

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА
ДИССЕМИНАЦИИ CHLAMYDIA TRACHOMATIS
ИЗ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА В ПОЛОСТЬ СУСТАВА
ПРИ РЕАКТИВНОМ АРТРИТЕ**

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Целью настоящего исследования явилось установление молекулярных факторов диссеминации возбудителя Chlamydia trachomatis из места первичного инфицирования (т. е. урогенитального тракта) в полость сустава в группе пациентов с реактивным артритом. Группу исследования составили 72 пациента с реактивным артритом, у которых методом

ПЦР была выявлена ДНК *Chlamydia trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта. В ходе проведения молекулярно-биологических исследований были проанализированы такие характеристики *Chlamydia trachomatis* как концентрация ДНК микроорганизма в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, серотипный профиль возбудителя, а также уровни нормализованной экспрессии белков теплового шока указанного патогена. При проведении статистической обработки полученных результатов молекулярно-биологических исследований было установлено, что концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в соскобном материале эпителиальных клеток из урогенитального тракта менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл, микст-серотипный профиль инфицирования, а также превышение 100% уровня нормализованной экспрессии гена *Ct604 cHSP* являются риск-факторами диссеминации возбудителя *Chlamydia trachomatis* в полость сустава из эпитопа первичного инфицирования.

Ключевые слова: реактивный артрит, концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis*, серотипный профиль, экспрессия генов белков теплового шока хламидий, риск диссеминации в сустав.

O. S. Poluyan

MOLECULAR-BIOLOGICAL RISK FACTORS OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS DISSEMINATION FROM THE UROGENITAL TRACT INTO THE JOINT CAVITY IN PATIENTS WITH REACTIVE ARTHRITIS

The purpose of this study was to determine molecular factors of dissemination of the pathogen Chlamydia trachomatis from the place of primary infection (i.e., urogenital tract) into the joint cavity in the group of patients with reactive arthritis. The study group consisted of 72 patients with reactive arthritis, in which Chlamydia trachomatis DNA was detected by PCR in urogenital tract epithelial cells swabs. In the course of conducting molecular biological studies there were analyzed such characteristics as Chlamydia trachomatis DNA concentrations of the organism in urogenital tract epithelial cells swabs, pathogen serotype profile, as well as the normalized expression levels of heat shock proteins of the indicated pathogen. Carried out statistical analysis of the obtained molecular biological studies results allowed to determine that the Chlamydia trachomatis DNA concentration in urogenital tract epithelial cells swabs less than 5.2×10^3 copies/ml, mixed serotype profile, and Ct604 cHSP overexpression more than 100% are established as the risk factors of Chlamydia trachomatis dissemination in the joint cavity from the primary infection epitope.

Keywords: reactive arthritis, Chlamydia trachomatis DNA concentration, serotype profile, chlamydia heat shock proteins gene expression, dissemination risk into the joint.

Урогенитальный хламидиоз – инфекционное заболевание, вызываемое хламидиями, передающееся преимущественно половым путем, поражающее урогенитальный тракт и другие органы. Распространенность хламидиоза в популяции неоднородна: либерализация сексуальных отношений, ранний возраст начала половой жизни, низкая культура использования барьерных средств контрацепции, а также слабовыраженная симптоматика течения заболевания и высокая склонность к хронизации инфекционного процесса способствуют увеличению числа инфицированных хламидиозом пациентов [5]. По последним данным, доля хламидийной инфекции в общем спектре урогенитальных инфекций составляет 3–30%. Частота выявления хламидий у гинекологических пациентов – от 20 до 40%. При скрининговом популяционном обследовании хламидии обнаруживают у 5–10% сексуально активных людей репродуктивного возраста. Отсутствие или стертость

клинических симптомов заболевания является характерным признаком хламидийной инфекции и не свидетельствует об отсутствии патогенного влияния хламидий на организм [3].

Chlamydia trachomatis – общепризнанный и наиболее частый триггерный агент развития артритов. Реактивный артрит развивается в 10–15% случаев, ревматоидный – в 10% случаев верифицированной урогенитальной хламидийной инфекции [5].

Инфекционные элементарные тельца *Chlamydia trachomatis* способны фагоцитироваться моноцитарными клетками периферической крови и диссеминировать в суставы. По определению Американской ревматологической ассоциации, «урогенный артрит – это эпизод периферического артрита длительностью более 1 месяца, ассоциирующегося с уретритом и цервицитом». При этом жизнеспособные формы возбудителя детектируются в синовиальной жидкости, что позволяет говорить о возможности длительной пер-

■ Оригинальные научные публикации

систенции живого, но в значительной мере измененного микроорганизма в очаге суставного поражения. Сохранение хламидий в полости суставов отчасти объясняют их резистентностью (в отличие от кишечных патогенов) к бактерицидному действию синовиальной жидкости [1].

