинетики ферментативного гидролиза карбамида проводились на установке для моделирования ферментативных реакций *in vitro*, причем большую часть экспериментальных исследований осуществляли на модельном имитаторе – уреазе бобовых *Canavalia ensiformis*, обладающей выраженной активностью и имеющей сходное с уреазой HP строение активного центра (Варфоломеев С.Д., 2000; Лисняк Ю.В., 2016), а также с помощью смыва культуры *Helicobacter pylori*, выращенной в НИИ им.Пастера, г. Санкт-Петербург, который содержит бактериальную уреазу. Уреазная активность оценивалась с помощью титриметрической методики определения активности уреазы.

В ходе экспериментальных исследований *in vivo* изучены химический и микробиологический состав газообразных и жидких проб из ротовой полости и желудка при персистировании бактерии HP и при ее отсутствии в желудке человека. При этом было использовано следующее оборудование: pH-метр/ионометр с комбинированным электродом для микроизмерений, ИТАН, НПП «Томьаналит», Россия; pH-метр, электрод ЭСК-10603/7; ООО "Измерительная Техника", Россия; магнитная мешалка с подогревом IKA модель C-MAGHS 7, Германия, фотоколориметр Экотест-2020-4 ТУ 4215-010-715416177 производства ООО НПП «Эконикс», Россия; испытательные стенды ГНЮИ.01Т, ГНЮИ.02Т; исследовательская газодинамическая установка (ГДУ); плата преобразования сигнала с электрохимических датчиков MEMBRAPOR AG , Швейцария; электронная платформа для снятия сигнала с электрохимических сенсоров MembraSens, MEMBRAPOR, Швейцария; амплификатор детектирующий ДТлайт, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия с наборами реагентов «АмплиПрайм ДНК-сор-АМ», ООО «НекстБио», Россия, «*Helicobacter pylori*-РВ», ЗАО «Синтол», Россия, Набор реагентов «Фемофлор», ООО «ДНК-Технология», Россия; градуированный на испытательном стенде ГНЮИ.01Т газоанализатор аммиака МДП-микроцикл, спектрометр Ocean Optics USB4000 с программным обеспечением Spectra Suite.

Методы исследований. Газоаналитические измерения аммиака в газовоздушной смеси *in vitro* и *in vivo* осуществлялись с помощью серийных линейно-колористических (производства ООО «АМА») и электрохимических сенсоров NH3 3E производства MST IT, Германия. Сравнивались аналитические и эксплуатационные характеристики электрохимических сенсоров аммиака Med-2E-NH3 производства ООО «Информаналитика», Санкт-Петербург, Россия; NH3 3E производства MST IT, Германия; Sensoric NH3 3E 100SE производства CityTechnology, Великобритания; ME3-NH3 производства Zhengzhou Winsen Electronics Technology Co, Ltd; NH3/MR-100 производства Membrapor AG, Швейцария; GS+4NH3-100 производства DDScientific, Великобритания и NH3-100S SENSOR(4 SERIES) и NH3-100L SENSOR(4 SERIES), производства SemeaTec Inc., США/Китай, а также электрохимических сенсоров водорода и резистивных газочувствительных сенсоров серии Сенсис-2000 (ООО «Дельта-С», Зеленоград, Россия). Калибровка сенсоров и приборов, а также проверка их перекрестной чувствительности проводилась при помощи паспортизованных стандартных образцов состава газовых смесей.

Наличие инфекции HP определялось инвазивно и неинвазивно несколькими независимыми методами (эндоскопический, морфологический, биохимический, иммуногистохимический, ПЦР) с использованием современных аналитических приборов и оборудования: гастроинтестинальный видеоскоп GIF – Q150 производства «Олимпас Медикал Системс Корп.», Япония; оборудование эндоскопическое с принадлежностями, комплектующие: стойка процессор, стойка осветитель, биопсийные щипцы FB-25K-1 CE K2612-3201, производитель «Олимпас Медикал Системс Корп.», Япония, эндоскопы: EVIS EXERA III OLYMPUS GIF-HQ190, EVIS EXERA III OLYMPUS GIF-HQ190, OLYMPUS GIF TYPE XP160, производитель «Олимпас Медикал Системс Корп.», Япония, микроскоп МС 2 (ТУ 64-1-1629-72), 1970 г, СССР; микроскоп Р15, СССР; микроскоп медико-биологический Nikon Eclipse E200, производитель «NIKON CORPORATION», Япония; микротом санный

НМ 430 для патанатомии, производитель «Thermo Shandon Limited trading as Thermo Fisher Scientific», Великобритания; амплификатор детектирующий "ДТпрайм", производитель «НПО ДНК-Технология», Россия, с набором реагентов GenPak®DNA PCRtest для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной, вирусной и другой природы методом полимеразной цепной реакции в составе комплектов для выделения, амплификации и детекции ДНК по ТУ 9398-001-73867468-2012, производитель ООО «Лаборатория Изоген», Россия, амплификатор детектирующий ДТлайт, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия.

Общее количество обследованных составило 93 человека, в предклинических и клинических испытаниях разработанных устройств приняли участие 1574 человека. Во всех случаях получено информированное согласие пациентов и решение этического комитета на проведение исследований.

Для математической обработки экспериментальных данных использовали регрессионный анализ.

Глава 1. Газоаналитика в медицинской диагностике

В первой главе представлен аналитический обзор научной и патентной информации. Рассмотрено применение газоаналитических методов для диагностики состояния человеческого организма и его микробиоты («дыхательных тестов»). Описана история их развития, дана классификация тестов, механизмы образования газообразных веществ в нормальном и патологическом состоянии организма. Приведены уровни содержания газов-биомаркеров, места их генерации и пути газообмена. Рассмотрен вопрос, насколько возможно конкретному патологическому состоянию иметь специфический газообразный биомаркер.

В главе выделен основной объект настоящего исследования – инфекция *Helicobacter pylori*, чья роль в развитии тяжелых поражений желудка стала известна в конце XX века. Описаны особенности бактерии HP. Обоснована необходимость точной ее диагностики по причине патогенного влияния на макроорганизм, а также из-за широкой распространенности в человеческой популяции.

Среди факторов патогенности HP наиболее важное биотехнологическое значение имеет уреаза (карбамид-амидогидралаза, Urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5, CAS 9002-13-5). Это фермент класса гидролаз, обладающий специфическим свойством катализировать гидролиз мочевины (карбамида). Уреаза, продуцируемая бактериальными клетками, гидролизует мочевину, всегда присутствующую в биологических жидкостях, с образованием газообразных продуктов (реакция 1).

$$(NH_2)_2CO + H_2O \xrightarrow{\textit{Уреаза}} CO_2\uparrow + 2NH_3\uparrow \qquad (1)$$

Продуцируемые в ходе реакции вещества нейтрализуют кислоту в местах локализации колоний бактерий HP (Holton J. et al., 2012). Проявление уреазной активности является биохимическим признаком наличия уреалитических микроорганизмов. В то же время, «*H.pylori* – самый мощный продуцент уреазы в мире патогенных бактерий» (Жебрун А.Б., 2006). В связи с этим биохимический метод, основанный на определении продуктов реакции (1), занимает существенное место среди методов определения HP. Он реализован в методиках, системах и приборах для инвазивной и неинвазивной диагностики данной инфекции.

Применение продуктов реакции (1) для диагностики HP осложняется тем, что образующиеся метаболиты не являются специфическими биомаркерами данной биохимической реакции, они активно продуцируются в человеческом организме (D.Levitt, M.Levitt, 2018).

В развитых странах широко распространена диагностика *Helicobacter pylori* по CO_2, так называемые UBT, мочевинные дыхательные тесты, когда в качестве нагрузки используется изотопно модифицированная мочевина (^{13}C или ^{14}C) (Sankararaman S., Moosavi L., 2019). В России получил распространение способ диагностики по другому продукту реакции – аммиаку. Несмотря на общность лежащей в основе определения биохимической реакции (1), методы диагностики по CO_2 и NH_3 заметно разнятся по эффективности. В главе 1 рассмотрены особенности метаболизма, процессов выведения, а также аналитическая специфика обоих потенциальных биомаркеров. Приведены данные по известным видам оборудования и вариантам методик.

Сопоставление CO_2 и NH_3 как биомаркеров инфекции HP позволяет прийти к выводу, что аммиак имеет ряд методических и аналитических преимуществ (Отчет о НИР, 2009). Тем не менее, разработка методов диагностики хеликобактериоза по аммиаку как специфическому биомаркеру связана с преодолением ряда сложностей, что и стало одной из задач настоящего исследования.

В главе 1 описана также еще одна медико-диагностическая задача – определение патологии кишечника человека по составу газообразных метаболитов, в первую очередь, водорода и метана. Рассмотрена биологическая роль, которую играют данные соединения в организме человека, существующие варианты водородных и водородно-метановых тестов и оборудования для их реализации.

Проведенный в главе 1 анализ текущего состояния медицинской диагностики показывает актуальность данной работы: разработку научных биотехнологических основ неинвазивной специфической диагностики заболеваний и патологических состояний человека по составу летучих метаболитов.

Глава 2. Биотехнологические основы диагностики *Helicobacter pylori*

Биотехнологический подход к диагностике патологических состояний ЖКТ, вызванных микробиомным дисбалансом, состоит в изучении кинетики и физико-механического взаимодействия внутри микробиоценоза во взаимосвязи с характером и степенью патологии. Учитывая разнообразие микроорганизмов в норме и при развитии заболеваний, идентификация микробов возможна по специфическим биохимическим реакциям и по образующимся в этих реакциях метаболитам.

Идея рассмотрения ЖКТ как биотехнологического пищевого конвейера была выдвинута И.П. Павловым (Павлов И.П., 1951), который говорил: «…пищеварительный канал состоит из целого ряда химических лабораторий, оборудованных механическими приспособлениями». Здесь происходит физическая и химическая переработка пищи и ее нутриентов, а также всасывание образующихся продуктов для обеспечения жизнедеятельности макроорганизма. Г.Ф. Коротько в монографии «Желудочное пищеварение» характеризует пищеварительный конвейер как «закономерную последовательную цепь механической, физико-химической и химической деградации пищи, ее нутриентов и всасывания продуктов их гидролиза при

специфичности процессов, происходящих в каждом отделе пищеварительного тракта» (Коротько Г.Ф., 2007).

Микробиота верхних отделов ЖКТ и ее уреазная активность

Во всем многообразии биохимических реакций, происходящих в ЖКТ, можно выделить те, по которым происходит биосинтез, трансформация и утилизация аммиака. Аммиак – один из основных метаболитов организма человека, он образуется во множестве биохимических реакций и может быть биомаркером как нормальных, так и патологических процессов (Косенко Е.А., 2008). В частности, в ходе ферментативного гидролиза мочевины (реакция 1) аммиак производится в ЖКТ микроорганизмами-уреазопродуцентами (D. Levitt, M. Levitt, 2018).

Согласно предложенной биотехнологической схеме ЖКТ, интестинальная трубка рассматривается как последовательность сообщающихся биореакторов, в которых в процессах метаболизма принимает участие аммиак. Суммарный уровень аммиака в каждом из отделов ЖКТ – параметр динамический. Он зависит от поступления, генерации, потребления и вывода аммиака, уровня pH в отделе, концентрации NH_4^+, мочевины и других азотсодержащих веществ в биологических жидкостях; температуры, степени вентилируемости, скорости перемещения содержимого по отделу, наличия уреалитической микрофлоры и проявляемой ею уреазной активности и других факторов. Были проведены экспериментальные исследования *in vivo,* изучены химический и микробиологический состав газообразных и жидких проб из ротовой полости и желудка при персистировании бактерии HP и при ее отсутствии в желудке человека.

Кроме того, в лабораторных условиях *in vitr*o была изучена кинетика отдельных ферментативных реакций.

Ротовая полость

А. Изучение ротовой жидкости до и после приема раствора карбамида

Целью эксперимента являлось определение параметров ротовой жидкости (РЖ) здоровых добровольцев и зависимости этих параметров от HP-статуса обследуемых и некоторых воздействий на их РЖ (чистка зубов, прием пищи). Наблюдения проводили у 10 здоровых добровольцев с известным HP-статусом в возрасте от 22 до 55 лет (2 мужчин, 8 женщин). У них определяли параметры РЖ (pH, уреазная активность) до и после приема раствора карбамида.

HP-статус пациента определяли инвазивно (по двум биоптатам антрального отдела СОЖ максимально близкой локализации, полученным в ходе ФГДС пациента) и неинвазивно. Наличие HP устанавливали пятью независимыми методами (эндоскопически, гистологически, с помощью коммерческих быстрых уреазных тестов, ПЦР исследования и с помощью ХЕЛИК-теста). Статистическую обработку данных вели с помощью MS Excel, значимость различий оценивали с помощью двухвыборочного t-критерия в случае несвязанных выборок и парного t-критерия при использовании одной и той же группы объектов.

Уровень pH РЖ, определенный натощак, составил 7,12 ± 0,11, n=10. После проглатывания карбамида уровень pH сместился и составил 7,86 ± 0,14, n=10. Сравнение этих двух выборок с помощью парного t-критерия показало, что различия

между ними неслучайны ($p=1{,}39\cdot10^{-5}$). Полоскание водой не привело к достоверному смещению pH (7,22 ± 0,14 и 7,33 ± 0,27, p=0,254), в то время как чистка зубов с зубной пастой, свободной от карбамида, сдвинула уровень pH с 7,02 ± 0,10 до 7,17 ± 0,16; через 30 минут pH стал уже 7,28 ± 0,16. В двух последних экспериментах различия статистически значимы при p=0,05. Через 8 минут после приема нагрузки, уровень pH составил 7,47 ± 0,12, что статистически значимо отличалось от начального уровня pH ротовой жидкости.

Б. Определение уреалитической микрофлоры в ротовой полости.

