

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»

УДК 616.9:579.882.11-078.088-037-033.1-031.25:611.72:616.72-002

ПОЛУЯН
ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И КРИТЕРИИ
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДИССЕМИНАЦИИ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*
В ПОЛОСТЬ СУСТАВА ПРИ РЕАКТИВНОМ АРТРИТЕ**

Автореферат
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

Минск, 2019

Работа выполнена в государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Научный руководитель: **Костюк Светлана Андреевна**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Официальные оппоненты: **Лялик Сергей Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики и иммунологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Воропаева Алла Викторовна, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Защита состоится «14» февраля 2019 г. в 14.00 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.15.02 при государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (220013, г. Минск, ул. П.Бровки, 3, корп. 3; тел. (017) 292 05 34; e-mail: dissovet@tut.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Автореферат разослан «__» января 2019 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент

И.И. Бурко

ВВЕДЕНИЕ

Реактивный артрит (РеА) относится к числу наиболее распространенных и тяжелых хронических заболеваний суставов, приводящих к потере трудоспособности и сокращению продолжительности жизни (Насонов Е.Л., 2009; Мартусевич Н.А., 2011; Сорока Н.Ф., 2016). По данным Института ревматологии РАМН (РФ), пациенты с РеА составляют около 10% пациентов ревматологических стационаров, причем на долю ассоциированных с урогенитальной инфекцией приходится 50-75% от всех пациентов с РеА (Каратеев Д.Е., 2016; Насонов Е.Л., 2017). В последние годы ревматологами разных стран отмечается рост числа пациентов с артритами, ассоциированными с инфицированием *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) (Zeidler H., 2014; Ostaszewska-Puchalska I., Kumar P., 2016; Okamoto H. et al., 2017).

При диссеминации *C. trachomatis* из места первичного инфицирования (урогенитального тракта) меняются как молекулярно-генетические (снижается синтез структурных компонентов клеточной стенки возбудителя на фоне непрерывного синтеза белка теплового шока 60 кДа), так и морфологические (присутствие в виде внутриклеточных ретикулярных телец и внеклеточных элементарных частиц) характеристики возбудителя, что, в свою очередь, обуславливает трудности его выявления в полости сустава (Gérard H.C., 2004; Osterloh A., 2007; Fauvart M., 2011; McInnes I.B., 2011).

Изучение биохимических (диенконъюгаты (ДК₂₃₃), диенкетоны (ДК₂₇₈), малоновый диальдегид (МДА), водорастворимые (ACL) и жирорастворимые (ACW) вещества антиоксидантной направленности) и иммунологических показателей при РеА, сопровождающемся диссеминацией *C. trachomatis* в сустав, будет способствовать раскрытию механизмов влияния патогена на макроорганизм.

Усовершенствование метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для выявления с его использованием наиболее распространенных серотипов *C. trachomatis*, а также для определения уровней нормализованной экспрессии генов белков теплового шока возбудителя позволит оценить молекулярно-генетические характеристики микроорганизма.

Проведение исследований в указанных направлениях позволит повысить качество лабораторной диагностики РеА, ассоциированного с *C. trachomatis*, а также выявить молекулярно-генетические факторы риска диссеминации возбудителя в полость сустава из места первичного инфицирования.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Диссертационная работа выполнена в рамках задания ГПНИ «Лечебные и диагностические технологии», подпрограмма «Терапия» «Разработать и внедрить

алгоритм диагностических мероприятий и схему коррекции фармакотерапии больных с ранним ревматоидным и недифференцированным артритами с учетом наличия предикторов (маркеров) неблагоприятного течения» (№ госрегистрации 20092507, срок выполнения: 2009–2010 гг.), а также задания ГПНИ «Медицина и фармация» «Разработать программу персонализированной терапии ревматоидного артрита у лиц с отягощенным по заболеванию наследственным анамнезом» (№ госрегистрации 20142048, срок выполнения: 2014–2015 гг.).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг. (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 17 мая 2005 г. №512 п. 4.4. «Новые методы диагностики, профилактики и лечения заболеваний человека», п. 4.5. «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации»; на 2011–2015 гг. (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12 апреля 2010 г. №585, п. 3.6. «ДНК-технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека», п. 4.2. «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний»).

Цель и задачи исследования

Цель исследования – на основании использования молекулярно-генетических методов установить молекулярно-генетические факторы риска диссеминации возбудителя *C. trachomatis* из очага первичного инфицирования (урогенитальный тракт) в полость сустава при реактивном артрите, ассоциированном с *C. trachomatis*; оценить особенности иммуновоспалительных и метаболических изменений у пациентов.

Задачи исследования:

1. Разработать способ выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости.
2. Изучить особенности распределения серотипов *C. trachomatis* в различном биологическом материале (соскобы эпителиальных клеток из уrogenитального тракта, синовиальная жидкость) пациентов с РеА и усовершенствовать метод определения серотипов возбудителя на основе мультиплексной ПЦР-РВ.
3. Усовершенствовать метод определения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604, Ct755 белков теплового шока *C. trachomatis* на основе мультиплексной ПЦР-РВ для установления генетически детерминированных факторов патогенности.

4. Оценить изменения биохимических и иммунологических показателей в биологическом материале (сыворотка/плазма крови, синовиальная жидкость) пациентов с РеА при локализации возбудителя *C. trachomatis* как в урогенитальном тракте, так и при его диссеминации в полость сустава.

5. Установить молекулярно-генетические факторы риска и критерии прогнозирования диссеминации *C. trachomatis* из урогенитального тракта в полость сустава при РеА.

Научная новизна

1. Разработан способ выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости, позволяющий получить препарат, содержащий только ДНК микроорганизмов, потенциально колонизирующих полость сустава.

2. Впервые на основании усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР-РВ с использованием оригинальных специально подобранных олигонуклеотидных пар праймеров и молекулярных зондов выявлены преобладающие серотипы С, D и К *C. trachomatis* в биологическом материале (соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, синовиальная жидкость) пациентов с РеА.

3. Определено, что уровни нормализованной экспрессии гена St604 белка теплового шока *C. trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта пациентов с РеА, выявленные с применением усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР-РВ с использованием специально подобранных пар праймеров и зондов и нормализацией относительно *omp1* гена *C. trachomatis*, имеют статистически значимые различия в зависимости от наличия/отсутствия возбудителя в полости сустава (т.е. диссеминации из очага первичного инфицирования).

4. Установлено, что степень выраженности нарушений биохимического и иммунологического баланса в сыворотке крови, а также изменений иммунологического баланса синовиальной жидкости пациентов с РеА определяется наличием/отсутствием *C. trachomatis* в полости сустава

5. Впервые установлены молекулярно-генетические факторы риска и критерии прогнозирования диссеминации *C. trachomatis* из очага первичного инфицирования в полость сустава: концентрация возбудителя *C. trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл, ассоциации серотипов возбудителя в месте первичной локализации инфекции, а также уровень нормализованной экспрессии гена St604 более 100%.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный способ выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости, основанный на дополнительной обработке биологического образца

лизоцимом для разрушения микробной клеточной стенки, позволяет получить препарат, содержащий ДНК микроорганизмов, присутствующих в полости сустава.

2. Усовершенствованный метод мультиплексной ПЦР-РВ с использованием специально подобранных олигонуклеотидных пар праймеров и молекулярных зондов, оригинального состава реакционной смеси, программы амплификации позволяет проводить одновременное выявление серотипов С, D и К *S. trachomatis* и характеризуется высокой диагностической чувствительностью (94,9 – 96,3%), диагностической специфичностью (92,0 – 98,7%), прогностической ценностью положительного (97,3 – 97,8%) и отрицательного (85,2 – 97,5%) результатов.