Термин «диссеминация» достаточно прост для понимания, в то время как для хламидийной диссеминации существует несколько абсолютно разных методологических подходов в различных вариантах, что делает сопоставление полученных результатов крайне сложным для понимания. Данные вариации включают инфекционность родов и видов хламидий, принадлежность клеток организма-хозяина к тому или иному виду, индукцию персистенции *in vitro*, а также время после инфицирования культуры, выбранное для проведения анализа. Но, несмотря на эту комплексность, на данный момент существует ряд общих точек соприкосновения в области молекулярных исследований.

Патогенностью, или болезнетворностью, принято определять потенциальную способность микроорганизма определенного вида вызывать инфекционный процесс. При этом степень (меру) патогенности называют вирулентностью. Это уже не общеизвестное свойство, а индивидуальная особенность конкретного штамма возбудителя, характеризующая фенотипическое выражение патогенности. Вирулентность измеряется условно принятыми единицами – минимальной смертельной (DLM) и инфицирующей (DIM) дозами. Они равны наименьшему количеству микробов, которые при определенном способе инфицирования вызывают гибель (или заболевание при DIM) в 95–100% случаев. Таким образом, концентрация возбудителя является одним из ключевых факторов развития инфекционного процесса [1].

У *Chlamydia trachomatis* выделяют 15 различных серотипов, деление на которые основано на их антигенной реактивности со специфическими моноклональными антителами. Разделение *Chlamydia trachomatis* на серотипы основано на нуклеотидной последовательности *omp1* гена, который кодирует главный наружный мембранный протеин (major outer membrane protein – MOMP). Серотип определяет инфекционность возбудителя, которая измеряется количеством включения образующих единиц (БОЕ) хламидий в клинических образцах, при этом различные серотипы ассоциированы с различными клиническими проявлениями хламидийной инфекции [3].

Одно из ключевых мест в аспекте знаний о механизмах вирулентности *Chlamydia trachomatis* занимает изучение свойств хламидийных белков теплового шока (сHSP). сHSP кодируется тремя генами Ct110, Ct604 и Ct755, которые экспрессируются независимо друг от друга и проявляют различную активность в зависимости от активности воспалительного процесса, а также запускает каскад иммунопатологических реакций, приводящих к хронизации воспалительного процесса.

Цель исследования – установить молекулярно-биологические факторы диссеминации возбудителя *Chlamydia trachomatis* из урогенитального тракта в полость сустава.

Материалы и методы. В данное исследование было включено 72 пациента с реактивным артритом, у которых в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта и образцах синовиальной жидкости методом ПЦР в реальном времени выявлялся возбудитель *Chlamydia trachomatis*.

Все пациенты были условно разделены на 2 подгруппы: подгруппа 1 (n = 45) – пациенты, у которых возбудитель обнаруживался как в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта, так и в синовиальной жидкости, подгруппа 2 (n = 27) – пациенты, у которых возбудитель присутствовал только в месте первичного инфицирования.

Количественное определение концентраций ДНК *Chlamydia trachomatis* в образцах соскобов эпителиальных клеток из урогенитального тракта пациентов с воспалительными и невоспалительными заболеваниями суставов проводилось с использованием тест-системы АмплиСенс® *C.trachomatis*-скрин-титр-FL (РФ).

Определение серотипного профиля проводилось с помощью усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР с использованием подобранных специфических пар праймеров и олигонуклеотидных зондов.

Определение уровней нормализованной экспрессии генов Ct110, Ct604, Ct755 сHSP проводилось методом усовершенствованной мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием специфических пар праймеров и зондов с нормализацией относительно референсного гена *omp1 Chlamydia trachomatis* по формуле:

$$\% \text{ уровня экспрессии} = 2^{-(\text{Ct интегрирующего гена} - \text{Ct гена } omp1)} \times 100\%,$$

где СТ – пороговый цикл (cyclethreshold).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25/75 процентилей: Me (25/75). Для относительных показателей определяли 95% доверительный интервал (ДИ). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни (U-тест). Для демонстрации прогностической и диагностической значимости предложенного лабораторного теста применяли метод логистической регрессии. Оценку предсказательной ценности предикторов и выбор их пороговых значений проводили с применением ROC-анализа с вычислением площади под кривой – AUC (area under the curve). Значимость различий по частоте встречаемости признака оценивали с помощью критерия χ^2 в таблице сопряженности 2×2. Оценку силы

связи между фактором риска и исходом определяли с помощью критерия ϕ . Для каждого из факторов определяли диагностическую чувствительность, диагностическую специфичность, диагностическую эффективность, прогностическую ценность положительно-го и отрицательного результатов [4].