Целью данного исследования было определение уреалитической микрофлоры в ротовой полости (РП) HP(+) и HP(−) пациентов с различными заболеваниями ЖКТ, оценка общей уреазной активности, микробиологическая идентификация HP среди всех уреазопродуцирующих микроорганизмов, а также установление взаимосвязи заболевания желудка и наличия HP в РП обследуемого.

В первой части исследования на базе Елизаветинской больницы г. Санкт-Петербурга были обследованы 15 пациентов (12 женщин и 3 мужчин в возрасте от 21 до 65 лет, средний возраст 48,5 лет) с различными формами гастродуоденальной патологии. У всех обследованных определялся HP статус, а также проверялось наличие уреазопродуцентов в ротоглотке и степень гидролиза карбамида.

HP статус обследованных устанавливался с помощью ФГДС с эндоскопической оценкой патологии и взятием биоптатов из антрального отдела желудка и луковицы 12-перстной кишки. Биоптаты подвергали гистологическому и ПЦР исследованию. При совпадении результатов морфологического и ПЦР исследования фиксировали HP(+) или HP(-) статус пациента, при их расхождении – HP(±). Кроме того, у пациентов проводили ПЦР исследование зубного налета.

Суммарную уреазную активность (УА) микрофлоры РП определяли сравнением количества аммиака, образовавшегося после полоскания РП 100 мл питьевой воды в 2-3 приема («Базальный»), а затем – активного прополаскивания РП 50 мл 1% раствора карбамида в 2-3 приема («Нагрузочный»). Уровень аммиака оценивали с помощью газоанализатора аммиака с электрохимическим сенсором.

Проведенные исследования показали:

1. Почти все (12 человек из 15) обследованные пациенты имели выраженную (4 человека) или очень высокую (8 человек) суммарную УА после прополаскивания РП раствором карбамида. Прирост уровня аммиака $\Delta[NH_3]$ составил 10,35 ± 2,20 мг/м^3. 2 человека показали невысокую УА РП ($\Delta[NH_3]$ = 0,97 мг/м^3), один – практическое отсутствие прироста уровня аммиака ($\Delta[NH_3]$ = 0,1 мг/м^3).
2. В зубном налете методом ПЦР из 14 обследованных HP обнаружен только у одного и не обнаружен у 13 человек. В связи с тем, что ПЦР анализ проводили только на наличие HP, судить о наличии в РП других уреазопродуцентов не представлялось возможным. Можно было лишь констатировать высокую УА.
3. ПЦР-анализ биоптата показал наличие HP в желудке у 7 из 10 человек.
4. Пациенты, имеющие отрицательный HP(−) или слабовыраженный HP(±) статус, продемонстрировали меньшую суммарную УА РП, чем достоверно HP-инфицированные. Средний прирост уровня аммиака у HP(−) и HP(±) пациентов составил 0,96 ± 0,72 ppm (0,68 ± 0,51 мг/м^3), у HP(+) – 14,64 ± 3,12 ppm (10,35 ± 2,20 мг/м^3).

Во второй части исследования в СПб ГБУЗ «Елизаветинская больница» по такому же дизайну было обследовано еще 47 человек в возрасте от 5 до 64 лет. По всем пациентам статистически оценивали доверительные границы для параметра биномиального распределения. 92% обследованных (57 из 62 человек) показали значимое повышение уровня аммиака в РП – до 20 ppm. Доверительные границы составили 91,0±1,8% при доверительной вероятности не менее 95%.

В. Определение состава микробиоты ротовой полости и ее УА

Целью эксперимента являлась идентификация состава микробиоты РП и сопоставление его с УА. Пробы биологического материала (слюны и зубного налета) отбирали у 5 условно здоровых добровольцев (три женщины, двое мужчин, возраст – от 4 до 35 лет). Сразу после отбора определяли УА полученных проб биохимическим методом, а именно быстрым уреазным тестом (БУТ). Далее те же самые пробы отправляли в лабораторию идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Исследования проводили методом ПЦР в режиме реального времен, определяли наличие ДНК *Helicobacter pylori*, ДНК условно-патогенных микроорганизмов и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала).

Результаты идентификации и количественного определения микроорганизмов, а также определения суммарной УА приведены в Таблицах 1 и 2.

Показано, что суммарная УА слюны не зависит от ее общей микробной обсемененности, в то же время исследования зубного налета показали наличие корреляции суммарной УА и показателя общей микробной обсемененности, а также суммарной УА и количества уреазопродуцирующих микроорганизмов.

Таблица 1 – Общая и специфическая микробная обсемененность слюны*

№ пациента	**БУТ**	**ОМП**	***HP***	***S1***	***S2***	***V***	***C1***	***P***	***C2***	***U***
001	+	$10^{7.5}$	-	$10^{6.3}$	$10^{3.1}$	$10^{6.1}$	$10^{5.0}$	$10^{3.6}$	$10^{3.4}$	-
002	++	$10^{7.7}$	-	$10^{7.4}$	$10^{3.4}$	$10^{6.5}$	$10^{4.9}$	$10^{4.6}$	-	-
003	-	$10^{8.1}$	+	$10^{7.3}$	-	$10^{7.2}$	$10^{5.3}$	$10^{5.5}$	$10^{3.7}$	-
004	++	$10^{8.2}$	-	$10^{7.0}$	-	$10^{6.6}$	$10^{5.1}$	$10^{5.4}$	-	-
005	++	$10^{7.9}$	-	$10^{7.2}$	$10^{3.3}$	$10^{6.7}$	$10^{5.3}$	$10^{4.6}$	$10^{3.8}$	

***** Используемые сокращения: БУТ – Результат Быстрого уреазного теста, ОМП – Общая микробная обсемененность, HP – Helicobacter pylori, S1 – Streptococcus spp, S2 – Staphylococcus spp, V – Veillonella spp, C1 – Corynebacterium spp, P – Peptococcus spp, C2 – Candida spp, U – Ureaplasma

Таблица 2 – Общая и специфическая микробная обсемененность зубного налета*

№ пациента	**БУТ**	**ОМП**	***HP***	***S1***	***S2***	***V***	***C1***	***P***	***C2***	***U***
001	+	$10^{7.1}$	-	$10^{6.7}$	-	$10^{6.8}$	$10^{6.6}$	$10^{3.7}$	$10^{3.7}$	-
002	++	$10^{7.7}$	-	$10^{7.2}$	-	$10^{5.3}$	$10^{5.8}$	$10^{3.9}$	$10^{3.3}$	-
003	-	$10^{6.0}$	-	$10^{5.5}$	-	$10^{5.0}$	$10^{4.6}$	$10^{4.1}$	$10^{3.7}$	-
004	-	$10^{5.5}$	-	$10^{4.8}$	-	$10^{3.8}$	$10^{5.0}$	-	$10^{3.8}$	-
005	+	$10^{6.2}$	-	$10^{5.7}$	-	$10^{4.9}$	$10^{5.2}$	-	$10^{3.1}$	-

***** Используемые сокращения – те же, что в Таблице 1.

Общая микробная обсемененность слюны обследованных добровольцев была в пределах от $10^{7,5}$ до $10^{8,2}$, а зубного налета – от $10^{5,5}$ до $10^{7,7}$. Из десяти проб биологического материала РП только в одной были обнаружены незначительные количества ДНК HP. Таким образом, исследования микрофлоры РП подтвердили присутствие в ней отличных от *H. pylori* уреазопродуцентов и их значительную суммарную УА, при том, что обсемененность РП бактерией HP невысока.

Г. Определение общей уреазной активности ротовой полости in vivo.

Целью являлось изучение предельной суммарной УА микробиоты РП, а также зависимости скорости выделения аммиака от концентрации субстрата карбамида в растворе для ополаскивания.

Одному и тому же человеку утром каждого дня обследования натощак производили орошение РП водным раствором мочевины. Концентрацию раствора изменяли ежедневно и выбирали из ряда 500, 250, 125, 62,5, 31,25 мг на 50 мл воды. Сразу после орошения производили определение динамики концентрации NH_3 в воздухе РП при непрерывной посекундной регистрации в течение 9 минут.

Проведенные исследования показали наличие уреазопродуцирующих микроорганизмов, персистирующих в РП. Содержание аммиака в воздухе РП прямо пропорционально концентрации мочевины в растворе для ополаскивания в исследованном диапазоне концентраций.

Желудок

Целью исследования было подтверждение УА в желудке по повышению уровня газообразного аммиака в желудке и РП после введения пациенту раствора карбамида непосредственно в желудок с помощью эндоскопа, минуя ротоглотку и пищевод.

А. Введение раствора карбамида в желудок in vivo

Сначала был проведен единичный эксперимент – исследование изменения уровня аммиака в РП после введения раствора карбамида через эндоскоп в желудок. У добровольца (женщина 51 года с подтвержденным слабым инфицированием HP) определяли уровень аммиака в РП, пищеводе и желудке до и после ополаскивания желудка через инструментальный канал эндоскопа 20 мл 12,5% раствора карбамида. Пробы воздуха отбирали через инструментальный канал с помощью одноразовых медицинских шприцев. Предварительно шприцы были проверены на предмет выделения соединений, мешающих определению низких уровней аммиака в ГВС. Далее пробы воздуха анализировали на газоанализаторе аммиака с сенсором МДП (Металл-Диэлектрик-Полупроводник). Результаты приведены в таблице 3. Абсолютная погрешность определения концентрации NH_3 составила ±0,5 ppm. Проведенное исследование показывает, что даже в случае слабого инфицирования HP вливание раствора карбамида в желудок инициирует реакцию ферментативного гидролиза карбамида. В результате наблюдается увеличение уровня аммиака сначала в желудке, а еще через несколько минут – в РП.

Подтверждение результатов пилотного исследования получено в ходе эксперимента по эндоскопическому введению раствора карбамида в желудок. Было обследовано 14 человек (8 женщин, 6 мужчин) в возрасте от 20 до 76 лет, госпитализированных на гастроэнтерологическое отделение СПб ГБУЗ «Елизаветинская

Таблица 3 – Измерение уровня аммиака в ротовой полости, пищеводе и желудке *in vivo*

№ пробы	Место и способ отбора пробы	Концентрация NH_3, ppm
До введения нагрузки		
1	Ротовая полость	2.8
2	Ротовая полость эндоскопом	0
3	Пищевод эндоскопом	1.0
4	Желудок эндоскопом	0
После введения нагрузки		
5	Желудок эндоскопом	3.5
6	Желудок эндоскопом через 1 минуту	0
7	Желудок эндоскопом через 2 минуты	1.2
8	Пищевод	0
9	Ротовая полость эндоскопом	4.5
10	Ротовая полость	3.5
11	Ротовая полость	3.4

больница» г. Петербурга. Всем пациентам установлен клинический диагноз, определен HP статус с помощью морфологического анализа не менее двух биоптатов слизистой желудка. Каждому из пациентов делался анализ пробы воздуха из РП до принятия карбамида (базальный уровень) и после ополаскивания внутренней поверхности желудка 50 мл 1% раствора карбамида в ходе ФГДС.

Непрерывная динамика изменения содержания NH_3 в РП регистрировалась при помощи газоанализатора содержания аммиака с электрохимическим сенсором.

Определялась достоверность различия двух эмпирических распределений: измерений концентрации на базальном уровне и измерений концентрации после приема нагрузки у каждого из пациентов. У 8 из 9 обследованных с HP(+) гистологическим статусом достоверно ($p<0.001$) детектировался рост уровня аммиака. NH_3 появлялся в РП обследуемого человека через 5-10 минут после омывания стенок желудка, и содержание его возрастало в течение всего времени измерения.

Анализ полученных данных показал:

1. Достоверный прирост уровня аммиака в воздухе РП после ополаскивания желудка раствором карбамида. Вероятность прироста среднего уровня аммиака составила 0,98 (t-критерий).
2. Среднее значение концентрации аммиака на базальном уровне составило 0,797 ± 0,002 ppm, на нагрузочном – 1,806 ± 0,006 ppm.
3. Коэффициент корреляции для 14 проведенных определений составил 0,48, что означает умеренную силу корреляционной связи между переменными по таблице Чеддока.
4. Из 14 обследованных достоверный прирост концентрации NH_3, и, следовательно, гидролиз мочевины зафиксирован у 13 пациентов.
5. Морфологическое подтверждение HP статуса было получено у 12 из 14 обследованных, причем HP(+) оказались 9 человек, а HP(–) – всего 3. И хотя среднее значение прироста уровня аммиака у HP(+) пациентов (1,31±1,30 ppm) больше, чем

HP(–) (0,77 ± 0,68 ppm), малый объем выборки, особенно неинфицированных пациентов, не позволил сделать достоверный вывод о значимости различий между ними по этому параметру.

Таким образом, высокая достоверность обнаружения NH_3 в воздухе РП после эндоскопического омывания стенок желудка раствором карбамида, скорость появления NH_3 и динамика изменения его концентрации в РП свидетельствуют о его транспортировке через пищевод. Несмотря на нейтрализующее действие сильнокислого желудочного содержимого и высокие абсорбционные свойства аммиака, он легко детектируется в воздухе ротовой полости.

Экспериментальные исследования реакции гидролиза карбамида *in vitro*

Колонизация желудка человека бактериями *H.pylori* приводит к тому, что в СОЖ начинают происходить нехарактерные для нее процессы. Моделирование этих процессов *in vitro* позволяет построить адекватную биотехнологическую модели персистирования HP в организме человека. Исследования проводили на смыве культуры HP (НИИ им. Пастера, г. С-Петербург), который содержал бактериальную уреазу, и на модельном имитаторе – уреазе бобовых *Canavalia ensiformis.*

Лабораторная установка для моделирования являлась «искусственным желудком» – емкостью, в которой в жидкой фазе происходит реакция ферментативного гидролиза. Условия воспроизводили часть параметров желудка человека: концентрацию основных компонентов, температуру, перемешивание. Продуктом реакции являлся аммиак, его содержание в газовой фазе над раствором измеряли с помощью газоанализатора содержания аммиака с электрохимическим сенсором.

