



УДК 616.379-008.64+616.61-03-08-092

Академік НАН України А. С. Єфімов, Т. С. Цимбал

Сучасні аспекти патогенезу та лікування діабетичної нефропатії

Проводиться аналіз залежності концентрації трансформуючого фактора росту – бета (TGF- β 1) в сироватці крові у хворих на цукровий діабет типу 1 від стадії діабетичної нефропатії. Сорок пацієнтів розділені на чотири групи: 1-ша група – хворі на ЦД типу 1 з ДН 3 ст., виявлена вперше, 2-га група – хворі на цукровий діабет типу 1 з ДН 3 ст. в анамнезі, 3-тя група – хворі на цукровий діабет типу 1 з ДН 4 ст., 4-та група – хворі на цукровий діабет типу 1 без ДН, 5-та група – контрольна – 10 здорових осіб без ЦД.

Діабетична нефропатія (ДН) — одне з найтяжчих ускладнень цукрового діабету (ЦД) типу 1 і 2, яке характеризується розвитком ниркової недостатності, що неухильно прогресує до термінальної стадії з необхідністю проведення замісної ниркової терапії — гемодіалізу, перитоніального діалізу або трансплантації нирки. В наш час серед усіх хворих, які отримують таку терапію, особи з ДН становлять близько 40–60% [1].

За останні десятиліття досягнуто значних успіхів в розумінні механізмів розвитку ДН. Однак цілий ряд питань потребує подальшого вивчення. Однозначно патогенез ДН має комплексний характер, який включає генетичну схильність, складні взаємовідносини метаболічних та генетичних факторів.

Дослідженнями останніх років встановлено, що патогенез ДН має ознаки тубулоінтерстиціального фіброзу (ТІФ). Морфологічна картина ТІФ являє собою зміни в інтерстиції та в каналцях нирок. Інтерстиціальні зміни у вигляді клітинної інфільтрації, накопичення компонентів екстрацелюлярного матриксу (колаген, фібронектин, ламінін), розростання та склерозу інтерстиція, а каналцеві — гіаліново-гідрофічна дистрофія каналцевого епітелію, що у подальшому незворотно веде до апоптозу тубулярних клітин, атрофії каналців та втрати перитубулярних капілярів [2].

Формування ТІФ можна розділити на три стадії: перша стадія апірогенного запалення — інфільтрація ниркового інтерстиція клітинами запалення, друга — інтерстиціального фіброзу, третя — формування тубулярної атрофії.

Трансформуючий фактор росту – β (TGF- β) — це профібротичний цитокін. Роль трансформуючого фактора росту – β (TGF- β 1) у формуванні ТІФ полягає в активації притоку

© А. С. Єфімов, Т. С. Цимбал, 2014

фібробластів в інтерстицій нирок. Під дією TGF- β 1 відбувається перетворення фібробластів в міофіброласти. Цей процес має назву ендотеліально-мезенхімальна трансформація. Міофіброласти виділяють у необмеженій кількості екстрацелюлярні матричні протеїни (колаген), фібронектин та гіалуронову кислоту [3, 4], що призводить до розростання матриксу.

У хворих, які відносяться до підвищеної групи ризику, повинна проводитися первинна та вторинна профілактика ДН. До первинної належить дієта № 9, жорсткий контроль рівня глікемії, призначення препаратів групи і-АПФ [5] та і-БРА [6]. Гепарансульфат є основним компонентом БМ, який забезпечує від'ємний заряд, тим самим запобігає проникненню через нирковий бар'єр негативно заряджених молекул альбуміну. Розвиток ДН у хворих на ЦД відбувається одночасно з появою інших локалізацій мікроангіопатій. Це пояснюється тим, що гепарансульфат знаходиться в структурі БМ не тільки нирок, а й інших органів. Тому застосування цієї речовини позитивно впливає і на нирки, і на інші органи організму.

Відомо, що гепарансульфат може гальмувати проліферативну активність мезангіальних клітин, що відіграють роль у формуванні гломерулосклерозу, тим самим попереджаючи його розвиток [7, 8].

В останні роки набуває поширення препарат сулодексид (Vessel Dye F) — глікозаміноглікан високого очищення, який складається на 80% з гепараноподібної фракції і на 20% — з дерматансульфату [9].