Результаты и обсуждение. В ходе проведенных молекулярно-биологических исследований было установлено, что значение концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* Me (25/75 процентиля) в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта для подгруппы 1 составило $2,19 (1,59/4,21) \times 10^3$ копий/мл, для подгруппы 2 – $41,18 (18,96/65,22) \times 10^3$ копий/мл (рис. 1).

Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило показать наличие статистически достоверных различий концентрационных уровней возбудителя между исследуемыми подгруппами – $Z = -5,752, p = 0,000$.

Установлено, что концентрация ДНК возбудителя менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл статистически достоверно ассоциирована с диссеминацией микроорганизма в полость сустава с чувствительностью 82,2% и специфичностью 73,3% (AUC = 0,976 (95% ДИ 0,944–1,009), $p = 0,000$).

Использование метода логистической регрессии позволило выявить статистически значимые различия в диссеминации возбудителя в зависимости от концентрации ДНК микроорганизма: OR = 0,868 (95% ДИ 0,769–0,948), $p = 0,002$.

Анализ значимости различий по частоте встречаемости признака оценивали с помощью критерия χ^2

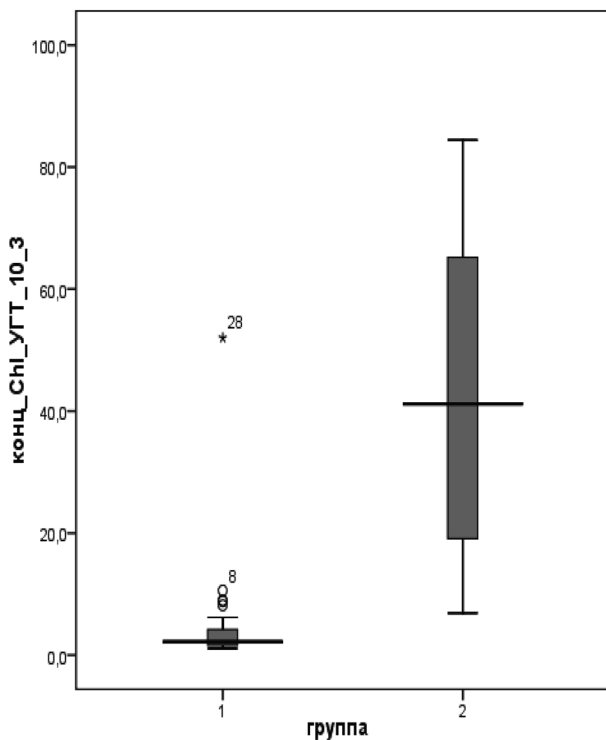


Рисунок 1. Концентрационные уровни ДНК *Chlamydia trachomatis* в образцах из урогенитального тракта пациентов с реактивным артритом

в таблице сопряженности 2×2 . Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 27,176 при $p < 0,01$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска.

Для оценки силы связи между фактором риска и исходом использовался критерий ϕ , который составил 0,699, что свидетельствует о сильной связи между концентрацией ДНК *Chlamydia trachomatis* в соскобах из урогенитального тракта и наличием данного возбудителя в полости сустава. Отношение шансов для наличия диссеминации патогена в полость сустава составило 74,000 (95% ДИ 8,534–641,683) при $p < 0,001$.

Диагностическая чувствительность теста составила 82,2%, диагностическая специфичность – 94,0%, диагностическая эффективность – 85,48%, прогностическая ценность положительного и отрицательного результата составила 97,36 и 66,67% соответственно [2].

В ходе проведенных молекулярно-биологических исследований по определению серотипного профиля *Chlamydia trachomatis* было установлено, что в группе пациентов, у которых патоген детектировался одновременно и в соскобном материале из урогенитального тракта, и в образцах синовиальной жидкости, серотипный профиль микроорганизма был представлен микст-состоянием (рис. 2), тогда как моносеротипный профиль инфицирования был характерен для тех пациентов с реактивным артритом, у которых возбудитель выявлялся только в месте первичного инфицирования (т. е. в урогенитальном тракте).

Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 47,842 при $p < 0,01$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия данного фактора риска. Критерий ϕ составил 0,919, что свидетельствует об очень сильной связи между серотипным профилем *Chlamydia trachomatis* в урогенитальном тракте и наличием данного возбудителя в полости сустава.



Рисунок 2. Серотипный профиль *Chlamydia trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта пациентов с реактивным артритом

■ Оригинальные научные публикации

Показатели диагностической чувствительности, диагностической специфичности, диагностической эффективности, а также прогностической ценности положительного и отрицательного результата составили 100%.