Кинетические определения проводили в реакторе с фиксированной температурой, при перемешивании, в присутствии буферного раствора и без него. В коническую колбу с плоским дном помещали 45 мл приготовленного буферного раствора, добавляли 0,5 г субстрата карбамида и нагревали до температуры +37˚С при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. Затем добавляли уреазу в буферном растворе (конечная концентрация уреазы составила 125 е.а. в пробе) и снимали показания прибора в течение 9 минут.

А. Влияние уровня pH на реакцию гидролиза карбамида

Целью эксперимента было определение уровня pH реакционной смеси, обеспечивающего максимальную скорость реакции гидролиза мочевины модельной уреазой бобовых. Измерялась концентрация аммиака на 9-й минуте от начала реакции. Наибольший выход аммиака наблюдался при значении pH = 7,7 (рисунок 1). В присутствии в среде буферного раствора скорость гидролиза снижалась.

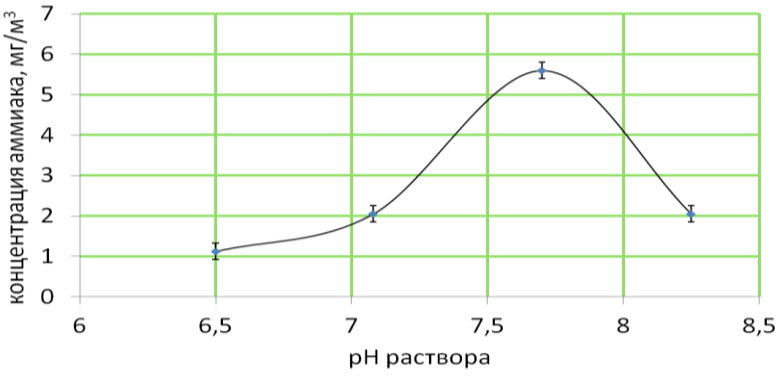


Рисунок 1 – Зависимость концентрации аммиака от начального уровня pH

Б. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции гидролиза карбамида

Цель исследования – определение влияния концентрации карбамида на скорость реакции его уреазного гидролиза и нахождение оптимального количества субстрата для условий, имитирующих процесс, происходящий в желудке человека при персистировании там бактерий HP.

Оценивали выход аммиака, образующегося при разложении карбамида в питьевой воде под действием уреазы при разной начальной дозе субстрата 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,25 г (рисунок 2). Реакционный раствор термостатировали. Измерение температуры и pH раствора, а также отбор пробы из газовой фазы над раствором проводили одновременно.

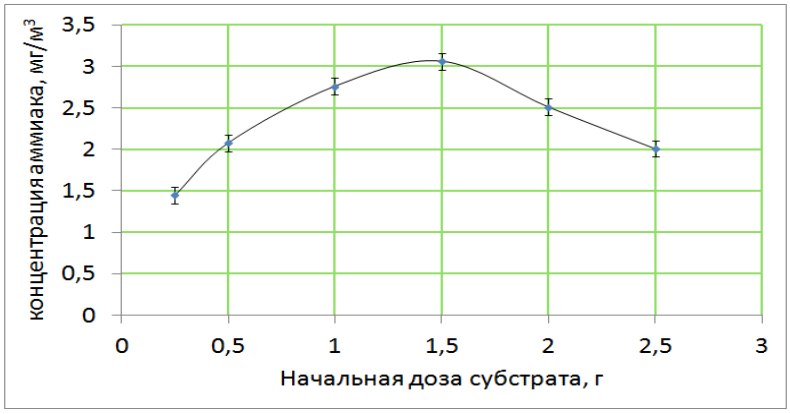


Рисунок 2 – Уровень аммиака в газовой фазе над раствором при гидролизе карбамида

Определение зависимости гидролиза от начального количества субстрата в пробе показало, что при катализе уреазой *Canavalia ensiformis* максимальный выход NH_3 наблюдается при исходном количестве карбамида 1,5 г. При дальнейшем увеличении количества субстрата мочевины выход аммиака снижается, что, по-видимому, свидетельствует о субстратном ингибировании процесса гидролиза (рисунок 3).

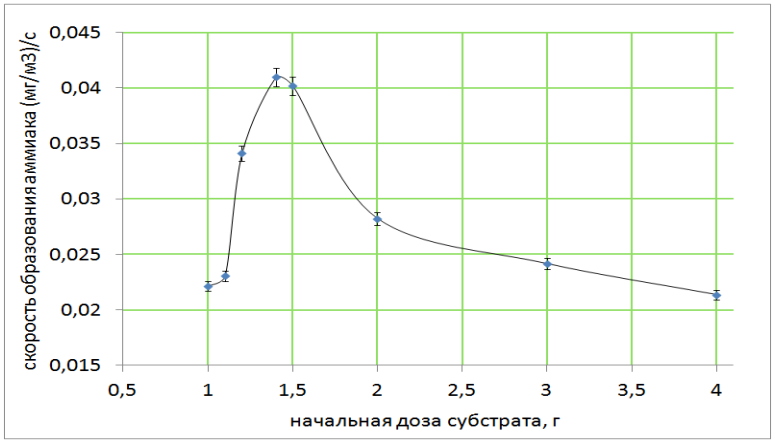


Рисунок 3 – Скорость реакции гидролиза при различных концентрациях карбамида

В. Оценка уровня NH_3 в газовой фазе в зависимости от pH раствора

Целью опыта было одновременное определение уровня аммиака в газовой фазе над раствором и величины pH реакционного раствора.

В течение первых 1–2 минут реакция идет в растворе (рисунок 4), и только при превышении pH 8,5 начинается интенсивное выделение аммиака в газовую фазу. Скорость перехода аммиака из жидкой фазы в газообразную оказывает существенное влияние на время выхода газообразного аммиака как маркера прохождения реакции гидролиза карбамида.

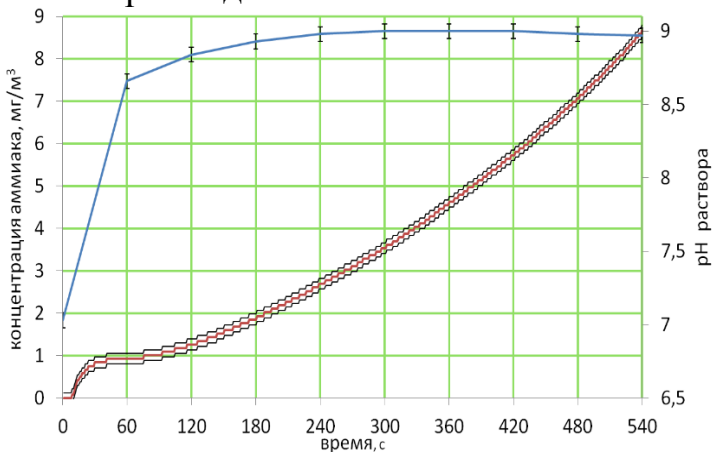


Рисунок 4 – Одновременное измерение уровня аммиака в газовой фазе и pH раствора

Г. Сопоставление растительной и бактериальной уреаз

Целью данного эксперимента было сравнение кинетики реакций гидролиза, катализируемых растительной и микробной уреазами. Сравнение реакции гидролиза под действием растительной уреазы бобовых *Canavalia ensiformis* с уреазой *Helicobacter pylori* показало примерное соответствие 50 е.а. растительной уреазы в пробе 12,5 е.а. бактериальной, как показано на рисунке 5.

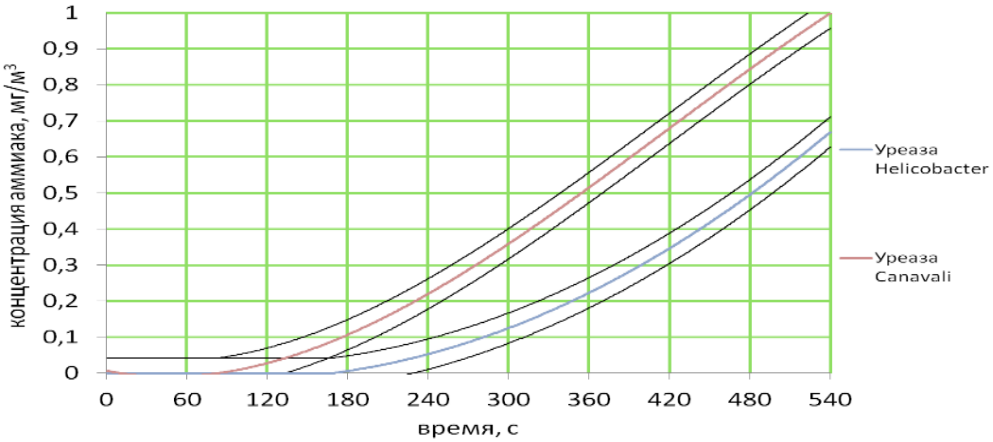


Рисунок 5 – Сравнение действия растительной и бактериальной уреазы

Расчет кинетических параметров процесса гидролиза карбамида

Рассчитаны кинетические параметры процесса ферментативного гидролиза для уреазы бобовых (*Canavalia ensiformis*), определенные в опытах *in vitro*, а также для общей УА микрофлоры ротовой полости в эксперименте *in vivo*.

В результате эксперимента установлены концентрации субстрата и соответствующие скорости ферментативной реакции при неизменном (но неизвестном) количестве фермента (таблицы 4 и 5, рисунок 6). Для оценки параметров ферментативного процесса использовали уравнение Михаэлиса-Ментен в форме Лайнуивера и Бэрка (в обратных величинах):

Таблица 4 – Расчет кинетических параметров гидролиза мочевины

Количество мочевины в пробе, мг	**Количество воды, мл**	**Количество мочевины в пробе S, моль**	**s = 1/S**	**Скорость ферментативной реакции V, мкмоль/мин**	**v = 1/V**
250	50	$4{,}16\cdot10^{-3}$	240,38	$5{,}8\cdot10^{-4}$	1724
330	50	$5{,}49\cdot10^{-3}$	182,15	$1{,}75\cdot10^{-3}$	571
500	50	$8{,}32\cdot10^{-3}$	120,19	$10{,}32\cdot10^{-3}$	96,9
1000	50	$16{,}64\cdot10^{-3}$	60,10	$32{,}52\cdot10^{-3}$	30,7

Таблица 5 – Концентрация мочевины и соответствующие скорости реакции гидролиза мочевины под действием общей уреазной активности ротовой полости *in vivo*

Количество мочевины, мг	**Количество воды, мл**	**Концентрация мочевины в растворе, гмоль⁄литр* (S)**	**s = 1/S**	**Скорость ферментативной реакции (V)**	**v = 1/V**
500	50	0,417	2,398	63	0,016
250	50	0,208	4,808	29	0,034
125	50	0,104	9,615	24	0,042
62,5	50	0,052	19,231	15	0,067
31,25	50	0,026	38,462	6	0,167

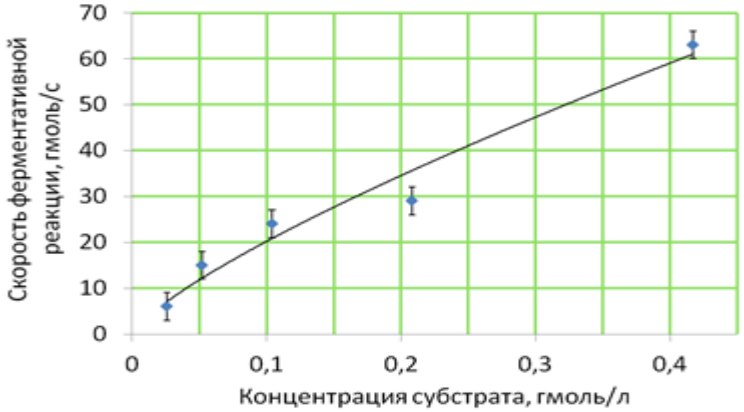


Рисунок 6 – Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

$$\frac{1}{V}=\frac{Km}{V\max}\cdot\frac{1}{S}+\frac{1}{V\max} \qquad (2)$$

В результате:

$$V_{max}=194{,}175 \text{ гмоль/с} \qquad (3)$$

$$K_m=a/b=0{,}781 \text{ гмоль/л} \qquad (4)$$

Математическая модель ферментативного гидролиза мочевины *in vitro*

На основании полученных экспериментальных данных по кинетике ферментативного гидролиза мочевины *in vitro* под действием уреазы *Canavalia ensiformis*

составлена математическая модель и алгоритм процесса в условиях, симулирующих глубинное культивирование HP в желудке человека. Зависимости изменения pH раствора и образования NH_3 от времени определены аппроксимацией по методу наименьших квадратов (рисунок 7).

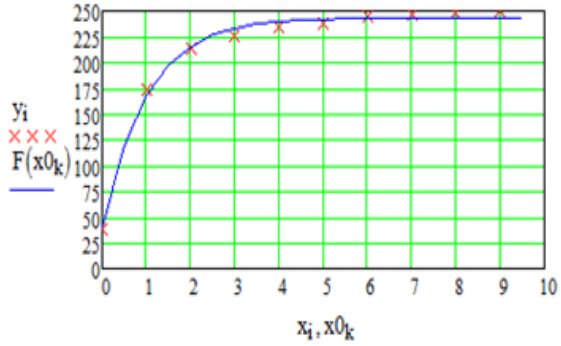
Получена расчетная зависимость изменения pH раствора:

$$y_1(x) = 6{,}839 + 0{,}043x + 0{,}021x^2 S_{min} = 0{,}0024 \quad (5)$$

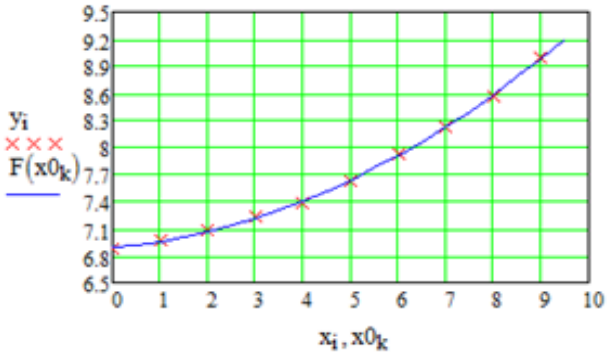
Также получена расчетная зависимость изменения содержания аммиака в газовой фазе.

$$y_1(x) = 243{,}44 - 204{,}05e^{-x} S_{m\,in} = 212.33 \quad (6)$$

Кривые изменения pH раствора и концентрации аммиака в газовой фазе над раствором представлены на рисунке 7.