3. Уровни нормализованной экспрессии гена St604 белка теплового шока *S. trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток урогенитального тракта, установленные с использованием усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР-РВ, имеют статистические значимые различия в подгруппе пациентов, в биологическом материале которых возбудитель обнаруживался как в урогенитальном тракте, так и в синовиальной жидкости, относительно подгруппы пациентов, у которых патоген детектировался только в урогенитальном тракте ($p < 0,05$), тогда как для генов St110 и St755 белка теплового шока *S. trachomatis* статистические различия отсутствуют ($p > 0,05$).

4. Изменения показателей системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) (ДК₂₃₃, ДК₂₇₈, МДА) и антиоксидантной защиты (АОЗ) (АСW, ACL, ретинол, α -токоферол), цитокинового профиля (фактор некроза опухолей альфа (ФНО- α), интерлейкин 4 (ИЛ-4), неоптерин) достоверно более выражены у пациентов с РеА, ассоциированным с *S. trachomatis*, сопровождающимся наличием возбудителя как в урогенитальном тракте, так и в синовиальной жидкости, по сравнению с аналогичными показателями в случае обнаружении микроорганизма только в очаге первичного инфицирования ($p < 0,05$).

5. Молекулярно-генетическими факторами риска диссеминации возбудителя *S. trachomatis* из очага первичного инфицирования (урогенитальный тракт) в полость сустава являются: концентрация ДНК *S. trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток урогенитального тракта (менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл); наличие ассоциаций серотипов возбудителя; уровень нормализованной экспрессии гена St604 белка теплового шока *S. trachomatis* более 100%.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором совместно с научным руководителем выбрана тема, сформулирована цель и задачи, разработан дизайн исследования (личный вклад 85%). Диссертантом лично проанализирована отечественная и зарубежная литература, изучено состояние проблемы, проведен патентно-информационный поиск, освоены и усовершенствованы методы лабораторной диагностики,

проведены исследования и оформлены исследовательские протоколы, сформирована база данных, проведена обработка данных и статистический анализ, оформлены все разделы диссертации (вклад соискателя не менее 90%).

Клинический диагноз «реактивный артрит» устанавливался доцентом кафедры кардиологии и внутренних болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (УО «БГМУ») к.м.н., доцентом Мартусевич Н.А. Взятие соскобов эпителиальных клеток из цервикального канала и уретры у женщин проводилось доцентом кафедры акушерства и гинекологии УО «БГМУ» к.м.н., доцентом Смирновой Т.А., соскобов эпителиальных клеток из уретры у мужчин – заведующим кафедрой урологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО) д.м.н., профессором Вощулой В.И., синовиальной жидкости – доцентом кафедры кардиологии и внутренних болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» к.м.н., доцентом Мартусевич Н.А. на базе учреждения здравоохранения «6-я городская клиническая больница г. Минска». Ведение документации осуществлялось автором (личный вклад 95%).

Микробиологические исследования по выявлению *S. trachomatis* в культуре клеток McCoу, а также определение фенотипической устойчивости выделенных изолятов проводили в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» в лаборатории диагностики сочетанных бактериально-вирусных инфекций при непосредственном участии и консультативно-методической помощи зав. лабораторией, к.б.н. Рубаник Л.В., к.б.н. Асташонка А.Н., а также при консультативно-методической помощи д.м.н., профессора Полещука Н.Н. (вклад соискателя 50%).

Исследование биохимических показателей проводили в Научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) БелМАПО в отделе метаболической диагностики при непосредственном участии и консультативно-методической помощи Юрага Т.М. и Соловей О.М. (вклад соискателя 70%).

Исследование цитокинового профиля проводили в НИЛ БелМАПО в отделе иммунологии и биомедицинских технологий при консультативно-методической помощи Иванчик Г.И. (вклад соискателя 85%).

Молекулярно-генетические исследования соискатель проводил лично в НИЛ БелМАПО в группе ПЦР-диагностики. Автором совместно с научным руководителем проведен анализ всех полученных результатов, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации. Результаты всех проведенных исследований представлены в монографии, статьях, материалах конференций, вклад соискателя составил: [1, 2, 5, 7, 15, 23,

26, 27, 28] – 25%, [8, 9, 11, 18, 19, 20, 24, 25] – 50%, [3, 4, 6, 13, 16, 29, 30] – 75%, [10, 12, 14, 17, 21, 22] – 100%.

Разработаны и утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкции по применению: «Диагностический алгоритм клинико-лабораторного обследования пациентов с ранним артритом» [31] (вклад соискателя 30%), «Алгоритм лечения пациентов с ранним артритом» [32] (вклад соискателя 20%), «Определение устойчивости к антибиотиками у штаммов *Chlamydia trachomatis*, выделенных от пациентов с хламидиоиндуцированными артропатиями» [33] (вклад соискателя 20%), «Метод определения профиля серотипа и уровня нормализованной экспрессии гена Ct604 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis*» [34] (вклад соискателя 75%).

Получено уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение «Способ выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости» [35], вклад соискателя – 80%.

Получены удостоверения на рационализаторские предложения «Способ определения серотипов С, D и К *Chlamydia trachomatis* методом мультиплексной ПЦР в реальном времени» [36] (вклад соискателя 80%), «Способ определения риска диссеминации возбудителя *Chlamydia trachomatis* из эпителиома первичного инфицирования» [37] (вклад соискателя 80%), «Способ определения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604, Ct755 хламидийного белка теплового шока» [38] (вклад соискателя 80%).

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные положения диссертационного исследования доложены и обсуждены на научной сессии Белорусского государственного медицинского университета «Эпидемиология и инфекционные болезни» (г. Минск, 2011); Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 125-летию со дня рождения профессор Б.Я.Эльбера «90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси» (г. Минск, 2015); III Евразийском конгрессе ревматологов (г. Минск, 2016); VIII съезде врачей клинико-лабораторной службы Республики Беларусь с международным участием (г. Минск, 2016); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (г. Москва, 2017); Республиканской научно-практической конференции с международным участием «V Белорусско-польская дерматологическая конференция: дерматология без границ» (г. Гродно, 2017).

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре эпидемиологии и микробиологии БелМАПО (6 актов внедрения), 3-й кафедре внутренних болезней БГМУ (1 акт) и в работу профильных учреждений здравоохранения Республики Беларусь (21 акт внедрения).

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, в том числе: 1 монография (в соавторстве), 13 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь» (общим объемом 9,25), в том числе 3 – в моноавторстве; 8 статей в сборниках научных трудов, в том числе 3 – в моноавторстве; 8 публикаций в сборниках материалов конференций и тезисов докладов. Получено 1 уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение и 3 удостоверения на рационализаторские предложения. Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждены 4 инструкции по применению.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на русском языке, состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав с результатами собственных исследований, заключения, библиографического списка и приложений. Работа изложена на 100 страницах, содержит 30 рисунков (14 страниц), 12 таблиц (6 страниц), 6 приложений (50 страниц). Библиографический список включает 168 использованных источников (47 на русском и 121 на английском языке) и список публикаций соискателя (38 печатных работ).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Результаты диссертационного исследования основаны на лабораторном обследовании 98 пациентов с РеА, у которых был установлен ассиметричный олигоартрит с локализацией поражения в суставах нижних конечностей, а в анамнезе имелись данные о перенесенных за 3-4 недели до появления болей в суставах инфекционных заболеваний мочеполовых путей (у женщин – цервицит, вагинит, воспалительные заболевания органов малого таза; у мужчин – уретрит, простатит). Клинический диагноз «реактивный артрит» устанавливали на основании клинико-anamnestических, рентгенологических и инструментальных данных. Возраст пациентов на момент обследования составил Me (Q25/75) 38 (28/49) лет. В группе исследования преобладали лица мужского пола: их удельный вес составил 62,24% (n=61), женщин – 37,76% (n=37).