Нормализованные уровни экспрессии гена Ct110 *Chlamydia trachomatis* HSP Me (25/75 процентиля) для подгруппы 1 составило 192,97 (116,27/236,94), для подгруппы 2 – 146,79 (100,16/224,30). Уровни нормализованной экспрессии гена Ct755 HSP возбудителя Me (25/75 процентиля) для подгруппы 1 составили 85,36 (38,75/129,35), для подгруппы 2 – 86,32 (55,59/123,09). Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило показать отсутствие статистически достоверных различий уровней экспрессии исследуемых генов Ct110 и Ct755 между исследуемыми подгруппами – $Z = -1,002$, $p = 0,316$ и $Z = -0,418$, $p = 0,676$ соответственно.

Значения нормализованных уровней экспрессии гена Ct604 cHSP Me (25/75 процентиля) для подгруппы 1 составили 214,44 (165,72/241,82), для подгруппы 2 – 64,00(40,50/89,00) (рис. 3). Использование непараметрического критерия Манна-Уитни подтвердило статистически достоверные различия уровней экспрессии гена Ct604 между исследуемыми подгруппами – $Z = -4,797$, $p = 0,000$.

Проведенный ROC-анализ позволил определить граничное значение уровня нормализованной экспрессии гена Ct604 cHSP – 100%, разделяющее изучаемые группы с чувствительностью теста 84,4% и специфичностью 76,5%. AUC составила 0,812 (95% ДИ 0,707–0,918), $p = 0,000$. Использование метода логистической регрессии позволило выявить статистически значимые различия в диссеминации возбудителя в зависимости от уровней нормализованной экспрессии гена Ct604 cHSP: OR = 0,026 (95% ДИ 1,026–1,040), $p = 0,000$.

Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 21,688 при $p < 0,01$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зави-



Рисунок 3. Уровни нормализованной экспрессии гена Ct604 *Chlamydia trachomatis* в образцах из урогенитального тракта пациентов с реактивным артритом

симости от воздействия фактора риска. Критерий ϕ составил 0,630, что свидетельствует о сильной связи между уровнем нормализованной экспрессии гена Ct604 cHSP в соскобах из урогенитального тракта и наличием данного возбудителя в полости сустава. Отношение шансов для наличия диссеминации патогена в полость сустава составило 25,333 (95% ДИ 5,739–111,83) при $p < 0,001$.

Диагностическая чувствительность теста составила 84,4%, диагностическая специфичность – 82,35%, диагностическая эффективность – 83,87%, прогностическая ценность положительного и отрицательного результата составила 92,68% и 66,67% соответственно.

Таким образом, в связи с тем, что возбудитель *Chlamydia trachomatis* в силу своих биологических особенностей обладает способностью диссеминировать в организме и оказывать местное патогенное действие, поражая различные эпителии, особое внимание нами было уделено выявлению молекулярно-биологических факторов микроорганизма, определяющих риск диссеминации из урогенитального тракта в полость сустава.

Проведенный статистический анализ с использованием непараметрических критериев позволил выявить следующие молекулярно-биологические факторы, оказывающие влияние на способность патогена к диссеминации в полость сустава из места первичного инфицирования (урогенитального тракта):

1. Концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в соскобном материале эпителиальных клеток из урогенитального тракта, т. е. выявление количественных уровней обсемененности урогенитального тракта *Chlamydia trachomatis* менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл увеличивает риск диссеминации возбудителя в полость сустава в 74 раза.

2. Микст-серотипный профиль возбудителя урогенитального тракта повышает риск данного события более чем в 1000 раз.

3. Уровень нормализованной экспрессии гена Ct604 *Chlamydia trachomatis* HSP, превышающий 100%, повышает риск диссеминации возбудителя в 25,333 раза.

Использование в качестве биологического материала для исследования соскобов эпителиальных клеток из урогенитального тракта является высокоинформативным для установления наличия молекулярных факторов риска диссеминации возбудителя *Chlamydia trachomatis* из урогенитального тракта в полость сустава пациентов с реактивным артритом, а полученные данные статистического анализа позволяют рекомендовать данный диагностический подход к использованию в практическом здравоохранении.

Литература

1. Индикация *Chlamydia trachomatis* с помощью иммуномагнитных флуоресцентных наночастиц при персистентной форме инфекции / Л. В. Рубаник [и др.] // Здравоохранение. – 2014. – № 10. – С. 54–58.

2. Камышников, В. С. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников [и др.]; под ред.

В. С. Камышникова. – 7-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2015. – 735 с.

3. Костюк, С. А. Молекулярно-биологические 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.

Оригинальные научные публикации

4. Наследов, А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных. – СПб.: Питер, 2008. – 416 с.

5. Сорока, Н. Ф. Ревматоидный артрит и Chlamydia trachomatis / Н. Ф. Сорока // Клиницист. – 2010. – № 1. – С. 83–89.

Поступила 27.03.2017 г.