Нами проведено дослідження, метою якого було з'ясувати роль профібротичного цитокіну TFG- β 1 у формуванні ДН, а також патогенетично обґрунтувати ефективність комбінованої нефропротекторної терапії препаратом гепарансульфату (сулодексид) у хворих на цукровий діабет типу 1 з діабетичною нефропатією різних стадій.

Матеріали і методи. Обстежено 40 хворих на ЦД типу 1, з них жінок було 21 (53%), чоловіків — 19 (47%) віком від 21 до 48 років, в середньому по групі $33,87 \pm 1,04$ років, з тривалістю захворювання від 4 до 38 років, середній показник — $16,82 \pm 1,34$ роки. Рівень глікованого гемоглобіну становив від 5,5 до 9,9%, в середньому $7,9 \pm 0,14\%$.

Артеріальна гіпертензія 2-го ступеня (АГ) була виявлена у 9 (22,5%) пацієнтів, АГ 3-го ступеня, ускладнена наявністю інсульту в анамнезі, у одного (2,5%) хворого. Ці пацієнти мали макроальбумінурію в сечі і відносились до пацієнтів з ДН 4 ст. У 30 (75%) хворих гіпертензія була відсутня. Середній рівень артеріального тиску (АТ) становить: систолічний $118,8 \pm 1,3$ мм. рт. ст., діастолічний — $78,8 \pm 1,2$ мм. рт. ст.

В анамнезі спостерігався інсульт у одного (2,5%) пацієнта. У всіх 40 (100%) пацієнтів виявлено ангіопатію судин нижніх кінцівок, а також у всіх зареєстровано дистальну сенсомоторну полінейропатію.

Зміни на очному дні виявлені у 25 пацієнтів (62,5%): непроліферативна ретинопатія — 11 випадків (27,5%), проліферативна — 14 (35%).

У стані компенсації (HbA_{1c} до 7,5%) перебувало 13 (32,5%) пацієнтів і в декомпенсації хворих — 27 (67,5%).

Показники загального аналізу крові не відрізнялися від нормальних значень.

Пацієнти проходили клініко-біохімічне обстеження, зокрема визначався показник ШКФ, який коливався в межах від 80 до 217 мл/хв, в середньому $127,25 \pm 5,4$ мл/хв, МАУ була в діапазоні від 6 до 950 мг/л, середній показник $134,94 \pm 28,3$ мг/л, креатинін становив від 44 до 116 мкмоль/л, в середньому $82,37 \pm 3,5$ мкмоль/л та TFG- β 1 коливався від 300,56 до 516,81 нг/мл, в середньому по групі 435,44 нг/мл. Ці показники оцінювалися до лікування та через шість місяців після лікування. ШКФ була розрахована за формулою Cockcroft-Goult,

креатинін крові за допомогою автоматичного аналізатора Chem Well 2910 — кінетичним методом, МАУ — напівкількісним аналізом Micra-test. Всі дослідження виконувалися в біохімічній лабораторії ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України”.

Дослідження TFG- β 1 у сироватці крові хворих на ЦД типу 1 проводилося за допомогою біохімічного аналізатора з використанням реактиву TFG- β 1 ELISE (Німеччина) в радіологічній лабораторії ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України”.

Пацієнти розділялися на чотири групи залежно від наявності ДН, її ступеня за Могенсенном та тривалості цього ускладнення.

До складу першої групи увійшли 10 хворих з ДН 3 ст. за Могенсенном, виявленою вперше (з мікроальбумінурією від 20 до 200 мг/л), вік коливався від 24 до 44 років, в середньому $35,3 \pm 2,2$ років, показник глікозильованого гемоглобіну — від 7,1 до 9,3%, в середньому $8,25 \pm 0,2\%$. Тривалість діабету в цій групі — від 8 до 34 років, в середньому $15,8 \pm 2,5$ років. Глікований гемоглобін коливався від 7,1 до 9,3%, в середньому $8,2 \pm 0,3\%$. Рівень креатиніну в сироватці крові становив від 51 до 106 мкмоль/л, в середньому по групі $77,7 \pm 5,8$ мкмоль/л. ШКФ у пацієнтів цієї групи була від 81 до 169 мл/хв., в середньому $166,6 \pm 12,4$ мл/хв., рівень МАУ — в діапазоні від 30 до 150 мг/л, середній показник становить $68,7 \pm 12,3$ мг/л. Ці пацієнти приймали нефропротекторне лікування і-АПФ та препаратом гепарансульфату.