А



Б

Рисунок 7 – Аппроксимирующие кривые изменения pH раствора (А) и концентрации аммиака в газовой фазе над раствором (Б) в ходе гидролиза мочевины под действием растительной уреазы

Полученные математические модели позволили оценить кинетические параметры ферментов, а также построить аппроксимирующие кривые изменения концентрации аммиака.

Биотехнологическая модель процессов *in vivo*

На основании проведенных экспериментов построены биотехнологические модели каждого из отделов ЖКТ.

Ротовая полость. Рассмотрим микробиом РП с точки зрения биосинтеза аммиака. Из литературы известно, и это подтверждено нашими исследованиями, что во рту и ротоглотке может обитать большое количество разных видов уреазопродуцирующих микроорганизмов, в том числе и *H.pylori.*

Суммарная концентрация аммиака в газовой фазе ротовой полости определяется следующими составляющими (рисунок 8):

$$[NH_3]_{рп} = \pm [NH_3]_{вд} \pm [NH_3]_{равн} + [NH_3]_{мб} \pm [NH_3]_{п} \pm [NH_3]_{л} - [NH_3]_{выд}, \quad (7),$$

где:

$[NH_3]_{вд}$ - экзогенный аммиак, поступающий со вдыхаемым воздухом;

$[NH_3]_{равн}$ - равновесный аммиак, образующийся из находящегося в биологических жидкостях иона аммония NH_4^+;

$[NH_3]_{мб}$ – аммиак, образующийся при гидролизе мочевины уреалитической микрофлорой орофарингеальной области;

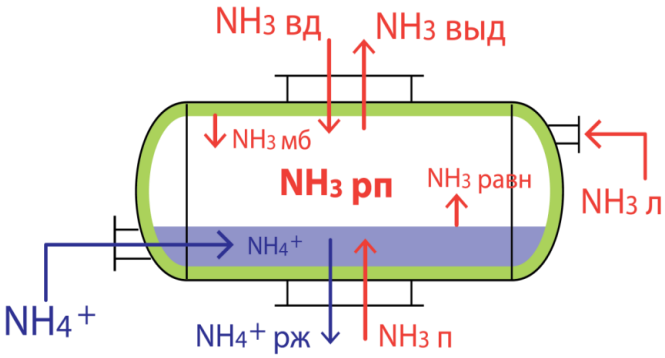


Рисунок 8 – Биотехнологическая схема биоконверсии аммиака в ротовой полости

$[NH_3]_п$ – аммиак, поступающий в РП через пищевод из желудка в результате гидролиза мочевины желудочной уреалитической микрофлорой;
$[NH_3]_л$ – аммиак, поступающий в РП с выдыхаемым из легких воздухом;
$[NH_3]_{выд}$ – аммиак, уходящий за пределы РП с выдыхаемым воздухом.

При этом в РП протекает реакция (8), выводящая аммиак из газовой фазы:

$$[NH_3] + H^+ \rightarrow NH_4^+ \qquad (8)$$

Далее часть ионов аммония уходит из РП с ротовой жидкостью $[NH_4^+]_{рж}$.

В норме, то есть у практически здорового человека, уровень аммиака в выдыхаемом воздухе не превышает фоновых значений (0,5–1,0 мг/м^3).

При появлении сбоев в орнитиновом цикле мочевины (цикле Кребса–Хенселейта) и/или патологии в утилизации NH_3, содержание аммиака в выдыхаемом воздухе увеличивается до уровня 2000-3000 ppb (1,4–2,1 мг/м^3) и выше. Сбои могут быть в реакциях катаболизма аминокислот или синтеза мочевины в печени, а также при метаболическом ацидозе или других нарушениях экскреции мочевины и/или аммиака. Сравнение уровня аммиака в выдыхаемом человеком воздухе с показателями нормы позволяет судить о наличии патологических процессов.

При колонизации ротовой полости уреазопродуцирующими микроорганизмами растет составляющая $[NH_3]_{мб}$. Субстратом для микробных уреаз является мочевина, присутствующая в ротовой жидкости в существенном количестве. При этом, по-видимому, условия обитания в ротовой полости человека (строение слизистой, pH и т.п.) не являются предпочтительными для бактерий *H.pylori*. Изучение микробиологического состава слюны и зубного налета показало присутствие HP только в одном из 10–15 случаев, что согласуется с литературными данными.

Биотехнологической особенностью РП является характер ее функционирования: при попадании в нее твердой пищи она работает как реактор идеального смешения, а при попадании жидкостей – как реактор идеального вытеснения.

Пищевод. Пищевод устроен таким образом, чтобы обеспечивать максимально быструю доставку проглоченной пищи или жидкости от РП к следующим отделам ЖКТ. Поверхность пищевода заселена микроорганизмами существенно меньше по сравнению со всеми остальными отделами пищевой трубки.

Микробиом пищевода сравнительно беден и по числу видов, и по количеству микроорганизмов. До недавнего времени в биоптатах слизистой пищевода обнаруживали преимущественно транзитную микрофлору. Проведенные нами эксперименты также показали низкую обсемененность поверхности слизистой пищевода уреазопродуцентами.

Суммарная концентрация аммиака в газовой фазе пищевода $[NH_3]_п$ определяется следующими составляющими (рисунок 9):

$$[NH_3]_п = \pm [NH3]_{рп} \pm [NH_3]_ж \pm [NH_3]_{равн} \quad (9),$$

где:

$[NH_3]_{рп}$ –аммиак, поступающий в пищевод из РП;

$[NH3]_ж$ –аммиак, поступающий в пищевод из желудка;

$[NH_3]_{равн}$ – равновесный аммиак, образующийся из находящегося в биологических жидкостях иона аммония NH_4^+ или уходящий из газовой фазы за счет абсорбции смачивающей стенки пищевода жидкостью.

Пищевод, будучи по сути транспортировочной трубкой, представляет собой биореактор идеального вытеснения. Важной особенностью пищевода является его способность ретроградно пропускать в РП газообразный аммиак, образовавшийся в желудке. Это происходит несмотря на сфинктеры, работающие как запирающие клапаны. Рассчитана теоретическая возможность данного процесса, что согласуется с описанными выше экспериментами *in vivo*.

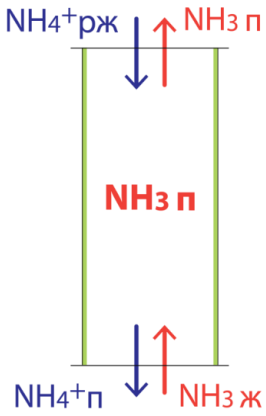


Рисунок 9 – Биотехнологическая схема биоконверсии аммиака в пищеводе

Таким образом, уровень аммиака в пищеводе лабилен и определяется поступлением или уходом газообразного аммиака из/в сопряженные отделы ЖКТ, абсорбцией смачивающей стенки пищевода биологической жидкостью и фазовыми переходами в/из ионной формы (NH_4^+).

Желудок. Наибольший интерес представляет желудок как биореактор, генерирующий аммиак в присутствии HP (рисунок 10).

Физиологически желудок натощак представляет собой трубку со множеством складок. В норме в тощаковом желудочном соке содержится порядка 3,40±1,52 ммоль/л мочевины и 1,26±0,31 ммоль/л аммиака (H.Kim et al, 1990). Персистирование в желудке бактерий HP ведет к некоторому уменьшению в желудочном соке концентрации мочевины (3,27 ± 0,37 ммоль/л) при заметном увеличении содержания растворенного аммиака (5,48±0,71 ммоль/л) (D. Yang et al, 1995).

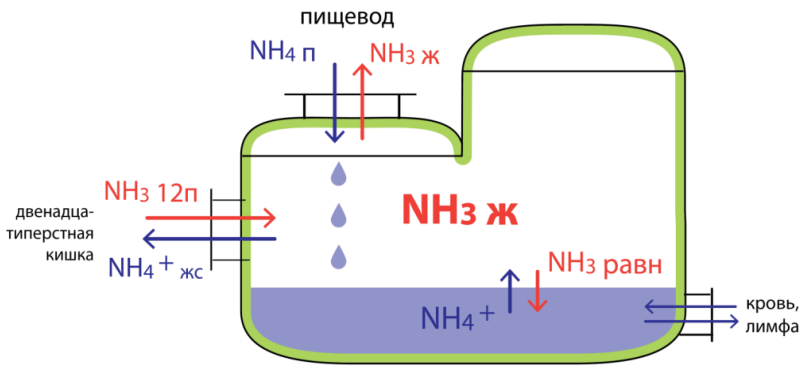


Рисунок 10 – Биотехнологическая схема биоконверсии аммиака в желудке

Основное место локализации НР в ЖКТ человека – желудок, в первую очередь антральный отдел. Обычно бактерии обитают на поверхности СОЖ под слоем слизи, но могут находиться также в ямках, межклеточном пространстве и даже проникать в клетки слизистой желудка. При воздействии лекарственных средств (типа ингибиторов протонной помпы) колонии бактерий способны изменить место обитания на более благоприятное и персистировать в теле желудка.

С биотехнологической точки зрения желудок является реактором идеального смешения. Но при попадании небольшого количества жидкости, сходно с ротовой полостью, желудок работает как реактор идеального вытеснения.

Суммарная концентрация аммиака в газовой фазе желудка $[NH_3]_ж$ состоит из:

$$[NH_3]_ж = \pm [NH_3]_{равн} + [NH_3]_{НР} + [NH_3]_{неНР} \pm [NH_3]_п \pm [NH_3]_{12п} \quad (10),$$

где:

$[NH_3]_{равн}$ – равновесный аммиак;

$[NH_3]_{НР}$ – аммиак, образующийся при гидролизе мочевины уреазой *H.pylori;*

$[NH_3]_{неНР}$ – аммиак, образующийся при гидролизе мочевины нехеликобактерными уреазами;

$[NH_3]_п$ – аммиак из пищевода, поступающий в желудок или выходящий из него;

$[NH_3]_{12п}$– аммиак из кишечника, поступающий в желудок или выходящий из него.

Суммарная концентрация иона аммония $[NH_4^+]_ж$ в жидкой фазе складывается из:

$$[NH_4^+]_ж = [NH_4^+]_{равн} + [NH_4^+]_{бж} - [NH_4^+]_{всас} - [NH_4^+]_к + [NH_4^+]_{нейтр} \quad (11),$$

где:

$[NH_4^+]_{равн}$ – равновесные ионы аммония, образующиеся из находящегося в газовой фазе аммиака;

$[NH_4^+]_{бж}$ – ионы аммония, поступающие в желудочный сок с различными биологическими жидкостями;

$[NH_4^+]_{всас}$ – ионы аммония, всасывающиеся СОЖ ;

$[NH_4^+]_к$ – ионы аммония, уходящие из желудка в кишечник;

$[NH_4^+]_{нейтр}$ – ионы аммония, поступающие в желудочную жидкость в ходе реакции нейтрализации.

Двенадцатиперстная кишка. Двенадцатиперстная кишка расположена непосредственно за желудком и отделена от него сфинктером. Часть двенадцатиперстной кишки, примыкающая к антруму желудка, характеризуется переходными от желудка к кишечнику условиями (морфологическим строением слизистой, pH)

и может быть колонизирована HP. В таком случае мочевина может быть гидролизована уреазой бактерий HP, персистирующих в верхней части 12-перстной кишки. Образующийся при этом газообразный аммиак благодаря более щелочной, чем в желудке, среде, остается в неионизированной форме и способен проникать сквозь незамкнутый сфинктер в полость желудка ($NH_{3\ 12п}$ на рисунке 10) и далее через пищевод – в РП. Предположение об экскреции аммиака путем всасывания через кишечную стенку в кровь, с током крови – в легкие и дальнейшее выделение из организма с выдыхаемым воздухом до сих пор не получило подтверждения. Возможно, попадающий в кровь аммиак нейтрализуется в печени, но увеличения уровня NH_4^+ в крови после приема карбамида не зафиксировано.

Процессы после принятия карбамида.

Показатели содержания аммиака в воздухе РП, иона аммония и мочевины в ротовой жидкости, желудочном соке и крови в норме и при патологии существенно различаются. Персистирование бактерии HP в организме человека не смещает данные показатели за пределы нормы до тех пор, пока в макроорганизме не происходят существенные изменения в системе нейтрализации токсичного аммиака (в печени) или выведения мочевины (почками). Таким образом, концентрация иона аммония в крови и других биологических жидкостях не может служить достоверным и специфичным признаком наличия инфекции HP.

Рассмотрение процессов, происходящих в верхних отделах ЖКТ после принятия порции карбамида, позволяет построить биотехнологическую модель продуцирования аммиака (рисунок 11), а также рассчитать материальный баланс.

Порция мочевины 500 мг в виде 0,5% водного раствора, принятая натощак, сначала попадает в ротовую полость (РП). Время нахождения раствора в РП мало́ (1 – 2 с), но даже за это время может произойти частичный гидролиз мочевины за счет находящихся в РП уреазопродуцентов. Степень гидролиза зависит от времени пребывания раствора мочевины во рту, концентрации карбамида, обсемененности уреалитиками и их УА.