Выявление ДНК возбудителя *S. trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, а также в образцах синовиальной жидкости проводилось методом ПЦР-РВ (ФБУН «ЦНИИ Э» Роспотребнадзора, РФ), а также культуральным методом (посев на культуру McCoу (НИИЭМ им. Л. Пастера, РФ)

штамм МТ-2А). Определение фенотипической устойчивости возбудителя проводили диско-диффузионным методом (НИЦ фармакотерапии, РФ), определение генотипической резистентности – методом ПЦР (НПФ «Литех», РФ). Анализ ультратонких срезов (Ultracut E («Reichert», Австрия) культур клеток McCoу проводили на микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония).

На основании результатов молекулярно-генетических исследований пациенты основной группы были разделены на три подгруппы: подгруппа Ia – 45 пациентов с РеА, у которых ДНК возбудителя *S. trachomatis* выявлялась как в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, так и в образцах синовиальной жидкости; подгруппа Ib – 27 пациентов с РеА, у которых ДНК возбудителя *S. trachomatis* выявлялась только в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта; подгруппа Ic – 26 пациентов с РеА, у которых ДНК возбудителя *S. trachomatis* не детектировалась ни в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, ни в образцах синовиальной жидкости.

Все образцы биологического материала, содержащие ДНК *S. trachomatis*, были проанализированы на наличие жизнеспособных форм микроорганизма методом Nucleic Acids Sequence-Based Amplification (амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот) NASBA-ПЦР (ФБУН «ЦНИИ Э» Роспотребнадзора, РФ), для них были установлены концентрации ДНК патогена (ФБУН «ЦНИИ Э» Роспотребнадзора, РФ), а также определена принадлежность к определенным серотипам возбудителя методом сиквенс-анализа с использованием генетического анализатора «ABI Prism» (Applied Biosystems, США).

Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, у которых в образцах соскобов эпителиальных клеток из урогенитального тракта ДНК возбудителя *S. trachomatis* выявлена не была.

В качестве биологического материала для выполнения биохимических исследований использовали сыворотку и плазму периферической крови: определяли содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ, факторов АОЗ. Методом ультрафиолетовой фотометрии (Камышников В.С., 2003) устанавливали уровень ДК₂₃₃, ДК₂₇₈ с использованием спектрофотометра «UV-VIS PB 2201 Solar» (РБ), методом фотометрии в видимой области (Камышников В.С., 2003) – уровень МДА с применением спектрофотометра «Solar PV 1251 C» (РБ). Методом фотосенсибилизированной хемилюминесценции определяли содержание АСВ и АСЛ с использованием наборов реагентов «Analytic Jena» (Германия) и анализатора антиоксидантов и свободных радикалов «РОТОСНЕМ» (Германия). В дополнение к этому методом спектрофлуориметрии (Юрага Т.М., 2014) с использованием спектрофлуориметра «Hitachi» (Япония) определяли содержание ретинола и α -токоферола, проявляющих свойства антиоксидантов.

Определение концентрации ИЛ-4, ФНО- α и неоптерина в сыворотке крови и синовиальной жидкости проводили методом иммуноферментного анализа с

использованием сертифицированных наборов реагентов «Вектор-Бест», (РФ) с помощью анализатора иммуноферментного АИФ-М/340 с программным обеспечением «Aifm» (РБ).

Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверка на нормальность проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей (Me (Q25/75)) или медианы и размаха (Me (min...max)). Для характеристики частоты изучаемых признаков использовали абсолютные и относительные (%) показатели. Для относительных показателей определяли 95% доверительный интервал (ДИ). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни (U-тест). Для определения степени сопряженности исследуемых факторов с риском диссеминации возбудителя *S. trachomatis* в полость сустава из очага первичного инфицирования использовали критерий χ^2 Пирсона. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$. Оценку предсказательной ценности предикторов и выбор их пороговых значений проводили с применением ROC-анализа с вычислением площади под кривой – AUC (area under the curve). Для сравнения исследуемых подгрупп по частоте выявления факторов риска диссеминации возбудителя в полость сустава использовали расчет отношения шансов со сведением данных в таблицу 2x2.

Результаты собственных исследований

Разработка способа выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости

Для выделения микробной ДНК образцы синовиальной жидкости в объеме 500 мкл центрифугировали при 2500 g в течение 10 минут, полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл деионизированной воды (ОДО «Праймтех», РБ), к полученной смеси добавляли 10 мкл протеиназы К (ОДО «Праймтех», РБ) в концентрации 1 мкг/мкл, тщательно перемешивали на микроцентрифуге-вортексе при 180 g в течение 10-20 с и полученную смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 10 минут, затем проводили серию отмывок: вначале с использованием фосфатно-солевого буфера (Thermo Fisher Scientific, США), а затем 75% этилового спирта (ЗАО «БелАсептика», РБ) в объеме по 500 мкл при 2500 g в течение 10 минут с последующим удалением надосадочной жидкости. К полученному таким образом осадку добавляли 5 мкл лизоцима для разрушения клеточной стенки бактерий (AppliChem, Германия) в концентрации 0,32 мкг/мкл и 5 мкл 5% ЭДТА (AppliChem, Германия), перемешивали на микроцентрифуге-вортексе при 180 g в течение 10-20 с, и инкубировали смесь при температуре 37°C в течение 20 минут [35]. Затем проводили дальнейшее выделение ДНК с использованием фенол-хлороформной экстракции, по окончании которой в

раствор вносили 10 мкл РНКазы (AppliChem, Германия), перемешивали пипетированием и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Степень чистоты выделенной микробной ДНК оценивали спектрофотометрически по соотношениям показателей оптической плотности (А) при длинах волн 260/280 и 260/230. Расчет концентрации выделенной микробной ДНК проводили по формуле $C \text{ (мкг/мл)} = A_{260} / 0,020$ [29].

Данный метод был апробирован на 98 образцах синовиальной жидкости пациентов с РеА. Степень чистоты выделенной ДНК по соотношению показателей оптической плотности 260/280 составила Me (min/max) 1,96 (1,78/2,03), по соотношению 260/230 – 1,77 (1,62/1,85). Значения концентраций выделенной ДНК составили Me (min/max) 41,65 (10,84/98,69) мкг/мл.

Факт выделения исключительно микробной ДНК в 98 образцах синовиальной жидкости пациентов с РеА подтверждали отсутствием пересечения кривых флуоресценции с пороговой линией при постановке амплификации референсного гена из числа house-keeping генов человека – human β -glucoronidase (HGUS). Установленные значения концентраций ДНК *S. trachomatis* достоверно (критерий Манна-Уитни $Z = -4,845$, $p < 0,01$) отличались при использовании разработанного метода пробоподготовки (Me (Q25/75) составило $18,21 (10,59/25,66) \times 10^3$ копий/мл) по сравнению с коммерческой тест-системой ($1,52 (1,09/2,56) \times 10^3$ копий/мл). Кроме того, в подгруппе Ia было выявлено 2 образца, которые были отрицательны при использовании для пробоподготовки коммерческой тест-системы и постановке ПЦР-РВ с качественным форматом детекции.

Усовершенствование метода мультиплексной ПЦР-РВ для одновременного выявления серотипов С, D и К *S. trachomatis*

В качестве мишени для дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов выбран ген *omp1* (outer membrane protein 1) *S. trachomatis*. Дизайн олигонуклеотидов осуществляли для каждого серотипа (С, D и К) и последовательно для каждого выбранного гомологичного участка с использованием программного приложения Primer3 v.0.4.0. Выбор серотипов обусловлен данными предыдущих исследований с использованием сиквенс-анализа, в ходе которого были выявлены указанные серотипы возбудителя, а также нуклеотидные замены в биологическом материале подгруппы пациентов с РеА, у которых микроорганизм обнаруживался в суставе.

Для серотипа С: С-прямой-5'-ATTTGCCGCTTTGAGTTCTG-3', С-обратный-5'-CGTCGATCATAAGGCTTGGT-3', С-зонд- 5'FAM-СТТССТССТТ GCAAGCTCTG-3'ВНQ1 (GenBank: AE001273, размер фрагмента 80 п.о.).