Друга група — 10 хворих з ДН 3 ст. з тривалістю ускладнення від 3 до 12 років, в середньому $6,8 \pm 0,97$ років, в анамнезі цих пацієнтів був прийом препаратів групи і-АПФ. Вік пацієнтів — від 25 до 48 років, середній показник — $36,4 \pm 2,48$ років. Глікований гемоглобін коливався від 5,5 до 9,5%, в середньому по групі $7,8 \pm 0,43\%$. Тривалість ЦД була в діапазоні від 5 до 32 років, середній показник по групі — $19,2 \pm 2,9$ років. Концентрація креатиніну сироватки крові знаходилась в діапазоні від 44 до 116 мкмоль/л, середній показник по групі $91,7 \pm 7,7$ мкмоль/л. ШКФ у цих пацієнтів коливалася від 80 до 217 мл/хв, в середньому по групі — $132,4 \pm 14,82$. Рівень МАУ був в межах від 33 до 198 мг/л, в середньому — $8,9 \pm 17,85$ мг/л.

Третя група — 10 хворих з ДН 4 ст. (макроальбумінурія в анамнезі), вік пацієнтів від 21 до 35 років, середній показник — $30,8 \pm 1,52$ років. Глікований гемоглобін коливався від 6,6 до 9,6%, в середньому — $7,8 \pm 0,28\%$, тривалість ЦД — від 7 до 33 років, середній рівень — $16,1 \pm 2,45$ років. У цих хворих в анамнезі була ДН, тривалість якої коливалася від 5 до 13 років, середній рівень становив $7,2 \pm 1,01$ років. Креатинін був в межах 60–151 мкмоль/л, середній показник по групі — $88,7 \pm 10,3$ мкмоль/л. ШКФ коливалася від 80 до 165 мл/хв, а середній рівень — $123,7 \pm 11,04$ мл/хв. Рівень МАУ визначався від 231 до 950 мг/л, в середньому по групі — $369,7 \pm 71,29$.

Четверта група — 10 хворих на ЦД типу 1 без ДН (з нормальбумінурією), віком від 27 до 42 років, середній вік — $34,8 \pm 1,8$ років, глікований гемоглобін на момент обстеження коливався від 6,3 до 9,9%, середній показник — $7,68 \pm 0,3\%$, тривалість ЦД становила від 4 до 38 років, в середньому $13,1 \pm 3,4$ років. Креатинін був в межах 51–87 мкмоль/л, в середньому $71,4 \pm 3,8$ мкмоль/л. ШКФ коливалася від 103 до 166 мл/хв, середній рівень — $136,3 \pm 6,5$ мл/хв. МАУ у цих хворих була в діапазоні від 8 до 20 мг/л, середній показник по групі — $11,5 \pm 1,5$ мг/л.

Контрольна група складалася з 10 осіб жіночої статі без ЦД, артеріальної гіпертензії та супутньої патології нирок, віком від 32 до 42 років, в середньому — $6,3 \pm 1,2$ років.

Артеріальний тиск у всіх хворих першої та четвертої груп коливався в межах норми (до 120/80 мм рт. ст.). У хворих другої та третьої груп була артеріальна гіпертензія (середній рівень систолічного тиску — $145 \pm 1,5$ мм рт. ст., діастолічного — $90,5 \pm 0,5$ мм рт. ст.). Але пацієнти цих двох груп приймали гіпотензивну терапію препаратами групи і-АПФ у комбінації з іншими групами. Всі хворі отримували базисну терапію — дієта № 9, інтенсивна схема інсулінотерапії. Рівень глікованого гемоглобіну хворих достовірно не відрізнявся, що свідчить про приблизно однаковий рівень компенсації ЦД у різних групах.