Выделение аммиака при этом начинается немедленно. Количество аммиака, продуцируемого при этом в РП, оценено с помощью специальных опытов. Показано, что в случае приема 100 мл нагрузочной пробы раствора мочевины в РП удерживается в среднем 4, 3 мл, что составляет 4,3% от

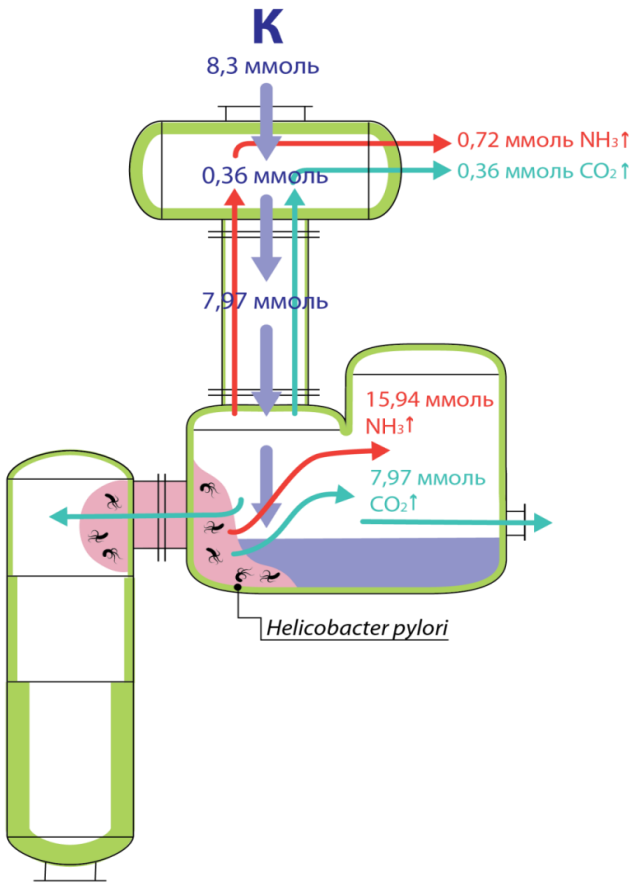


Рисунок 11 – Биотехнологическая схема верхних отделов ЖКТ после принятия нагрузки

его общего количества. Этот карбамид превращается в 0,72 ммоль аммиака. Полость рта и пищевод при проглатывании жидкости можно рассматривать как реактор идеального вытеснения, в котором образуется не более 4,3% от теоретически возможного количества аммиака. В условиях минимального газообмена с внешней средой газообразный аммиак в РП превращается в ион аммония и через пищевод поступает в желудок. При попадании твердого или полутвердого пищевого комка или жидкости желудок работает как реактор идеального вытеснения.

50-100 мл раствора мочевины, принимаемые при проведении диагностики, стро стекают по малой кривизне желудка и задерживаются в области антрального отдела. Тощаковый желудок не содержит жидкой и твердой пищи, которая может препятствовать движению раствора мочевины. Препятствием оказывается слой слизи, под которым располагаются бактерии HP. Для проникновения карбамида через нее к колониям HP требуется несколько секунд. Время диффузии зависит от толщины слоя слизи, эта величина с возрастом пациента увеличивается. В случае, когда хеликобактерные клетки менее доступны и находятся в ямках, или если большинство бактериальных клеток существуют в кокковой форме из-за неблагоприятных для HP условий (например, значении pH меньше 2 или больше 8, воздействии антибиотиков, антацидов, алкоголя и т.д.), транспортная стадия удлиняется.

Суммарное время, необходимое для транспортировки карбамида, составляет приблизительно 1–2 мин. Оно складывается из времени, требуемого на проглатывание раствора карбамида и стекание его по пищевой трубке, далее на распространение его по поверхности желудка, проникновение под слой слизи, частично в ямки слизистой оболочки желудка, где также находятся клетки HP, а затем – на диффузию в периплазматическое пространство бактерии.

Образующийся в желудке аммиак, попадая в РП, будет ингибировать гидролиз карбамида оральной микрофлоры продуктом реакции, что дополнительно уменьшит погрешность, вносимую побочной реакцией гидролиза карбамида в РП.

Рассчитан материальный баланс процессов по аммиаку, исходя из стехиометрии реакции 12 (рисунок 12).

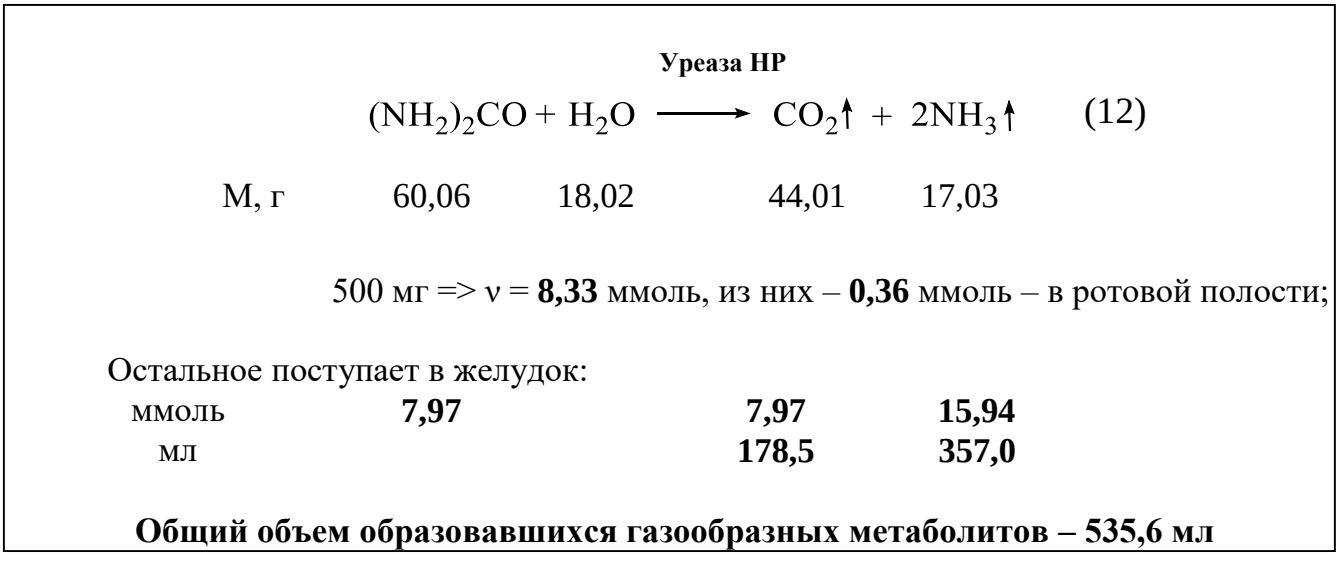


Рисунок 12 – Схема расчета материального баланса

Из порции карбамида 500 мг или 8,3 ммоль 0,36 ммоль (4,3 %) удерживается в РП. При 100%-ном гидролизе этот карбамид превращается в 0,72 ммоль аммиака. В пищеводе гидролиз мочевины практически не происходит.

Оставшиеся 7,97 ммоль карбамида поступают в желудок, где при 100%-ном превращении образуется15,94 ммоль аммиака и 7,97 ммоль углекислого газа, что составляет в целом 535,5 мл газовой фазы. Часть аммиака растворяется в желудочном соке, объем которого обычно составляет от 50 до 150 мл. Потери аммиака за счет растворения не превышают 3 ммоль.

При этом значение pH на поверхности СОЖ смещается в щелочную сторону, достигая нейтральных значений 5–6 единиц pH. Местоположение основной части колоний уреазопродуцентов определяет время прохождения реакции гидролиза карбамида и, как результат – время выхода продуктов реакции. Таким образом, кинетика образования метаболитов позволяет определить локализацию уреазопродуцентов, а также дифференцировать уреалитиков РП от уреалитиков желудка, в частности, персистирующих там НР. Образовавшиеся в ходе ферментативного гидролиза продукты выводятся из желудка по-разному: диоксид углерода, по-видимому, попадает в кровоток, переносится с кровью в легкие и удаляется с выдыхаемым воздухом. Аммиак частично переходит в ионную форму, но преимущественно выходит из желудка ретроградно, через пищевод в РП. Экспериментальное подтверждение этого процесса было получено неоднократно, показана также теоретическая возможность такого выхода. Построение биотехнологической модели процессов, происходящих в верхних отделах ЖКТ при нагрузочной диагностике НР по аммиаку, позволило разработать новый диагностический аммиачный тест.

Глава 3. Диагностика хеликобактериоза по аммиаку

Исходя из медицинской задачи неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori,* можно сформулировать аналитическую задачу**:**

определять содержание аммиака в воздухе РП в диапазоне от 0,3 до 20 мг/м^3 (от 0,5 до 30 ppm) при нормальном атмосферном давлении, температуре +(30–35)°С и относительной влажности 70–99%. Определению не должны мешать другие газы, которые могут присутствовать в воздухе РП или выдыхаемом воздухе.

Данная задача диктует требования к детекторам аналита:
работоспособность при повышенной (до 33–37 °С) температуре и очень высокой (до 70–99 %) влажности, присущей воздуху РП; чувствительность от десятых ppm; диапазон определяемого содержания – от 0,3 до 20 мг/м^3 (от 0,5 до 30 ppm); точность – не менее (5–10) %$_{отн.}$; скорость срабатывания детектора – несколько секунд, а общая продолжительность анализа – не более 10 минут; селективность, т.е. отсутствие перекрестной чувствительности к диоксиду углерода, парам воды, кислороду, азоту, а также к парам летучих органических соединений (ЛОС); допускается чувствительность к аминам; объем газовой пробы – от 0,5 до 3 дм^3 при времени отбора 1–10 минут; серийность и высокое качество изготовления; портативность; невысокая стоимость.

Были использованы 4 типа детекторов: индикаторные трубки, электрохимические сенсоры, полупроводниковые резистивные сенсоры и сенсоры МДП.

Индикаторные трубки (ИТ) реализуют линейно-колористический метод определения содержания вещества и могут быть адаптированы для проведения медицинской диагностики. В НПП ООО «АМА» были разработаны требуемые ИТ, технология их изготовления является know-how предприятия. Разработанная ИТ как детектор для проведения аммиачного дыхательного теста имеет следующие особенности: высокую аналитическую чувствительность определения аммиака (0,1–0,2) мкг/мм, подтвержденную Сертификатом, выданным ВНИИМ им. Менделеева после проведения добровольной сертификации ИТ; высокую селективность при анализе воздуха РП; максимальное приближение места отбора пробы к месту экскреции аналита, что сводит к минимуму его потерю; устойчивость к влажности (высокая влажность анализируемого воздуха не мешает проведению анализа, а лишь усиливает индикационный эффект); одноразовое использование ИТ: одна трубка – на одного пациента и на два определения (базального и нагрузочного уровней), что сводит к минимуму возможность инфекционной контаминации; кумулятивность, т.е. способность ИТ накапливать индикаторный эффект в ходе всего времени проведения анализа.

Для пропускания через ИТ анализируемого воздуха разработан специальный насос. В главе 3 рассмотрены факторы, оказывающие влияние на результат анализа с помощью ИТ (производственные, процедурные и факторы пробоотбора). Предложены способы уменьшения влияния негативных факторов и пути достижения максимальной эффективности и простоты проведения обследования.

Электрохимические датчики (ЭХД) также пригодны для проведения аммиачного нагрузочного теста.

В течение 2003–2006гг. применительно к целям медицинской диагностики были протестированы электрохимические амперометрические сенсоры трех производителей, в 2016–2019гг. – еще шести. Результаты сравнения представлены в главе 3 и в Приложениях. Наилучшие результаты по чувствительности к целевому компоненту, стабильности измеряемых характеристик, отсутствию чувствительности к парам воды в течение 6 месяцев от начала эксплуатации и сходимость результатов измерений концентрации аммиака в ГВС, имитирующей воздух ротовой полости, показал сенсор NH3 3E 100SE производства компании MST IT. После снятия данного сенсора с производства допустимой его заменой стал SE-NH3-100S производства DD Scientific (Великобритания).

Необходимо отметить, что эксплуатация датчиков в нестандартных условиях высокой влажности, низких определяемых уровней аналита и активного режима работы приводит к изменению аналитических характеристик ЭХД как детектора аммиака, а также к существенному снижению срока его службы.

Особенностью ЭХД является возможность получения 540 значений за 9 минут проведения анализа при частоте снятия сигнала один раз в секунду. Это позволяет наблюдать процесс выделения аммиака в режиме реального времени.

Резистивные газочувствительные сенсоры оценивались в качестве датчиков для проведения аммиачного дыхательного теста (АДТ). В этих сенсорах использован эффект изменения электропроводности полупроводникового материала (оксида олова и других оксидов), происходящего при адсорбции на его поверхности молекул детектируемых газов.

Сенсоры на основе структуры металл-диаэлектрик-полупроводник (МДП) являются разновидностью полупроводниковых сенсоров. Сенсоры МДП представляют собой «сэндвич» из слоя проводника (Pt или Pd), диэлектрик из оксида металла и кремниевый полупроводник. Полная емкость или пороговое напряжение таких структур изменяются под действием анализируемого газа.

Таким образом, наиболее подходящими детекторами аммиака для проведения диагностики хеликобактериоза являются:

- ИТ в качестве детектора одноразового применения;
- ЭХД в качестве детектора для многократного использования и непрерывной регистрации уровня аммиака.

На основе выбранных детекторов разработаны устройства для диагностики инфекции HP: тест-система ХЕЛИК® с ИТ в вариантах с насосом и с устройством ХЕЛИК-скан, а также индикатор компьютеризированный ХЕЛИК®-аппарат.

В «классической» реализации ХЕЛИК-теста необходимы ИТ, насос и шланг для их соединения.

Устройство для экспресс-диагностики хеликобактериоза дыхательным методом (*in vivo*) тест-система ХЕЛИК с индикаторной трубкой защищено патентом на полезную модель, а также зарегистрировано в установленном порядке и разрешено к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации.