Для серотипа D: D-прямой-5'-TTGCGGTATTGCAGTAGGAA-3', D-обратный-5'-CGGAATTGTGCATTTACGTG-3', D-р-5'FAM-TGAGACTCG СТТGATCGATG-3'ВНQ1 (GenBank: AM884176, размер фрагмента 108 п.о.).

Для серотипа К: К-прямой-5'-ACTGCTTTGGATCGAGCTGT-3', К-обратный-5'-ACACCCACATTTCCAGAGAG-3', К-зонд-5'FAM-GACACCA CCTTTGCTTGGAG-3'ВНQ1 (GenBank: CP007131, размер фрагмента 93 п.о.).

Для реакции амплификации с целью усовершенствования внутреннего контроля на основании расчета значений коэффициента вариации был выбран ген HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase human 1) человека: Ис-прямой-5'-AGCGGTAACCATGCGTATTT-3', Ис-обратный-5'-CACATGTGAATTTCTG GCTTG-3', Ис-зонд-5'ROX-GAAGGAAGTAGGGAAAAGGCA-3'ВНQ2 (GenBank: NC_000023.11, размер фрагмента 79 п.о.).

Были оптимизированы параметры реакционной смеси, а также температурный профиль амплификации: +95°C – 15 минут, 40 циклов в режиме +95°C – 10 с, +60°C – 59 с. Детекцию флуоресценции проводили по каналам FAM (для серотипов С, D и К) и ROX (для гена HPRT1) [8, 11].

Для оценки диагностической значимости и клинической апробации усовершенствованного метода было исследовано 117 образцов биологического материала (соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, синовиальная жидкость) пациентов подгрупп Ia и Ib, в пробах которых методом секвенирования были выявлены серотипы С, D, и К *S. trachomatis*.

С использованием усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР-РВ установлено, что серотип С *S. trachomatis* выявлялся в 37 образцах (против 40 образцов при проведении секвенирования), серотип D – в 90 образцах (против 94 при постановке сиквенс-анализа) и серотип К – в 79 образцах (против 82 при проведении секвенирования).

Диагностическая чувствительность (ДЧ) теста выявления серотипов С, D и К *S. trachomatis* составила 94,9%, 95,7% и 96,3%, соответственно, диагностическая специфичность (ДС) – 98,7%, 92,0% и 94,6%, соответственно, предсказательная ценность положительного результата (ПЦ+) – 97,3%, 97,8% и 97,5%, соответственно, предсказательная ценность отрицательного (ПЦ-) результата – 97,5%, 85,2% и 92,1%, соответственно.

Усовершенствование метода определения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604, Ct755 белков теплового шока *S. trachomatis*

С использованием программного обеспечения Vector NTI были подобраны оригинальные пары праймеров (прямой и обратный) и TaqMan-зонды для генов Ct110, Ct604 и Ct755 белков теплового шока *S. trachomatis*. Для гена Ct110 (GenBank: AY447001.1, длина фрагмента 68 п.о.) прямой-праймер 5'-GCGAAAGAAGTTGAGCTTGC-3'; обратный-праймер 5'-CTGGCGACTTCTTTG ACCAT-3'; зонд FAM-ACATGAAAATATGGGCGCTC-ВНQ1. Для гена Ct604 (GenBank: AY447002.1, длина фрагмента 73 п.о.) прямой-праймер 5'-CTCGTATGCGATTTCGGAGAT-3'; обратный-праймер 5'-GTCATGCCCTCCGCT

ААТАА-3'; зонд FAM-GGGCAAAAACCCACAGCTTTA-BHQ1. Для гена Ct755 (GenBank: AY447003.1, длина фрагмента 76 п.о.) прямой-праймер 5'-ACTCCAAGTCTCGGCTTCAA-3'; обратный-праймер 5'-CAAAGGTGCAATGATTCCTG-3'; зонд FAM-TGTGTCTCAACAAATAGAAGACATGA-BHQ1. В качестве референсного гена использовался ген *omp1* *C. trachomatis* (GenBank: AF063200, размер фрагмента 69 п.о.): прямой-праймер 5'-GGTTTCGGCGGAGATCCT-3'; обратный-праймер 5'-AGТААССААСАСGСАТGСТGАТ-3'; зонд ROX-STTGCACCACCTTGGTGTGACGC-BHQ2.

Для гена Ct110 усовершенствованный температурный профиль амплификации был следующим: 1 этап 95°C – 15 мин., 2 этап 95°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 15 с (50 циклов). Для генов Ct604 и Ct755 усовершенствованный температурный профиль амплификации был следующим: 1 этап 95°C – 15 мин., 2 этап 95°C – 20 с, 58°C – 20 с, 72°C – 15 с (50 циклов).

Детекцию таргетных генов проводили по каналу «FAM/Green», а детекцию гена *omp1* – по каналу «ROX/Orange».

Расчет уровней нормализованной экспрессии таргетных генов проводили по формуле: % уровня экспрессии = $2^{-(CT \text{ интересующего гена} - CT \text{ гена } omp1)} \times 100\%$, где CT – пороговый цикл (cycle threshold).

Клиническая апробация усовершенствованного метода определения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604, Ct755 белков теплового шока *C. trachomatis* была проведена на 72 образцах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, полученных от пациентов подгрупп Ia и Ib.

Установлены средние значения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110 (для подгруппы Ia 192,97 (116,27/236,94) %, подгруппы Ib 117,08 (71,79/196,00) %); Ct604 (для подгруппы Ia 212,15 (134,50/238,29) %, для подгруппы Ib 51,00 (25,00/87,00) %) и Ct755 (для подгруппы Ia – 85,36 (38,74/129,35) %, для подгруппы Ib – 86,32 (56,27/125,33) %), при этом статистически достоверные различия были выявлены только относительно гена Ct604 (критерий Манна-Уитни $Z = -6,171$, $p < 0,01$).

Оценка изменений биохимических (ДК₂₃₃, ДК₂₇₈, МДА, АСW, АСL, ретинол, α-токоферол) и иммунологических (ИЛ-4, ФНО-α, неоптерин) показателей в биологическом материале пациентов с РеА

Определение содержания продуктов ПОЛ-АОЗ и иммунологических показателей проводили в биологическом материале пациентов основной (n=98) и контрольной (n=30) групп.

Наиболее выраженные нарушения в системе ПОЛ-АОЗ наблюдались в подгруппе пациентов Ia, сопровождавшиеся активацией процессов свободно-радикального окисления, ослаблением антиоксидантной защиты и развитием окислительного стресса (таблица 1).

Таблица 1. – Значения содержания продуктов ПОЛ-АОЗ в биологическом материале (сыворотке и плазме крови) пациентов обследованных групп

Показатель	Значения содержания (Ме (Q25/75))			
	Подгруппа Ia	Подгруппа Ib	Подгруппа Ic	Контрольная группа
ДК ₂₃₃ (усл.ед/мл)	4,31 (4,09/4,60)*	2,89 (2,72/3,02)*	2,06 (1,76/2,36)*	1,48 (1,36/1,56)
ДК ₂₇₈ (усл.ед/мл)	0,76 (0,73/0,80)*	0,54 (0,49/0,58)*	0,39 (0,36/0,41)*	0,29 (0,26/0,31)
МДА (мкмоль/л)	9,34 (8,86/9,84)*	7,56 (7,35/7,85)*	6,39 (5,99/6,75)*	5,44 (5,21/5,89)
Ретинол мкмоль/л	6,22 (5,88/6,58)*	8,68 (8,32/9,02)*	10,18 (9,94/10,59)*	12,57 (12,28/12,86)
α-токоферол мкмоль/л	0,63 (0,42/0,76)*	0,88 (0,75/0,98)*	1,13 (0,98/1,23)*	1,40 (1,28/1,46)
АСЛ мкмоль/л	6,54 (6,26/7,24)*	9,62 (9,34/9,84)*	12,99 (12,62/13,38)*	16,51 (16,20/16,78)
АСW мкмоль/л	4,93 (4,73/5,10)*	7,65 (7,40/7,85)*	9,07 (8,93/9,28)*	10,93 (10,68/11,28)