Після обстеження хворі продовжували дотримуватися дієти № 9, приймати ін'єкції інсуліну у вигляді інтенсивної схеми та гіпотензивну терапію і-АПФ. Хворим з ДН 3 ст., виявленою вперше, призначався курс лікування препаратом групи і-АПФ — еналапріл у дозі 5 мг на добу у поєднанні з препаратом гепарансульфанту Vessel due F, сулодексид “Alfa Wasserman”, Італія. Курс лікування становив: ін'єкції № 10 в/м по 1 мл (600LE SU), потім в таблетованій формі по одній таблетці двічі на добу протягом місяця. Пацієнтам другої групи, що мали ДН 3 ст. в анамнезі, до і-АПФ приєднувався препарат гепарансульфанту Vessel due F, сулодексид “Alfa Wasserman”, Італія.

Ефективність лікування розцінювалася за аналізом показників функції нирок до лікування та через шість місяців після закінчення курсу лікування. Динаміку цих показників наведено в табл. 1. Отримані нами дані оброблялися за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6,0. Достовірність визначали за допомогою критерія Ст'юдента при $p < 0,05$.

Результати. У контрольній групі (здорові особи без ЦД) середній рівень TGF- β 1 у сироватці крові становив $348,7 \pm 26,6$ нг/мл. У першій групі хворих на ЦД типу 1 з ДН, виявленою вперше, середній рівень TGF- β 1 у сироватці крові становив $409,36 \pm 18,06$ нг/мл, що достовірно вище порівняно з контрольною групою без цукрового діабету ($p < 0,02$). Але при порівнянні концентрації TGF- β 1 у сироватці крові першої групи з групами пацієнтів, що мали в анамнезі ДН 3 ст. та ДН 4 ст., визначилась нижче з достовірністю ($p < 0,02$) та ($p < 0,005$) відповідно. Між групою пацієнтів з ДН 3 ст., діагностованою вперше, та групою хворих на ЦД типу 1, але без ДН, достовірної різниці між концентрацією TGF- β 1 у сироватці крові не було ($p > 0,05$).

У другій групі середній рівень TGF- β 1 у сироватці крові становив $467,47 \pm 17,76$ нг/мл, що було достовірно вище порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$), а також порівняно з групою пацієнтів, у яких ДН 3 ст. було діагностовано вперше ($p < 0,02$) та з групою пацієнтів без ДН ($p < 0,02$). Достовірної різниці між рівнями TGF- β 1 у сироватці крові в групах з ДН 3 ст. в анамнезі і ДН 4 ст. в анамнезі не було ($p > 0,05$).

Середній рівень TGF- β 1 у сироватці крові в третій групі становив $470,84 \pm 17,47$ нг/мл — достовірно вище порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$), з групою з ДН 3 ст., виявле-

Таблиця 1. Динаміка показників до лікування та через шість місяців після лікування

Показник	Групи				
	контрольна (n = 10)	перша (n = 10)	друга (n = 10)	третя (n = 10)	четверта (n = 10)
TGF- β 1 до лікування	$348,7 \pm 26,6$	$409,36 \pm 18,06^{***\#\#}$	$467,47 \pm 17,76^{***\#\#\#}$	$470,84 \pm 17,47^{***\#\#\#}$	$394,09 \pm 19,44^*$
TGF- β 1 після лікування	—	$390,29 \pm 15,37^{**}$	$421,39 \pm 29,47$	—	—

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ — достовірність між групами порівняння;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ — достовірність порівняно з групою контролю.

ною вперше ($p < 0,05$), та з групою пацієнтів без ДН ($p < 0,05$). Рівні TGF- β 1 у сироватках крові в групах з ДН 4 ст. і ДН 3 ст. в анамнезі достовірно не відрізнялися ($p > 0,05$).

В четвертій групі пацієнтів середній рівень TGF- β 1 у сироватці крові становив $394,09 \pm 19,44$ нг/мл. При порівнянні концентрацій TGF- β 1 у сироватці крові в групах хворих на ЦД типу 1 без ДН і контрольною групою була виявлена тенденція до збільшення ($0,1 < p < 0,05$). Цей показник порівняно з групою пацієнтів ДН 4 ст. в анамнезі був нижче з достовірністю ($p < 0,05$), а також він був достовірно нижче порівняно з групою пацієнтів, що мали ДН 3 ст. в анамнезі ($p < 0,02$). А при порівнянні груп хворих на ЦД типу 1 без ДН та з ДН 3 ст., виявленою вперше, достовірна різниця між рівнями TGF- β 1 у сироватках крові не відзначалася.