Помимо визуальной оценки результат ХЕЛИК-теста на индикаторной трубке может быть оценен путем автоматического считывания.

Блок-схема и фотография прибора приведены на рисунке 13.

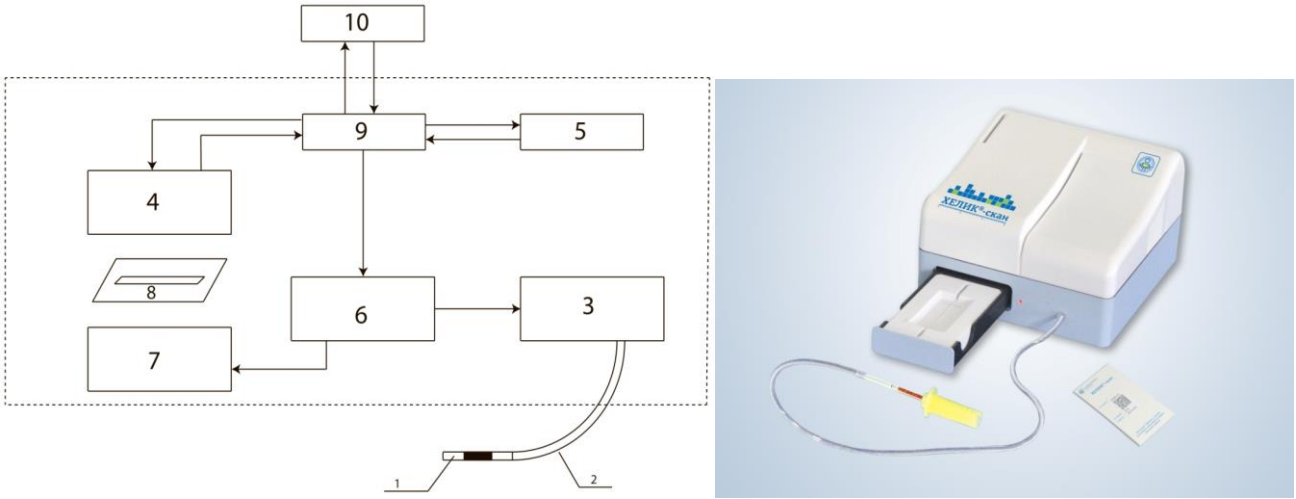


Рисунок 13 – Блок-схема и внешний вид устройства ХЕЛИК-скан, где 1 – индикаторная трубка (ИТ), 2 – шланг, 3 – вакуумный воздушный насос, 4 – USB-камера, 5 – блок памяти, 6 – блок управления, 7 – источник видимого света, 8 - кассета для размещения ИТ, 9 – USB-концентратор, 10 – персональный компьютер

Прибор ХЕЛИК-скан содержит цифровую USB-камеру для считывания и фиксации результата, блок управления с микроконтроллером для автоматизации

процесса считывания результата и его обработки. Программное управление процедурой проведения тестирования пациента позволяет свести к минимуму операторскую ошибку. Устройство защищено Патентом на полезную модель и зарегистрировано в России.

Основные особенности прибора ХЕЛИК-скан: программа распознавания результата тестирования пациента с раздельной регистрацией показателей базального и нагрузочного уровней; встроенный микронасос с возможностью ручного и программного управления; оценка цвета и интенсивности окрашивания хемосорбента в ИТ; точное следование методике проведения тестирования с соблюдением интервалов измерения и звуковой сигнализацией этапов; автоматическое вычисление показателя прироста содержания аммиака и сравнение его с диагностическим критерием; QR-кодирование информации о партии ИТ, сроках годности, заложенных критериях чувствительности и пр.; интерпретация результата в соответствии с данными QR-кода; сохранение данных в электронном виде в компьютере; повышение комфортности проведения тестирования путем инсталляции информационно-развлекательных комиксов об инфекции HP.

На основе электрохимического амперометрического сенсора было разработано устройство для проведения диагностического определения инфекции HP – ХЕЛИК-аппарат (рисунок 14). Устройство ХЕЛИК-аппарат и способ диагностики защищены Патентами РФ на изобретение и зарегистрировано в России.

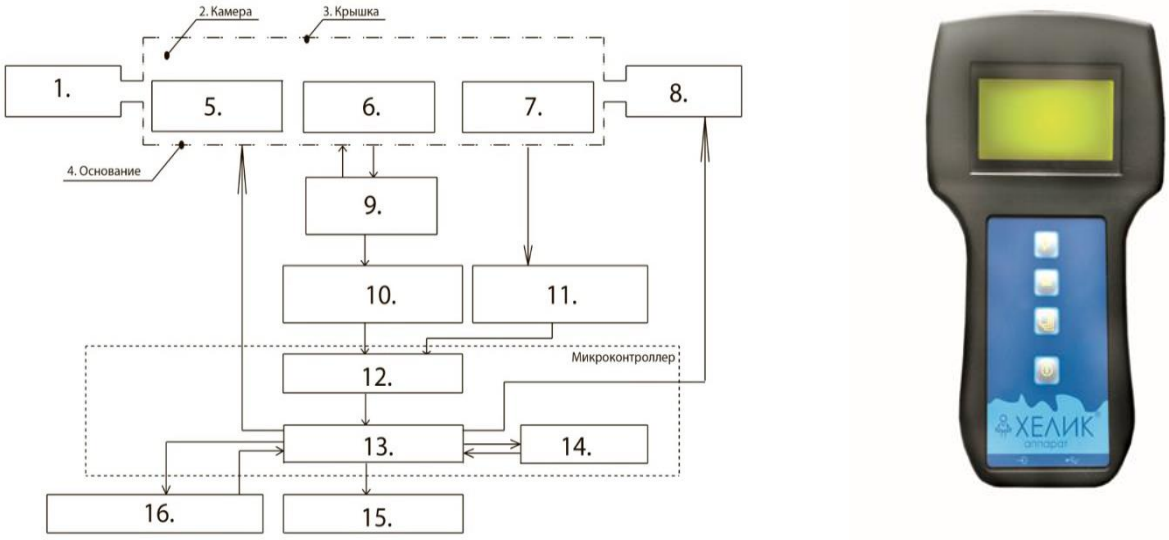


Рисунок 14 – Блок-схема и внешний вид устройства ХЕЛИК-аппарат, где 1 – средство отбора проб воздуха, 2 – камера с крышкой 3 и основанием 4, в которой размещены блок нагрева воздуха 5, ЭХД NH_3 6, датчик температуры 7, 8 – аспирационное устройство, 9 – блок защиты ЭХД, 10 – блок усиления фильтрации и канала ЭХД, 11 – блок усиления и фильтрации канала датчика температуры, микроконтроллер с блоком измерения 12, блоком обработки и управления 13 и блоком памяти 14, 15 - блок индикации, 16 – блок сопряжения с компьютером

Прибор позволяет вести постоянный отбор воздуха из ротовой полости пациента с заданной скоростью, проводить определение концентрации аммиака в отбираемой ГВС, регистрировать и обрабатывать измеряемый сигнал.

Эффективность разработанных средств диагностики оценивалась в ходе предклинических и клинических исследований в различных ЛПУ России, Украины, Белоруссии.

Результаты приведены в таблицах 6,7.

Таблица 6 – Диагностическая эффективность ХЕЛИК-теста

Место проведения	Количество пациентов	Дети/ взрослые	Методы сравнения	Чувствительность Se/ специфичность Sp,
Тест-система ХЕЛИК с ИТ				
Российский государственный медицинский университет	200	Взрослые	ПЦР биоптатов, жидкий уреазный тест	91/90
Санкт-Петербургская Государственная Педиатрическая Медицинская Академия	500	Дети	Гистология, серология, бактериология	95/92
НЦЗД РАМН	200	Дети	Гистология, серология, бактериология, БУТ	92/90
СПбГУЗ «Детская Городская Клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова»	210	Дети	БУТ, гистология	87/91
Клиническая больница СПб Государственной Педиатрической Медицинской Академии	126	Дети	Общеклиническое, морфологическое исследование биоптатов	91-94/82-89
Итого	1236			
ХЕЛИК-аппарат				
СПбГУЗ «Детская Городская Клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова»	163	Дети	Общеклиническое, морфологическое обследование	91-94/84-91
ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Росздрава»	175	Взрослые	Морфологическое обследование	**Не указано**
Итого	338			

Диагностические характеристики различаются в зависимости от места проведения работы, количества и возраста пациентов, сопутствующих заболеваний, а также методов сравнения. За неимением абсолютно достоверного референтного метода подтверждения хеликобактериоза использовались сочетания различных методов, в том числе гистологический, бактериологический, гистобактериоскопический, серологический методы, спектрометр ионного дрейфа – СИД, полимеразно-цепная реакция – ПЦР, быстрый уреазный тест – БУТ, иммуноферментный анализ – ИФА, серологический анализ - Гастропанель, изотопный дыхательный тест ^{13}C-UBT.

Таблица 7 – Диагностические чувствительность и специфичность ХЕЛИК-теста (по независимым исследованиям)

Место проведения	Количество пациентов	Дети/ Взрослые	Методы сравнения	Чувствительность Se/ специфичность Sp
Тест-система ХЕЛИК с ИТ				
ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия	104	Дети и взрослые	Гистология, БУТ	92/90
Казанский государственный медицинский университет, ООО «Лечебно-диагностический центр Фарм-Т», Казань, Россия	905	Дети и взрослые	Гистология	91,2
ЦМСЧ №15 ФМБА России, Снежинск, Россия	164	Взрослые	Серология	95/97
Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь	37	Взрослые	Морфология	94/94
Медицинская академия последипломного образования, Санкт-Петербург, Россия	35	Взрослые	Гистология, БУТ	87-92/100
Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь Витебский областной клинический специализированный центр, Витебск, Беларусь	103	Взрослые	Морфология	94-95/83-92
Елизаветинская больница, Санкт-Петербург, Россия	171	Взрослые	Гистология	92/93
Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь	47	Взрослые	Гистология	94/90
Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика, Киев, Украина	50	Взрослые	13С UBT, ПЦР кала	91,2/87,5
Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова, Москва, Россия УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь	69	Взрослые	Гистология	97/96
ХЕЛИК-аппарат				
ДГКБ №5 им. Н.Ф.Филатова, Санкт-Петербург, Россия	167	Дети	Морфология, БУТ	93/82

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия	104	Дети и взрослые	Гистология, БУТ	95/95

Чувствительность ХЕЛИК-теста как метода оказалась на уровне от 91 до 97%, специфичность – от 86,5 до 96%. Эти значения показателей чувствительности и специфичности свидетельствуют о том, что аммиак может служить специфическим маркером инфекции HP.

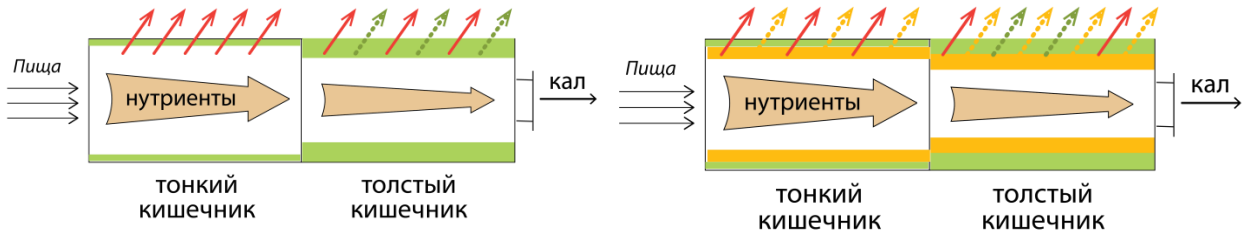
На примере диагностики хеликобактериоза сформирован алгоритм разработки нового метода диагностики патологического состояния человека по составу газообразных метаболитов: строится биотехнологическая модель происходящих процессов, выбирается лимитирующая биохимическая реакция, характерная для данного вида патологии, провоцируется усиление продукции конечных газообразных метаболитов и определяется содержание аналитически предпочтительного газового компонента в экскретируемой организмом смеси газообразных и летучих веществ – волатоломе. Затем подбирается оптимальная система детектирования искомого аналита. После макетирования системы или прибора и получения экспериментальных данных оптимизируются методика обследования и способ обработки получаемых результатов анализа таким образом, чтобы диагностическая эффективность разрабатываемых средств диагностики была максимальной.

Глава 4. Диагностика нарушений углеводного обмена по составу воздуха полости рта

Подход к разработке метода диагностики, сформированный на примере инфекции *Helicobacter pylori*, был использован для определения нарушений углеводного обмена – одного из наиболее часто встречаемых патологических состояний кишечника.

Для этого была построена биотехнологическая модель процессов, происходящих в тонком кишечнике. Сюда поступает смесь пищевых веществ, подвергнувшаяся первичной переработке в желудке. Тонкая кишка в организме человека играет роль основного химического реактора, где происходит основная часть биотехнологических процессов переработки пищи, завершается начатый ранее гидролиз пищевых полимеров и всасывание продуктов их гидролиза в кровь и лимфу. В нормальном физиологическом состоянии полостное и пристеночное пищеварение обеспечивает оптимальное количество всасывающихся нутриентов, и в толстый кишечник непереваренной поступает в основном балластная клетчатка, которая гидролизуется ферментами симбионтов (бактерий и простейших) кишечника. При патологических изменениях состояния макроорганизма, в частности, ферментной недостаточности, усвоение первичных нутриентов в тонком кишечнике происходит лишь частично (рисунок 15).