Примечание – * – $p < 0,05$, в сравнении с показателями контрольной группы (критерий Манна-Уитни)

В сыворотке крови пациентов подгруппы Ia выявлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение синтеза ИЛ-4 (18,47 (18,30/18,84) нг/л), неоптерина (12,37 (11,36/13,01) нмоль/л), а также угнетение синтеза ФНО-α (1,90 (1,72/2,19) нг/л) по сравнению с контрольной группой (5,90 (5,33/6,15) нг/л, 3,82 (3,30/4,53) нмоль/л и 5,58 (4,74/6,34) нг/л соответственно). Анализ синовиальной жидкости по исследуемым показателям показал наличие достоверных различий в подгруппах Ia-Ib, и Ia-Ic, тогда как в подгруппах Ib-Ic достоверные различия установлены не были. Усиление продукции ИЛ-4 приводит к увеличению содержания В-клеток и соответственно увеличению содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови, что, в свою очередь, способствует уменьшению вирусной нагрузки, снижению концентрации ДНК возбудителя в очаге первичного инфицирования, и как следствие, приводит к отсутствию адекватной стимуляции продукции ФНО-α и несостоятельности иммунного ответа против *S. trachomatis*.

С использованием критерия независимости χ^2 установлена взаимосвязь между биохимическими (ДК₂₇₈, ДК₂₃₃, МДА, ретинол, АСЛ, АСW), иммунологическими показателями (неоптерин в синовиальной жидкости) и серотипом *S. trachomatis* ($p < 0,05$). Выявлена значимая положительная корреляция между биохимическими (ретинол, АСЛ, АСW), иммунологическими (ИЛ-4, неоптерин в сыворотке крови) показателями и концентрацией ДНК *S. trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, а также между содержанием неоптерина в синовиальной жидкости и концентрацией ДНК *S. trachomatis* в синовиальной жидкости ($p < 0,05$).

Молекулярно-генетические факторы риска диссеминации *Chlamydia trachomatis* из места первичного инфицирования (урогенитальный тракт)

В данное исследование было включено 72 пациента подгрупп Ia и Ib, в биологическом материале которых *C. trachomatis* присутствовала в жизнеспособном состоянии (при проведении NASBA-ПЦР была выявлена р-РНК возбудителя).

Установлено, что молекулярно-генетическими факторами риска диссеминации *C. trachomatis* из уrogenитального тракта в полость сустава являются: концентрация ДНК возбудителя, принадлежность к определенному серотипу (серотипный профиль), а также уровень нормализованной экспрессии гена St604 белка теплового шока возбудителя (таблица 2).

Таблица 2. – Молекулярно-генетические факторы риска диссеминации *C. trachomatis* из очага первичного инфицирования

Параметр	Концентрация <i>C. trachomatis</i> , копий ДНК/мл	Серотип	Нормализованная экспрессия гена St604
ROC-анализ	менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл (AUC= 0,938 (95% ДИ 0,291-0,985), p<0,001)	-	более 100% (AUC=0,925 (95% ДИ 0,320-0,987), p<0,001)
Относительный риск	ОР=11,100 (95% ДИ 2,905-42,413), p<0,05	ОР=13,200 (95% ДИ 3,476-50,127), p<0,05	ОР=5,700 (95% ДИ 2,287-14,205), p<0,05
Критерий χ^2 с поправкой Йейтса	35,092 p<0,001 статистически достоверная значимость различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска	55,882 p<0,001 статистически достоверная значимость различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска	30,857 p<0,001 статистически достоверная значимость различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска
ДЧ, %	82,22	97,78	84,40
ДС, %	92,59	92,59	85,18
ПЦ+, %	94,87	95,65	90,48
ПЦ-, %	75,76	96,15	76,67

С использованием методов статистического анализа установлены пороговые значения количественных показателей, отношения шансов для каждого из параметров, а также показатели диагностической надежности тестов.

Установлено, что при выявлении в соскобе эпителиальных клеток из уrogenитального тракта *C. trachomatis* в концентрации менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл риск диссеминации в полость сустава возрастает в 11 раз; при ассоциациях серотипов риск увеличивается в 13 раз; а превышение 100%-го уровня нормализованной экспрессии гена St604 белка теплового шока *C. trachomatis* сопровождается увеличением риска диссеминации патогена более чем в 5 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Возбудитель *C. trachomatis*, выявляемый в полости сустава с использованием разработанного способа выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости, диссеминирует из очага первичного инфицирования в жизнеспособной форме и является идентичным возбудителю, инфицирующему урогенитальный тракт, с аналогичными показателями фено- и генотипической резистентности, и сохранением ультраструктурных характеристик штамма [1, 2, 4, 6, 7, 15, 16, 23, 26, 28, 29, 33, 35].

2. Проведенный сиквенс-анализ региона, включающего вариабельные домены VDI-VDIV *omp1* гена *C. trachomatis*, позволил установить преимущественное превалирование серотипов С, D и К возбудителя, при этом для подгруппы пациентов, у которых патоген выявлялся только в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, выявленные серотипы D и К были представлены в моно-состоянии, и имели 100% гомологию со стандартными геновариантами, зарегистрированными в GeneBank. В образцах соскобов эпителиальных клеток пациентов, у которых возбудитель одновременно детектировался и в синовиальной жидкости, серотипы были выявлены в виде ассоциаций D+K (55,55%), D+C (n=24,44%), K+C (20,00%) и с наличием нуклеотидных замен [3, 10, 24].

3. Усовершенствование с использованием подобранных специфичных праймеров и зондов метода мультиплексной ПЦР-РВ для выявления серотипов С, D и К *C. trachomatis* позволило повысить диагностическую надежность исследований, допуская возможность одновременной детекции ДНК каждого из серотипов и ДНК гена человека *HPRT1*, используемого в качестве внутреннего контроля: для серотипа С ДЧ составила 94,9%, ДС – 98,7%, ПЦ+ 97,3%, ПЦ- 97,5%; для серотипа D ДЧ составила 95,7%, ДС – 92,0%, ПЦ+ 97,8%, ПЦ- 85,2%; для серотипа К ДЧ составила 96,3%, ДС – 94,6%, ПЦ+ 97,5%, ПЦ- 92,1% [9, 13, 34, 36].

4. С применением усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР-РВ для определения уровней нормализованной (относительно *omp1* гена *C. trachomatis*) экспрессии генов *Ct110*, *Ct604* и *Ct755* белка теплового шока установлены статистически значимые различия по уровням экспрессии гена *Ct604* в зависимости от наличия/отсутствия указанного патогена в полости сустава: Me (Q25/75) составило 212,15 (134,50/238,29) % для подгруппы пациентов, у которых возбудитель детектировался одновременно в биологическом материале из урогенитального тракта и в синовиальной жидкости, и 51,00 (25,00/87,00) % для подгруппы пациентов, у которых возбудитель выявлялся только в урогенитальном тракте [11, 12, 20, 21, 25, 30, 34, 38].

5. Диссеминация *C. trachomatis* из урогенитального тракта в полость сустава при реактивном артрите характеризуется иммунологическим дисбалансом, сопровождающимся достоверным увеличением содержания ИЛ-4 и неоптерина в сыворотке крови (18,47 (18,30/18,84) нг/л и 12,37 (11,36/13,01) нмоль/л, соответственно) и синовиальной жидкости (11,12 (9,13/13,59) нг/л и 184,11 (181,33/188,95) нмоль/л соответственно), снижением содержания ФНО- α (1,90 (1,72/2,19) нг/л в сыворотке крови и 123,01 (110,17/126,39) нг/л в синовиальной жидкости, соответственно). Данный дисбаланс, отражающий несостоятельность иммунного ответа в очаге первичного инфицирования *C. trachomatis*, создает благоприятные условия для его диссеминации в полость сустава, а увеличение содержания неоптерина как в сыворотке крови, так и в синовиальной жидкости может являться маркером прогрессирования и хронизации патологического процесса.