У першій та другій групах пацієнтів проводилося патогенетичне лікування препаратами гепарансульфату в комбінації з препаратами групи і-АПФ. Динаміка рівня TGF- β 1 у сироватці крові цих пацієнтів була такою: в першій групі показник TGF- β 1 у сироватці крові до лікування становив $409,36 \pm 18,06$ нг/мл, а через шість місяців після лікування — $334,29 \pm 9,6$ нг/мл, що свідчило про достовірне зниження цього показника порівняно з вихідним рівнем до лікування ($p < 0,01$).

У другій групі до лікування рівень TGF- β 1 у сироватці крові становив $467,47 \pm 17,46$ нг/мл, через шість місяців після лікування цей показник знизився відносно вихідного рівня і становив $421,39 \pm 31,0$ нг/мл, але це зниження не мало достовірного характеру ($p > 0,05$).

Обговорення результатів. Трансформуючий фактор росту – β (TGF- β 1) — це профібротичний цитокін, який був виділений з тромбоцитів у 90-х роках. Назва його походить від здатності стимулювати ріст і трансформацію клітин *in vitro*. В нормальних умовах цей цитокін відповідає за стан клітинної проліферації та диференціації, апатоз, імунну відповідь і відіграє важливу роль у процесі регенерації вражених тканин, заживленні ран і формуванні грануляційної тканини [11, 12].

При вивченні основних концепцій розвитку та прогресування хронічної хвороби нирок стало очевидним те, що провідне місце в патогенезі ДН належить профібротичному цитокіну TGF- β 1. Саме він є одним із основних активаторів фіброгенезу в нирці. Тому, з терапевтичної точки зору, для припинення прогресування діабетичної нефропатії необхідні методи, які дали б можливість пригнітити активність TGF- β [13, 14]. В цьому напрямку проведено багато досліджень на лабораторних тваринах. Але розвиток хронічної хвороби нирок у людей — набагато складніший процес, ніж у тварин. Введення протеогліканів лабораторним крисам пригнічувало активність цього профібротичного цитокіну в такій самій мірі, як і введення нейтралізуючих антитіл до TGF- β .

Слід зауважити, що застосування сулодексиду (Vessel Dye F) в ін'єкціях та таблетках переносилося добре, без побічних ефектів. Жоден з показників функціонального стану нирок не погіршувався. У хворих з проліферативною стадією діабетичної ретинопатії нових крововиливів не виявлено, у деяких покращилася гострота зору.

Після курсу патогенетичної комбінованої нефропротекторної терапії нами було зафіксовано достовірне зниження профібротичного цитокіну TGF- β 1 у сироватці крові хворих на ЦД типу 1 з ДН 3 ст., діагностованою вперше, відносно вихідного рівня. В групі хворих на ЦД типу 1 з ДН 3 ст. в анамнезі зниження цього фактора також відбувалося, але воно не мало достовірного характеру. В групі хворих на ЦД типу 1 без ДН була зафіксована тенденція до збільшення профібротичного цитокіну, який займає провідне місце у формуванні ДН.

Наші результати збігаються з результатами досліджень іноземних вчених, які у своїх досліджах зазначали позитивний ефект від застосування препаратів групи гепарансульфату [8–10]. Оскільки нами була зафіксована тенденція до збільшення профібротичного цитокіну навіть на доклінічних стадіях ДН, то застосування препарату групи гепарансульфату патогенетично обгрунтоване і, напевно, може мати позитивний ефект у профілактиці розвитку ДН. На нашу думку, більш вагомий вплив препарати гепарансульфату мали б на початкових доклінічних стадіях формування ДН, оскільки дослідження продемонструвало зниження рівня профібротичного цитокіну під впливом патогенетичної терапії.