Бóльшая часть нутриентов поступает в толстый кишечник и приводит к усилению роста бактериальной микрофлоры, дисбиозу. При этом существенно увеличивается количество образовавшихся вторичных метаболитов, в том числе и газообразных:



А Б

Рисунок 15 – Схема образования газообразных метаболитов в кишечнике в норме (А) и при патологии (Б)

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \longrightarrow 12H_2\uparrow + 6CO_2\uparrow \quad (13)$$

В присутствии метаногенов, например, *Methanobrevibacter smithii* и *Methanosphaera stadtmaniae,* происходит утилизация образующегося водорода:

$$4H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4\uparrow + 2H_2O \quad (14)$$

Метаногены при этом конкурируют в потреблении водорода с ацетогенными и сульфатредуцирующими бактериями, которые также могут обитать в кишечнике человека. Состав и количество в выдыхаемом воздухе газообразных метаболитов являются индикаторами состояния кишечной микробиоты, а время изменения волатолома после принятия определенной углеводной нагрузки позволяет оценить локализацию патогенной микрофлоры.

Используя методический прием, показавший свою целесообразность при диагностике НР – прием провоцирующей нагрузки – можно оценить степень дисбиоза по количеству образующихся микробных метаболитов, в первую очередь – водорода и метана.

Тогда аналитическая задача формулируется следующим образом:

В целях медицинской диагностики определять содержание водорода и метана (одновременно или по отдельности) *in vivo* в диапазоне от 0,5 до 100 ppm в выдыхаемом воздухе в следующих условиях: нормальное атмосферное давление, температура (30–35) °С; относительная влажность (70–95) % без конденсации.

Определению не должны мешать другие газы, которые могут присутствовать в воздухе ротовой полости или в выдыхаемом воздухе.

Аналиты содержатся в альвеолярном воздухе, их определяемая концентрация зависит от «степени альвеолярности», т.е. глубины выдоха обследуемого. Для контроля этого параметра в качестве критерия применяется уровень «референтных веществ»: диоксида углерода (он должен быть не менее 5,5%) или кислорода (не более 15%) в анализируемой ГВС. Соответственно, корректное проведение ВМДТ требует использования дополнительных детекторов CO_2 или O_2.

Применяемые детекторы должны также удовлетворять жестким требованиям по чувствительности, селективности, точности и скорости срабатывания. Для обеспечения производства датчики должны быть серийно производимыми, портативными, взаимозаменяемыми и иметь малую стоимость.

В качестве детекторов водорода были опробованы электрохимические сенсоры (с жидким электролитом и твердотельный); сенсоры МДП, в качестве метановых детекторов – оптические и полупроводниковые сенсоры, в качестве детектора диоксида углерода – оптический сенсор.

Детекторы водорода. Исследования трех образцов МДП-сенсоров были проведены в ФГУП «ВНИИМ им. Менделеева». Сенсоры показали чувствительность к водороду от 8 до 116 ppm. В дальнейшем сенсоры МДП были модифицированы разработчиками с целью повышения их чувствительности. Сравнение характеристик нескольких типов сенсоров проведено в 2012 г. Все исследованные сенсоры показали чувствительность к водороду в диапазоне от 1,2 ppm до 99 ppm, при этом крутизна характеристик модифицированных сенсоров - выше. Повышение рабочей температуры сенсора от 100 °С до 150 °С несколько снижает его чувствительность, но инерционность сенсора также снижается. Предел детектирования составляет 1,2 ppm. Изучение перекрестной чувствительности сенсоров МДП подтвердило влияние паров воды.

Исследования чувствительности и других аналитических характеристик сенсоров МДП проводили также в 2015-2016 гг. Для проверки работоспособности детекторов водорода (сенсоров ЭХ и МДП) были использованы стандартные баллонные ГВС. Концентрацию водорода в ГВС, поступающей на детектор, оценивали по процедуре приготовления.

Сравнительные измерения показали, что оба типа детекторов демонстрируют воспроизводимые результаты и могут быть использованы для медико-диагностических целей.

Детекторы метана. Детектирование метана на уровнях его присутствия в выдыхаемом воздухе пациентов с патологией кишечника является сложной аналитической задачей.

Исследованы оптические сенсоры на основе ИК оптопары светодиод-фотодиод и полупроводниковые датчики метана. Оценена их аналитическая чувствительность. В качестве источника метана использовали ПГС метана в азоте производства ВНИИМ им. Д.И. Менделеева с содержанием 1% и 10 ppm метана.

Детекторы диоксида углерода. Сконструированы и изготовлены опытные образцы датчиков в виде оптопар на длину волны 4.2 мкм (LED42Sr+PD42Sr), вклеенных в газовую камеру. Стендовые испытания показали удовлетворительные результаты.

Появление новых типов детекторов водорода и метана позволило определять концентрации аналитов в выдыхаемом воздухе быстрее и с большей аналитической чувствительностью и разрабатывать на их основе приборы для медицинской диагностики.

Водородный анализатор GAS-1. На основе сенсора МДП производства МИФИ нами были изготовлены 2 опытных образца анализатора GAS-1. Кроме нового сенсора, прибор имеет измененную конструкцию воздушной магистрали прибора. Опытный образец анализатора GAS-1 прошел первичную предклиническую апробацию в ДИБ№5 г. Санкт-Петербурга. Показано, что применение сенсора МДП позволило улучшить аналитические характеристики по сравнению с ЭХД:

чувствительность 0,5 ppm по сравнению с 2–3 ppm; быстродействие (τ_{90}) 60 сек по сравнению с 2–3 мин.

Кроме того, прибор на сенсорах МДП имеет улучшенные пользовательские характеристики: долговечность более 5 лет с необходимостью калибровки 1 раз в год по сравнению с 2–3 годами с необходимостью калибровки 1 раз в месяц у прибора на ЭХС. МДП сенсор устойчив к компонентам выдыхаемого воздуха (пары воды и летучие органические вещества) при длительной эксплуатации и дает воспроизводимые результаты.

Конструкция воздушной магистрали прибора (порт для ввода пробы, камера с сенсором, угольный фильтр и соединительные трубки) позволяет вытеснять остатки предыдущей пробы из камеры сенсора, предотвращать за счет угольного фильтра попадание капель воды на поверхность сенсора, достигать паспортизованных метрологических характеристик сенсора. Ввиду хорошей проницаемости угольного фильтра изначально неселективный сенсор МДП в сочетании с угольным фильтром селективно определяет H_2.

Прибор АМА-Трио и его апробация. Изготовлена и апробирована опытная партия из 5 приборов АМА-ТРИО. Блок-схема прибора представлена на рисунке 16.

Таким образом, прогресс сенсорной базы вкупе с развитием представлений о молекулярных и микробиологических механизмах развития заболеваний кишечника позволил улучшить методическое и инструментальное обеспечение ВМДТ и расширение его диагностических возможностей.

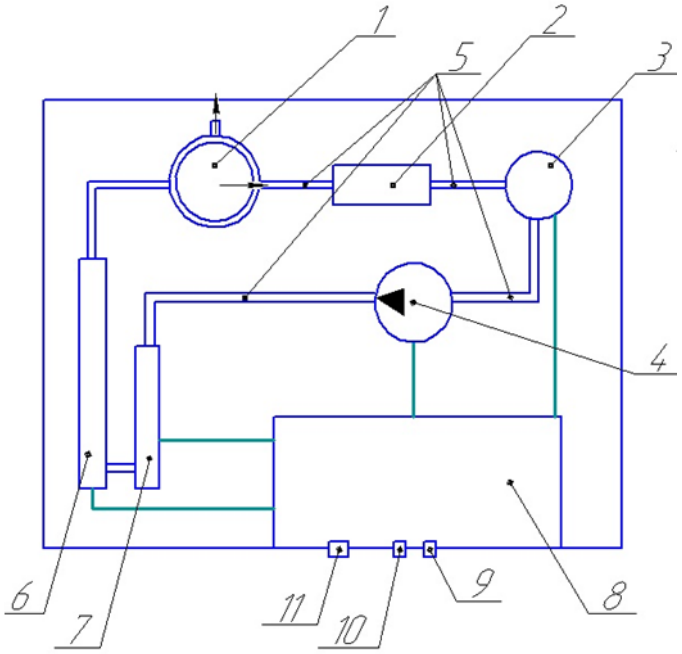


Рисунок 16 – Блок-схема прибора АМА-Трио, где 1 – штуцер подачи пробы, 2 – угольный фильтр, 3 – датчик водорода, 4 – насос, 5 – воздуховоды, 6 – датчик метана, 7 – датчик диоксида углерода, 8 – плата управления, 9 – световой индикатор подключения к сети, 10 – световой индикатор подключения USB, 11 – USB-выход.

Применение водородного дыхательного теста в педиатрической практике

Возможности водородного дыхательного теста были оценены при диагностике лактазной недостаточности (ЛН) и синдрома избыточного бактериального

роста (СИБР) у детей раннего возраста, для которых этот вид патологии представляет наибольшую опасность.

Измерение уровня водорода в выдыхаемом ребенком воздухе вели следующим образом: за час до кормления у младенца определяли содержание водорода натощак (базальный уровень), затем ему давали нагрузку – лактозу – и повторяли анализ через 30 и 60 минут после принятия нагрузки (нагрузочный уровень).

При пробоотборе была использована лицевая маска, в выходное отверстие которой вставлялся шприц объемом 20 мл для отбора воздуха из внутреннего объема маски. Затем воздух из шприца вводили в газоанализатор. Сопоставление проводили с клиническими признаками ЛН (беспокойство, вздутие живота и разжиженный стул с кислым запахом). Были установлены ***диагностические критерии:*** если уровень водорода через 60 минут превышал базальный на 10 ppm и больше, диагностировали ЛН; если повышения уровня водорода через 60 минут не наблюдалось, но базальный уровень превышал 5 ppm и/или значение через 30 минут превышало базальный уровень на 5 ppm и больше, то это расценивали как СИБР. В остальных случаях результат ВДТ расценивался как отрицательный.

Применение водородного дыхательного теста позволило дифференцировать ЛН от СИБР, несмотря на сходные клинические симптомы. Это позволило выбрать оптимальный терапевтический подход.

Защищен способ неинвазивной диагностики непереносимости лактозы [Патент РФ № 2527694]: сначала с помощью водородного теста с нагрузкой лактулозой следует убедиться в отсутствии у обследуемого СИБР, а затем провести еще один водородный тест – уже с нагрузкой лактозой.

Определение низкомолекулярных газообразных веществ-метаболитов в воздухе ротовой полости, таких как аммиак, водород, метан, позволяет оценить уровень метаболизма, состояние внутренних органов и является по существу функциональным тестом, что делает возможным диагностику заболеваний и патологических состояний человека на ранних стадиях, своевременное оказание требуемой помощи и контроль ее эффективности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований разработана научная концепция и сформулированы принципы моделирования биотехнологических процессов биосинтеза газообразных метаболитов в желудочно-кишечном тракте человека, полученные модели применены в диагностике заболеваний и патологических состояний человека.

Обосновано применение биотехнологического подхода с целью установления механизмов образования и экскреции газообразных метаболитов в желудке при персистировании в нем бактерии *Helicobacter pylori*.

Впервые использовано интегрирование биотехнологических принципов, медико-биологических методов, газоаналитической сенсорики и цифровых методов обработки данных для диагностики заболеваний и патологических состояний человека по составу газов-биомаркеров.

Разработана методология диагностики патологических состояний желудка и кишечника по газообразным маркерам.

Проведена апробация биотехнологической модели процессов, происходящих в верхних отделах ЖКТ при персистировании в желудке HP, основанная на кинетике протекающих реакций.

Разработан метод специфической диагностики инфекции HP на основе определения неспецифического газообразного метаболита аммиака. Впервые предложен способ непрерывной регистрации содержания аммиака в выдыхаемом воздухе и контроля кинетики реакции ферментативного гидролиза карбамида, а также новые варианты аммиачного дыхательного теста.

Изучены механизмы протекания биотехнологических процессов образования низкомолекулярных газообразных метаболитов в кишечнике при нарушении переваривания углеводов, впервые построена биотехнологическая модель происходящих процессов. Предложен метод неинвазивной диагностики непереносимости углеводов на основе детектирования содержания водорода в выдыхаемом человеком воздухе.

Методология диагностики заболеваний ЖКТ по газообразным маркерам апробирована и внедрена в лечебных учреждениях России и за рубежом. Методики обследования пациентов на хеликобактериоз, непереносимость углеводов, синдром избыточного бактериального роста внедрены в медицинскую практику.

Создана линейка новых видов оборудования для диагностики заболеваний, а именно: тест-системы и приборы AMA RUT, AMA RUT Expert, ХЕЛИК-аппарат, ХЕЛИК-Скан, АМА-Трио. Освоено их серийное производство. Разработаны методы контроля выпускаемой продукции, изготовлено и аттестовано испытательное оборудование. Разработана и утверждена техническая документация на Устройство для экспресс-диагностики хеликобактериоза дыхательным методом тест-систему ХЕЛИК® с индикаторной трубкой ТУ9398-002-45564088-2003; Систему комбинированную ХЕЛИК®-скан-М ТУ9443-007-59483502-2014; Индикатор компьютеризированный содержания аммиака в воздухе, извлекаемом из ротовой полости, для экспресс-диагностики хеликобактериоза ХЕЛИК®-аппарат ТУ9442-003-59483502-2009; Анализатор выдыхаемого воздуха ЛАКТОФАН2, ТУ9441-004-59483502-2010. Разработанные изделия прошли необходимые технические и клинические испытания и зарегистрированы в России Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (РОСЗДРАВНАДЗОР): № ФСР 2007/00378, № ФСР 2009/05180, № ФСР 2010/07907, № ФСР 2011/10258, № РЗН 2015/2536. Получены регистрационные удостоверения на продукцию в Казахстане, Республике Беларусь, а также декларации соответствия на Украине, декларации о соответствии Техническому регламенту Таможенного союза, сертификат Европейского содружества на IVD Medical Device.

Разработанные медицинские изделия внедрены в широкую медицинскую практику, используются в более чем трех тысячах лечебных учреждений России, а также экспортируются в более чем 50 зарубежных стран.