Наиболее выраженные изменения показателей системы ПОЛ-АОЗ наблюдаются в подгруппе пациентов с РеА при наличии возбудителя как в очаге первичного инфицирования, так и в полости сустава. С использованием критерия χ^2 выявлена взаимосвязь между биохимическими показателями ДК₂₃₃, ДК₂₇₈, МДА, ретинол, ACL, ACW и серотипом в урогенитальном тракте ($p < 0,05$), рассчитанные значения r_s указывают на значимую положительную корреляцию между переменными ретинол ($r_s = 0,646$), ACL ($r_s = 0,685$), ACW ($r_s = 0,667$) и концентрацией ДНК в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта и значимую отрицательную корреляцию между переменными ДК₂₇₈ ($r_s = -0,578$), ДК₂₃₃ ($r_s = -0,601$), МДА ($r_s = -0,600$) и концентрацией ДНК в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта [8, 9, 17, 18, 19, 31, 32].

6. Установлены молекулярно-генетические факторы риска диссеминации возбудителя *C. trachomatis* из урогенитального тракта в полость сустава: пороговая концентрация ДНК *C. trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток урогенитального тракта менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл (установление более низких значений отражает увеличение риска диссеминации возбудителя в 11 раз); выявление серотипов *C. trachomatis* в виде ассоциаций (риск диссеминации увеличивается в 13 раз); уровень нормализованной экспрессии гена St604 белка теплового шока *C. trachomatis* (превышение 100%-го уровня экспрессии приводит к увеличению риска инфицирования полости сустава более чем в 5 раз) [5, 8, 14, 22, 27, 37].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Разработанный способ выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости рекомендуется к использованию в клиничко-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения ревматологического профиля для повышения качества пробоподготовки биологического материала за счет выделения ДНК только микроорганизмов, потенциально колонизирующих полость сустава [35].

2. Для повышения качества и эффективности диагностики, лечения и мониторинга течения РеА, ассоциированного с *C. trachomatis*, а также оценки риска диссеминации возбудителя из очага первичного инфицирования (урогенитальный тракт) в полость сустава, рекомендуется проводить исследование синовиальной жидкости на наличие ДНК *C. trachomatis* с последующим выявлением маркеров жизнеспособности (p-РНК) возбудителя методом NASBA-ПЦР [31, 32, 33].

3. Усовершенствованный метод мультиплексной ПЦР-РВ для определения серотипов С, D и К *C. trachomatis*, обладающий высокими показателями диагностической надежности, рекомендуется к использованию в клиничко-диагностических лабораториях без проведения дополнительных подтверждающих тестов. Общий экономический эффект в рамках среднегодовой потребности в Республике Беларусь составляет 4 830 000 рублей, что свидетельствует о высокой экономической эффективности усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР-РВ для выявления серотипов С, D и К *C. trachomatis* [34, 36].

4. Для оценки риска диссеминации возбудителя *C. trachomatis* из очага первичного инфицирования (урогенитальный тракт) в полость сустава рекомендуется использование следующих молекулярно-генетических критериев: концентрация ДНК возбудителя в соскобах эпителиальных клеток из уrogenитального тракта менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл, инфицирование уrogenитального тракта одновременно несколькими серотипами, а также уровень нормализованной экспрессии гена St604 белка теплового шока *C. trachomatis* более 100% [34, 37, 38].

Список публикаций соискателя

Монография:

1. Костюк, С. А. Теоретические и прикладные вопросы применения методов анализа нуклеиновых кислот: монография / С. А. Костюк, Н. Д. Коломиец, Т. В. Руденкова, О. С. Полуян – Минск: БелМАПО, 2014. – 272 с.

Статьи в журналах:

2. Генетическая резистентность *Chlamydia trachomatis* к тетрациклинам, макролидам и фторхинолонам / С. А. Костюк, О. К. Кулага, Г. М. Костин, О. С. Полуян, Н. Н. Полещук // Рецепт. – 2006. – № 6. – С. 41-46.

3. Изучение распределения различных серотипов *Chlamydia trachomatis* и молекулярно-генетических свойств возбудителей / О. С. Полуян, С. А. Костюк, Н. Д. Коломиец, Н. Н. Полещук, Т. В. Руденкова // Медицинские новости. – 2009. – № 8. – С. 82-86.

4. Полуян, О. С. Генетические маркеры жизнеспособности *Chlamydia trachomatis* при артропатиях / О. С. Полуян, С. А. Костюк, Н. А. Мартусевич // Медицинские новости. – 2010. – № 9. – С. 96-100.

5. Влияет ли персистенция *Chlamydia trachomatis* в полости суставов на темпы рентгенологического прогрессирования у пациентов с ранним ревматоидным артритом / Н. А. Мартусевич, С. А. Костюк, О. С. Полуян, В. С. Камышников, В. А. Сидоренко // Лечебное дело. – 2011. – №3. – С. 27-34.

6. Полуян, О.С. Реакция транскрипционной амплификации как новый этап в развитии технологий клиничко-лабораторного молекулярно-биологического исследования / О. С. Полуян, С. А. Костюк, Т. В. Глинкина // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 3. – С. 119-123.

7. Фено- и генотипическая устойчивость *Chlamydia trachomatis* к антибиотикам у пациентов с хламидиоиндуцированными артропатиями / Л. В. Рубаник, Н. Н. Полещук, Н. Ф. Сорока, И. А. Варонько, Д. А. Дейкун, А. Н. Асташонок, С. А. Костюк, О. С. Полуян // Здравоохранение. – 2011. – № 12. – С. 51-55.

8. Костюк, С. А. Молекулярные основы персистенции хламидий / С. А. Костюк, О. С. Полуян // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2012. – № 1. – С. 109-115.

9. Костюк, С. А. Молекулярно-генетические методы в диагностике генетических факторов предрасположенности к ревматическим заболеваниям / С. А. Костюк, О. С. Полуян, Н. Ф. Сорока // Новости медико-биологических наук. – 2016. – Т. 14, № 3. – С. 51-57.

10. Полуян, О. С. Особенности серотипного профиля *Chlamydia trachomatis* у пациентов с воспалительными заболеваниями суставов / О. С. Полуян // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016. – № 4. – С. 534-541.

11. Костюк, С. А. Новое диагностическое направление в ревматологии: оценка профиля генной экспрессии / С. А. Костюк, О. С. Полуян // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016. – № 4. – С. 574-580.

12. Полуян, О. С. Усовершенствование метода определения уровней нормализованной экспрессии генов белков теплового шока *Chlamydia trachomatis* для оценки риска диссеминации возбудителя из урогенитального тракта / О. С. Полуян // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – №3. – С. 333-342.

13. Полуян, О. С. Усовершенствование и валидация метода определения серотипов С, D, К возбудителя *Chlamydia trachomatis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени / О. С. Полуян, С. А. Костюк // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – №3. – С. 351-359.

14. Полуян, О. С. Молекулярно-генетические факторы риска диссеминации *Chlamydia trachomatis* из урогенитального тракта в полость сустава при реактивном артрите / О. С. Полуян // Медицинский журнал. – 2017. – №3 (61). – С. 128-133.

Статьи в сборниках научных трудов:

15. Анализ фено- и генотипической устойчивости к антибиотикам *Chlamydia trachomatis*, выделенных от пациентов с хламидия-индуцированными артропатиями / Л. В. Рубаник, Н. Н. Полещук, Н. Н. Капитулец, Д. А. Дейкун, А. Н. Асташонок, С. А. Костюк, О. С. Полуян, Н. Ф. Сорока // «Современные проблемы инфекционной патологии человека»: сб. науч. тр. – Минск, 2010. – Вып. 3. – С. 387-392.