1. Дедов И. И., Шестакова М. В. Диабетическая нефропатия. – Москва: Универсум Паблишинг, 2000. – 239 с.
2. Okon K. Tubulo-interstitial changes in glomerulopathy. Prognostic significance // Pol. J. Pathol. – 2003. – No 54(3). – P. 177–187.
3. Kobayashi T., Inoue T., Okada H. et al. Connective tissue growth factor mediates the profibrotic effects of transforming growth factor – beta produced by tubular epithelial cells in response to high glucose // Clin. Exp. Nephrol. – 2005. – No 9(2). – P. 114–121.
4. Jones S., Phillips A. O. Regulation of renal proximal tubular epithelial cell hyaluronan generation: implication for diabetic nephropathy // Kidney Int. – 2001. – No 59. – (5). – P. 1739–1749.
5. Levin S. R., Coburn J. V., Abrair C. Effect of intensive glycemic control of microalbuminuria in type 2 diabetes. Veterans affairs cooperative study on glycemic control and complication in type 2 diabetes // Diabetes Care. – 2000. – No 23. – P. 1478–1485.
6. Lacourciere Y., Belanger A., Godin C. Long-term comparison of losartan and enalapril on kidney function in hypertensive type 2 diabetics with early nephropathy // Kidney Int. – 2000. – No 58. – P. 762–769.
7. Zandbergemenan C., Lamberts S. W. G. Effect of losartan on microalbuminuria in normotensive patients with type 2 diabetes mellitus // Ann. Int. Med. – 2003. – No 139. – P. 90–96.
8. Бондарь И. А., Климонтов В. В. Гликозаминогликаны и диабетическая нефропатия // Пробл. эндокринологии. – 2004. – 50, № 2. – С. 29–33.
9. Воронцов А. В., Дедов И. И., Шестакова М. В. и др. Гликозаминогликаны в терапии диабетической нефропатии // Там же. – 2006. – 20, № 5. – С. 14–17.
10. Залевская А. Г., Астамирова Х. С., Карпова И. А., Попова С. Г. Опыт применения низкомолекулярного гепарина сулодексида в терапии диабетической нефропатии // Терапевт. архив. – 1998. – № 3. – С. 71–74.
11. Першина Е. С. Трансформирующий фактор роста – $\beta 1$ у пациентов с гипертонической болезнью и сахарным диабетом типа 2 и без него в динамике комбинированной терапии ранее // Укр. терапевт. архив. – 2010. – № 3. – С. 75–80.
12. Кармышева Н. Н., Чумакова О. В., Кучеренко А. Г. и др. Межклеточные взаимодействия в патогенезе тубулоинтерстициального повреждения // Нефрология и диализ. – 2002. – № 4. – С. 255–259.
13. Mezzano S., Aros C., Droguett A. et al. NF-kappa B activation and expression of regulated genes in human diabetic nephropathy // Nephrol. Dial. Trasplant. – 2004. – No 19. – P. 2505–2512.
14. Wang S., Chen Q., Simon T. C. et al. Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy // Kidney Int. – 2003. – No 63. – P. 2037–2049.

Академик НАН Украины А. С. Ефимов, Т. С. Цымбал

Диагностика и лечение ранних стадий диабетической нефропатии

Проводится анализ зависимости концентрации трансформирующего фактора роста — бета (TGF- β 1) в сыворотке крови у пациентов с СД типа 1 от стадии диабетической нефропатии. Сорок пациентов разделены на четыре группы: 1-я группа — пациенты с СД типа 1 с ДН 3 ст., диагностированной впервые, 2-я группа — пациенты с СД типа 1 с ДН 3 ст. в анамнезе, 3-я группа — пациенты с СД типа 1 с ДН 4 ст., 4-я группа — пациенты с СД типа 1 без ДН, 5-я группа — контрольная — 10 здоровых человек без СД.

Academician of the NAS of Ukraine **A. S. Efimov, T. S. Tsymbal**

Diagnosis and treatment of early stages of diabetic nephropathy

The concentration of TGF- β 1 in blood serum of patients with type 1 diabetes mellitus with various stages of diabetic nephropathy (DN) is measured. 40 patients were conducted: 1 group — patients with DN of the 3-d stage diagnosed for the first time, 2 group — patients with DN of the 3-d stage in the anamnesis for the first time, 3 group — patients with diabetic nephropathy with duration macroalbuminuria, 4 group — patients without DN (positive control), 5 group — healthy volunteers (negative control).