Список используемых сокращений:

АДТ – аммиачный дыхательный тест;

БУТ – быстрый уреазный тест;

ВДТ – водородный дыхательный тест;
ВМДТ – водородно-метановый дыхательный тест;
ГВС – газо-воздушная смесь;
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
ИТ – индикаторная трубка;
ИФА – иммуноферментный анализ;
ЛН – лактазная недостаточность;
МДП – датчик «Металл-диэлектрик-полупроводник»;
ПГС – поверочная газовая смесь;
ПЦР – полимеразно-цепная реакция;
РЖ – ротовая жидкость;
РП – ротовая полость;
СИБР – синдром избыточного бактериального роста;
СИД – спектрометр ионного дрейфа;
СОЖ – слизистая оболочка желудка;
УА – уреазная активность;
ФГДС – фиброгастродуоденоскопия;
ЭХД – электрохимический датчик;
HP – *Helicobacter pylori*;
UBT – Urea Breath Test; мочевинный дыхательный тест.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ:

1. **Дмитриенко М.А.** Биотехнологическая модель процессов образования газообразных биомаркеров при персистировании инфекции *Helicobacter pylori* / М.А. Дмитриенко, А.И. Гинак // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7, №1. – С.133-139 (№ 971 в списке ВАК РФ).
2. Корниенко Е.А. Неинвазивная диагностика инфекции *Helicobacter pylori* с помощью ХЕЛИК-аппарата / Е.А. Корниенко, **М.А. Дмитриенко,** О.Г. Клочко, О.Н. Нажиганов, С.В. Григорьев, Н.А. Мамаев // Вопросы детской диетологии. – 2004. – Т.2, №1. – С. 50-51. (ИФ 0,382) (№ 726 в списке ВАК РФ).
3. Корниенко Е.А. Оценка чувствительности ХЕЛИК-теста определения *H.Pylori* / Е.А. Корниенко, **М.А. Дмитриенко,** Н.И. Паролова, И.Г. Шургалина // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Спецвыпуск. – 2005. – С.30-31. (ИФ 0,474) (№ 993 в списке ВАК РФ).
4. **Дмитриенко М.А.** Неинвазивная диагностика инфекции *Helicobacter pylori* по аммиаку / М.А. Дмитриенко, Н.И. Паролова, С.В. Григорьев // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2006. – № 1. – С.47-53. (ИФ 0,602) (в списке ВАК РФ).
5. Корниенко Е.А. Сравнительная оценка эффективности современных методов диагностики инфекции *Helicobacter pylori* / Е.А. Корниенко, **М.А. Дмитриенко,** Н.И. Паролова // Consilium medicum. Педиатрия. – 2008. – №1. – С.4-8. (ИФ 0,495) (№ 1663 в списке ВАК РФ).
6. Корниенко Е.А. Клиническое применение водородного дыхательного теста в диагностике лактазной недостаточности и синдрома избыточного бактериального роста у детей раннего возраста / Е.А. Корниенко, С.С. Кубалова, **М.А. Дмитриенко**, И.Э. Джагацпанян // Педиатр. – 2013. – Т. 4, №1. – С. 9-15. (ИФ 0,159) (№ 1661 в списке ВАК РФ).

7. **Дмитриенко М.А.** Значение нарушений кишечного микробиоценоза и лактазной недостаточности при функциональных расстройствах желудочно-кишечного тракта у детей раннего возраста / М.А. Дмитриенко, Е.А. Корниенко, С.С. Кубалова, И.Э. Джагацпанян // Вопросы детской диетологии. – 2013. – №4. – С. 26-30. (ИФ 0,382) (№ 726 в списке ВАК РФ).
8. **Дмитриенко М.А.** Диагностические дыхательные тесты в медицине / М.А. Дмитриенко // Практическая медицина. – 2014. – №1(77). С. 138-146. (ИФ 0,361) (№1717 в списке ВАК РФ).
9. **Дмитриенко М.А.** Исследование активности оральной уреалитической микрофлоры / М.А. Дмитриенко, С.Э. Быков, А.С. Быков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – №102(2). – С. 69. (ИФ 0,602) (в списке ВАК РФ).
10. **Дмитриенко М.А.** Механизм транспорта аммиака из желудка в ротовую полость при гидролизе мочевины в присутствии гастральной уреазы / М.А. Дмитриенко, С.Э. Быков, А.С. Быков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – №102(2) – С. 42. (ИФ 0,602) (в списке ВАК РФ).
11. **Дмитриенко М.А.** Устройство «ХЕЛИК-скан» для автоматизации проведения ХЕЛИК-теста с индикаторной трубкой / М.А. Дмитриенко, А.И. Киреев, В.С. Дмитриенко, Н.И. Паролова, Л.Н. Белоусова // Медицинский альманах. – 2014. – №1(31). – С.122-124. (ИФ 0,398) (№1314 в списке ВАК РФ).
12. Паролова Н.И. Быстрый уреазный Хелпил-тест в диагностике инфекции *Helicobacter pylori* у детей / Н.И. Паролова, **М.А. Дмитриенко,** П.В. Антонов, М.В. Егорова, Е.Ф. Горбунов // Практическая медицина. – 2014. – №9(85). – С. 259-261. (IF 0,380) (№1717 в списке ВАК РФ). (№1717 в списке ВАК РФ).
13. **Дмитриенко М.А.** Аммиак как газообразный биомаркер инфекции *Helicobacter pylori* / М.А. Дмитриенко, А.И. Гинак // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2016. – №33(59). – С. 56-63. (ИФ 0,137) (№1036 в списке ВАК РФ).
14. **Дмитриенко М.А.** Основные биохимические и клинические аспекты неинвазивного теста ХЕЛИК / М.А. Дмитриенко, В.С. Дмитриенко, Е.А. Корниенко, Н.И. Паролова, Е.О. Коломина, Е.Б. Аронова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – № 8 (132). – С. 75-81. (ИФ 0,602)
15. **Дмитриенко М.А.** Выбор детекторов для проведения водородно-метанового дыхательного теста / М.А. Дмитриенко, И.Э. Джагацпанян // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2016. –№37(63). – С. 42-46. (ИФ 0,137). (№1036 в списке ВАК РФ).
16. **Дмитриенко М.А.** Биотехнологический подход к моделированию процессов продуцирования водорода в кишечнике человека / М.А. Дмитриенко, С.Э. Быков // Бутлеровские Сообщения. – 2021. – V.65. – N. – P.116-124. (№167 в списке ВАК РФ).

Публикации в изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science:

1. Khorovskaya L. Experience of modified non-isotopic, non-invasive breath test for Helicobacter pylori in pediatric practice / L. Khorovskaya, E. Kornienko, **M. Dmitrienko**, O. Nazhiganov // Clin. Chem. – 2003. – V.49. – №6, Supplement. – P.A52.
2. **Dmitrienko M.** Modified Non-Invasive Breath test for Helicobacter pylori / M. Dmitrienko, E. Kornienko, L. Khorovskaya, O. Nazhiganov, V. Emanuel // Clin. Chem. Lab. Med. – 2003. – V.41; Special Supplement. – P. S 284.
3. **Dmitrienko M.A**. Biotechnological model of *Helicobacter pylori* detection inside the human stomach / M.A. Dmitrienko, A.I. Ginak // Helicobacter. – 2018. - Volume 23 (Suppl.1) - P.01.03.
4. **Dmitrienko M.** Helicobacter pylori persisting in mouth cavity: myth or reality? / M. Dmitrienko, N. Baryshnikova, E. Kolomina // Helicobacter. – 2018. – V.23 (Suppl.1) – P.01.04.

5. Baryshnikova N.V. Comparative estimation of results of the new selective rapid urease test and detection of *H. pylori* in stool: A pilot study / N.V. Baryshnikova, Y.P. Uspenskiy, A.N. Suvorov, **M.A. Dmitrienko** // Helicobacter. – 2020. – V.25 (Suppl.1) –EP.1.02.
6. Kolomina E. Laboratory assessment of a device prototype for methane and hydrogen breath testing / E. Kolomina, **M. Dmitrienko,** V. Pasenko, I. Jahatspanian // Helicobacter. – 2020. – V.25 (Suppl.1) - EP.14.02.

Прочие публикации:

1. Инфекция *Helicobacter pylori* в России. Сборник конкурсных научных статей. Под ред. Е.А.Корниенко, **М.А. Дмитриенко.** – СПб. – 2010. – 100 с.
2. Инфекция *Helicobacter pylori* и дыхательная диагностика заболеваний и патологических состояний организма человека по выдыхаемому воздуху. Сборник конкурсных научных статей. Под ред. Е.А.Корниенко, **М.А. Дмитриенко** и др. СПб. – 2011. – 62 с.
3. Диагностика заболеваний желудочно-кишечного тракта по выдыхаемому воздуху. Сборник конкурсных научных статей. Под ред. Е.А. Корниенко, **М.А. Дмитриенко** и др. – СПб. – 2012. – 78 с.
4. Дыхательные технологии в медицинской диагностике. Материалы Междунар. Конкурса им. Е.С. Рысса. Под ред. Е.А. Корниенко, **М.А. Дмитриенко** и др. – СПб. – Изд-во Политехн. ун-та. – 2015. – 36 с.
5. Паролова Н.И., Игуменова Е.Л., Корниенко Е.А., **Дмитриенко М.А.** Сравнительная оценка эффективности современных методов диагностики инфекции *Helicobacter pylori.* В сб.: «Клинико-эпидемиологические и этно-экологические проблемы заболеваний органов пищеварения». – Красноярск. – 2008. – С.43-54.
6. ХЕЛПИЛ-тест и ХЕЛИК-тест для диагностики хеликобактериоза. Пособие для врачей. Е.А. Корниенко, В.Л. Эмануэль, **М.А. Дмитриенко,** Л.А. Хоровская, О.Н. Нажиганов. СПб. – Издательство СПбГМУ. – 2005. – 20 с.
7. Корниенко Е.А., **Дмитриенко М.А.,** Никулин Ю.А., Филюшкина Е.И., Филюшкин И.П. Применение медицинской техники при функциональной диагностике в гастроэнтерологии. Учебно-методическое пособие. – СПб.: 2006. – 104с.
8. AMA Rapid Urease Test and HELIC Ammonia Breath Test for *H.pylori* detection. Handbook for specialists. Kornienko E., **Dmitrienko M.,** SPb., – 2010 – 13p.
9. Корниенко Е.А., **Дмитриенко М.А.,** Тимофеева Д.Ф., Типикина М.Ю., Карпинчук Д.Н., Кубалова С.С. Водородный Дыхательный Тест в Диагностике Непереносимости Углеводов и Синдрома Избыточного Бактериального Роста. Методические рекомендации для врачей. СПб.: 2011. – 20 с.

Патенты РФ:

1. Пат. на изобретение № 2263468 Российская Федерация. [Текст] / **Дмитриенко М.А.**, Корниенко Е.А.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Ассоциация Медицины и Аналитики». - заявл. 11.04.03; опубл. 10.11.05, Бюл. №31.
2. Пат. на изобретение № 2527694 Российская Федерация. Способ неинвазивной диагностики непереносимости лактозы. [Текст] / Е.А.Корниенко, **Дмитриенко М.А.**, Джагацпанян И.Э., Кубалова С.С.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Ассоциация Медицины и Аналитики». - № 2013131663/15 заявл. 09.07.13; опубл. 10.09.14, Бюл. №25.
3. Патент на изобретение № 2715405 Российская Федерация. Тест-система для определения ферментативной активности бактерий по аммиаку. [Текст] **Дмитриенко М.А.,**

Аксенов Е.М., Дмитриенко В.С., Коломина Е.О.; Заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Ассоциация Медицины и Аналитики». - № 2018146363, заявл. 24.12.2018; опубл.27.02.2020, Бюл. №6.

Полезные модели РФ:

1. Пат. на полезную модель №36615 Российская Федерация. Устройство для проведения диагностирования заболевания человека по составу воздуха ротовой полости [Текст] / Корниенко Е.А., **Дмитриенко М.А.**, Дмитриенко В.С., Мамаев М.А., Шургалина И.Г.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Ассоциация Медицины и Аналитики», заявл.18.11.03; опубл. 20.03.04, Бюл. №8.
2. Пат. на полезную модель № 38568 Российская Федерация. Устройство для неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori.* [Текст] / Корниенко Е.А., **Дмитриенко М.А.,** Мамаев Н.А., Григорьев С.В.; заявитель и патентообладатель ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», №2004104865/20 заявл. 12.02.04; опубл. 10.07.04, Бюл. №19.
3. Пат. на полезную модель №141060 Российская Федерация. Устройство для проведения диагностики заболеваний человека по составу воздуха ротовой полости [Текст] / **Дмитриенко М.А.**, Корниенко Е.А., Дмитриенко В.С., Киреев А.И.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Ассоциация Медицины и Аналитики», №2013158565/14 заявл. 27.12.13; опубл. 27. 05.14, Бюл. №15.
4. Пат. на полезную модель №154013 Российская Федерация. Устройство для обнаружения уреазы в испытуемом образце [Текст] / **Дмитриенко М.А.**, Дмитриенко В. С., Корниенко Е. А., Коломина Е. О.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Ассоциация Медицины и Аналитики», №2014142403/10 заявл. 21.10.14; опубл. 10.08.15, Бюл. №22.

Международные патенты:

1. European patent EP 3009519 A1 Test device, reactive element and arrangement for urease activity [Текст] / **Dmitrienko M.**, Dmitrienko V., Kornienko E., Kolomina E.; priority 14.10.2014 FI 20145897, publ.20.04.2016 Bull.2016/16. https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/054330621/publication/EP3009519B1?q=ep3009519a1
2. Test-system for the detection of bacterial enzymatic activity by ammonia Дмитриенко М. А., Аксенов Е. М., Дмитриенко В. С., Коломина Е. О. Заявка на международный патент в European Patent Office № 2018146363 от 24.12.2018. RU2715405C1, дата публикации – 27.02.2020.