16. Полуян, О. С. Определение генетических маркеров жизнеспособности *Chlamydia trachomatis* в биологическом материале пациентов с артропатиями методом транскрипционной амплификации в режиме реального времени / О. С. Полуян, С. А. Костюк, Н. А. Мартусевич // «Современные проблемы инфекционной патологии человека»: сб. науч. тр. – Минск, 2010. – Вып. 3. – С. 505-509.

17. Полуян, О. С. Иммунологические маркеры лабораторной диагностики раннего ревматоидного артрита / О. С. Полуян // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. посвящ. 20-летию Гомел. гос. мед. ун-та, (Гомель, 24-25 февраля 2011 года): в 4 т. / УО Гомельский государственный медицинский университет; ред. колл.: А. Н. Лызикив [и др.]. – Гомель, 2011. – Т.: 3. – С. 178-181.

18. Полуян, О. С. Диагностические критерии развития и течения воспалительных и невоспалительных заболеваний суставов / О. С. Полуян, С. А. Костюк // «Современные проблемы инфекционной патологии человека»: сб. науч. тр. – Минск, 2012. – Вып. 5. – С. 281-288.

19. Полуян, О. С. Изучение отдельных биохимических показателей при воспалительных и невоспалительных заболеваниях суставов / О. С. Полуян, С. А.

Костюк, Т. М. Юрага // «Современные проблемы инфекционной патологии человека»: сб. науч. тр. – Минск, 2015. – Вып. 8. – С. 134-139.

20. Костюк, С. А. Оценка профиля генной экспрессии в ревматологии / С. А. Костюк, О. С. Полуян, В. В. Смирский // «Молекулярная диагностика 2017»: сб. науч. тр. – Москва, 2017. – Том II. – С. 69-70.

21. Полуян, О. С. Определение уровней экспрессии генов Ct 110, Ct604 и Ct755 белков теплового шока *Chlamydia trachomatis* при воспалительных заболеваниях суставов / О. С. Полуян // «Молекулярная диагностика 2017»: сб. науч. тр. – Москва, 2017. – Том II. – С. 339-341.

22. Полуян, О. С. Установление зависимости между уровнем концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* в урогенитальном тракте и диссеминацией возбудителя в полость сустава при воспалительных артропатиях / О. С. Полуян // «Молекулярная диагностика 2017»: сб. науч. тр. – Москва, 2017. – Том II. – С. 341-342.

Тезисы докладов:

23. Генетическая резистентность *Chlamydia trachomatis* к антибактериальным препаратам / С. А. Костюк, О. К. Кулага, Н. Н. Полещук, О. С. Полуян, Д. Ф. Хворик // Материалы Республиканской научно-практической конференции «Профилактика и лечение госпитальных инфекций. Резистентность микроорганизмов к химиопрепаратам». – Минск, 2006. – С. 152-158.

24. Новые возможности молекулярной диагностики хламидия-индуцированных артритов / С.А. Костюк, О. С. Полуян, Н. Ф. Сорока, Н. А. Мартусевич // Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика инфекционных болезней». – Минск, 2007. – С. 65-66.

25. Костюк, С. А. Изучение взаимосвязи белков теплового шока и персистенции *Chlamydia trachomatis* при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта / С. А. Костюк, О. С. Полуян, Д. Ф. Хворик // Вирусные инфекции: эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и профилактика : материалы междунар. науч. -практ. конф. - Минск, 2007. – С. 183-186.

26. Мартусевич, Н. А. Можно ли повлиять на исходы недифференцированного артрита / Н. А. Мартусевич, С. А. Костюк, О. С. Полуян // Український ревматологічний журнал (спеціальний випуск). IV національний конгресс ревматологів України. Тези наукових доповідей. – Київ, 2009. – С. 65-67.

27. Оценка эффективности фармакотерапии у пациентов с недифференцированным артритом с учетом наличия факторов неблагоприятного прогрессирования / Н. А. Мартусевич, В. С. Камышников, С. А. Костюк, О. С. Полуян // Сборник материалов Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы специализированной медицинской помощи, новые направления в медицине». – 2010. – С. 465-467.

28. Оценка эффективности стандартной базисной терапии у пациентов с ранним ревматоидным артритом в зависимости от наличия артритогенных факторов микробной этиологии / Н. А. Мартусевич, В. С. Камышников, С. А. Костюк, О. С. Полуян, Т. А. Смирнова // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Клинической фармакологии в Республике Беларусь – 25 лет». – Минск, 2010. – С. 138-140.

29. Полуян, О. С. Методика выделения ДНК из биоптатов синовиальной жидкости / О. С. Полуян, С. А. Костюк // Сборник «Актуальные вопросы медицинской науки и практики: к 80-летию Белорусской медицинской академии последипломного образования» – Минск, 2011. – ARSmedica. – 2011. – № 14. – С. 314-316.

30. Полуян, О. С. Фактор риска диссеминации *Chlamydia trachomatis* из урогенитального тракта: уровни нормализованной экспрессии генов белков теплового шока возбудителя // О. С. Полуян, С. А. Костюк // Сборник материалов Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Дерматология без границ». – Гродно, 2017. – С. 159-162.

Инструкции по применению:

31. Диагностический алгоритм клинико-лабораторного обследования пациентов с ранним артритом : инструкция по применению № 468-1110 : утв. М-вом здравоохранения Рес. Беларусь 29.12.2010г. / сост. Н. А. Мартусевич, С. А. Костюк, О. С. Полуян, Л. А. Васильева, Е. П. Деткович, В. А. Сидоренко. – Минск, 2010. – 12 с.

32. Алгоритм лечения пациентов с ранним артритом : инструкция по применению № 467-1110 : утв. М-вом здравоохранения Рес. Беларусь 29.12.2010г. / сост. Н. А. Мартусевич, С. А. Костюк, О. С. Полуян, Л. А. Васильева, Е. П. Деткович, В. А. Сидоренко. – Минск, 2010. – 13 с.

33. Определение устойчивости к антибиотикам у штаммов *Chlamydia trachomatis*, выделенных от пациентов с хламидиоиндуцированными артропатиями : инструкция по применению № 001-0111 : утв. М-вом здравоохранения Рес. Беларусь 11.04.2011г. / сост. Н. Н. Полещук, Л. В. Рубаник, Г. М. Игнатъев, Н. Ф. Сорока, И. А. Варонько, С. А. Костюк, О. С. Полуян. – Минск, 2010. – 13 с.

34. Костюк, С. А. Метод определения профиля серотипа и уровня нормализованной экспрессии гена *St604* белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* : инструкция по применению № 100-1117 : утв. М-вом здравоохранения Рес. Беларусь 01.12.2017г. / сост. С. А. Костюк, О. С. Полуян, Н. Ф. Сорока. – Минск, 2017. – 9 с.

Прочее:

35. Способ выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости / О. С. Полуян, С. А. Костюк ; заявители: О. С. Полуян, С. А. Костюк. – Уведомление о

положительном результате предварительной экспертизы по заявке № а20160371 от 13.10.2016г. на выдачу патента на изобретение.

36. Способ определения серотипов С, D и K *Chlamydia trachomatis* методом мультиплексной ПЦР в реальном времени : рационализаторское предложение № 130/23 : утв. ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» 30.11.2017 / О. С. Полуян, С. А. Костюк.

37. Способ определения риска диссеминации возбудителя *Chlamydia trachomatis* из очага первичного инфицирования : рационализаторское предложение № 131/24 : утв. ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» 30.11.2017 / О. С. Полуян, С. А. Костюк.

38. Способ определения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604, Ct755 хламидийного белка теплового шока : рационализаторское предложение № 132/25 : утв. ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» 30.11.2017 / О. С. Полуян, С. А. Костюк.

РЭЗІЮМЭ

Палуян Вольга Сяргееўна

Малекулярна-генетычная дыягностыка і крытэрыі прагназавання дысемінацыі *Chlamydia trachomatis* у пустоціну сустава пры рэактыўным артрыце

Ключавыя словы: рэактыўны артрыт, *Chlamydia trachomatis*, сератыпы, бялок цеплавога шоку *Chlamydia trachomatis*, біяхімічныя і імуналагічныя маркеры, фактары рызыкі дысемінацыі.

Мэта даследавання: на аснове выкарыстання малекулярна-генетычных метадаў усталяваць малекулярна-генетычныя фактары рызыкі дысемінацыі ўзбуджальніка *C. trachomatis* з ачага першаснага інфекцыявання (урагенітальны тракт) у пустоціну сустава пры рэактыўным артрыце, асацыяваным з *C. trachomatis*; ацаніць асаблівасці імуназапаленчых і метабалічных змяненняў у пацыентаў.

Метады даследвання і выкарыстаная апаратура: малекулярна-генетычныя, біяхімічныя, імуналагічныя, статыстычныя; ампліфікатар «Rotor-Gene 6000» («Corbett research», Аўстралія), аналізатар «ABI Prism» (Applied Biosystems, ЗША), спектрафатометр «UV-VIS РВ 2201 Solar» (РБ), аналізатар «РОТОСНЕМ» (Германія), аналізатар АІФ-М/340 (РБ).

Атрыманыя вынікі і іх навуковая навізна: распрацаваны спосаб вылучэння мікробнай ДНК з сінавіяльнай вадкасці дазваляе атрымаць «чысты» прэпарат, што змяшчае толькі вылучаную ДНК мікраарганізмаў, што каланізуюць пустоціну сустава. Удасканалены метады мультыплекснай ПЛР у рэжыме рэальнага часу для выяўлення сератыпаў С, D і К *C. trachomatis*. Удасканалены метады мультыплекснай ПЛР у рэжыме рэальнага часу для вызначэння ўзроўня нармалізаванай экспрэсіі генаў Ct110, Ct604 Ct755 бялку цеплавога шоку *C. trachomatis*. Усталяваны змены лабараторных паказчыкаў, што адлюстроўваюць дысбаланс біяхімічных і імуналагічных працэсаў пры хламідыя-асацыяваным рэактыўным артрыце. Устаноўлены малекулярна-генетычныя фактары рызыкі дысемінацыі ўзбуджальніка *C. trachomatis* з ачага першаснага інфекцыявання ў пустоціну сустава.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: Дзеля ўсталявання сератыпа *C. trachomatis*, а таксама вызначэння ўзроўня нармалізаванай экспрэсіі генаў Ct110, Ct604 Ct755 бялку цеплавога шоку *C. trachomatis* рэкамендуецца ўжываць метады мультыплекснай ПЛР у рэальным часе. Для ўсталявання рызыкі дысемінацыі ўзбуджальніка з ачага першаснага інфекцыявання рэкамендуецца вызначаць канцэнтрацыю ДНК *C. trachomatis*, сератып узбуджальніка, а таксама ўзровень нармалізаванай экспрэсіі гена Ct604 бялку цеплавога шоку *C. trachomatis*.

Галіна ўжывання: клінічная лабараторная дыягностыка, рэўматалогія.

РЕЗЮМЕ

Полуян Ольга Сергеевна

Молекулярно-генетическая диагностика и критерии прогнозирования диссеминации *Chlamydia trachomatis* в полость сустава при реактивном артрите

Ключевые слова: реактивный артрит, *Chlamydia trachomatis*, серотипы, белок теплового шока *Chlamydia trachomatis*, биохимические и иммунологические маркеры, факторы риска диссеминации.

Цель исследования: на основании использования молекулярно-генетических методов установить молекулярно-генетические факторы риска диссеминации возбудителя *C. trachomatis* из очага первичного инфицирования (урогенитальный тракт) в полость сустава при реактивном артрите, ассоциированном с *C. trachomatis*; оценить особенности иммуновоспалительных и метаболических изменений у пациентов.

Методы исследования и использованная аппаратура: молекулярно-генетические, биохимические, иммунологические, статистические; амплификатор «Rotor-Gene 6000» («Corbett research», Австралия), анализатор «ABI Prism» (Applied Biosystems, США), спектрофотометр «UV-VIS PB 2201 Solar» (РБ), анализатор «РОТОСНЕМ» (Германия), анализатор АИФ-М/340 (РБ).

Полученные результаты и их научная новизна: разработанный способ выделения микробной ДНК из синовиальной жидкости позволяет получить «чистый» препарат, содержащий только выделенную ДНК микроорганизмов, потенциально колонизирующих полость сустава. Усовершенствован метод мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для выявления серотипов С, D и К *C. trachomatis*. Усовершенствован метод мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для определения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604 Ct755 белка теплового шока *C. trachomatis*. Установлены изменения лабораторных показателей, отражающих дисбаланс биохимических и иммунологических процессов при хламидия-ассоциированном реактивном артрите. Установлены молекулярно-генетические факторы риска диссеминации возбудителя *C. trachomatis* из очага первичного инфицирования в полость сустава.

Рекомендации по использованию: С целью выявления серотипа *C. trachomatis*, а также определения уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604 Ct755 белка теплового шока *C. trachomatis* рекомендуется использовать метод мультиплексной ПЦР-РВ. Для установления риска диссеминации возбудителя из очага первичного инфицирования рекомендуется определять концентрацию ДНК *C. trachomatis*, серотип возбудителя, а также уровень нормализованной экспрессии гена Ct604 белка теплового шока *C. trachomatis*.

Область применения: клиническая лабораторная диагностика, ревматология.

SUMMARY

Poluyan Olga Sergeevna

Molecular-genetic diagnostics and prediction criteria for *Chlamydia trachomatis* dissemination into the joint cavity in reactive arthritis

Keywords: reactive arthritis, *Chlamydia trachomatis*, serotypes, *Chlamydia trachomatis* heat shock protein, biochemical and immunological markers, dissemination risk factors.

Objective: on the basis of molecular-genetic diagnostics methods to establish molecular-genetic risk factors for *C. trachomatis* dissemination from the primary infection site (urogenital tract) into the joint cavity in reactive arthritis associated with *C. trachomatis*; to evaluate the features of immune-inflammatory and metabolic changes in these patients.

Methods of research and used equipment: molecular-genetic, biochemical, immunological, statistics; «Rotor-Gene 6000» («Corbett research», Australia), analyzer «ABI Prism» (Applied Biosystems, USA), spectrophotometer «UV-VIS PB 2201 Solar» (Republic of Belarus), analyzer «POTOCHEM» (Germany), analyzer AIF-M/340 (Republic of Belarus).

Results and their novelty: the developed method of microbial DNA extraction from synovial fluid allows to receive the «pure» exemplar containing only the selected DNA of the microorganisms which are colonizing a joint cavity. The method of multiplex real time PCR for identification of *C. trachomatis* C, D and K serotypes was improved. The method of multiplex real time PCR for determination of the Ct110, Ct604 Ct755 *C. trachomatis* heat shock protein genes normalized expression levels was improved. Changes of the laboratory indexes reflecting an imbalance of biochemical and immunologic processes at a chlamydia-associated reactive arthritis are set. Molecular-genetic risk factors of *C. trachomatis* dissemination from epitope of primary infection into the joint cavity are established.

Recommendations for the use of the results: Multiplex real time PCR is recommended for the purpose of *C. trachomatis* serotype establishment and also Ct110, Ct604 Ct755 *C. trachomatis* heat shock protein genes normalized expression levels determination. For establishment of microorganism dissemination risk from primary infection site it is recommended to define *C. trachomatis* DNA concentration, the pathogen's serotype and Ct604 *C. trachomatis* heat shock protein genes normalized expression levels.

Field of application: clinical laboratory diagnostics, rheumatology.