

Молекулярно-генетическая характеристика *chlamydia trachomatis* — этиологического агента артропатий коленного сустава воспалительного генеза

Полуян О. С., Костюк С. А.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь

Реферат. Артропатия коленного сустава — вторичное поражение сустава, ассоциированное с трофическими, воспалительными или дегенеративно-дистрофическими изменениями в пораженном суставе, которые развиваются на фоне других патологических состояний и заболеваний. Данное заболевание имеет мультифакторную этиологию, при этом ведущие отечественные и зарубежные специалисты имеют общую точку зрения о генетической детерминированности указанной патологии в совокупности с микробным фактором инфицирования. Наиболее частой причиной воспалительных артропатий является инфекционный фактор. *Chlamydia trachomatis* — общепризнанный и наиболее частый триггерный агент развития артропатий: реактивный артрит развивается в 10–15 % случаев, ревматоидный — в 10 % случаев верифицированной уrogenитальной хламидийной инфекции. Инфекционные элементарные тельца *Chlamydia trachomatis*

способны фагоцитироваться моноцитарными клетками периферической крови и длительно персистировать в организме. Таким образом, в настоящее время внимание исследователей сосредоточено на установлении молекулярно-генетических факторов, способствующих диссеминации *Chlamydia trachomatis* из очага первичного инфицирования (урогенитальный тракт) в полость сустава.

Ключевые слова: артропатия коленного сустава, *Chlamydia trachomatis*, диссеминация, носительный риск.

Введение. Согласно официальной рубрикации Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) артропатии (M00–M25) входят в XIII класс «Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани» и включают в себя: M00–M03 — Инфекционные артропатии (в том числе реактивные артропатии); M05–M14 — Воспалительные полиартропатии; M15–M19 — Артрозы; M20–M25 — Другие поражения суставов.

Артропатии находятся среди наиболее социально значимых классов заболеваний, оказывающих негативное влияние не только на самого пациента и его семью, но и на популяцию в целом. Вне зависимости от этиологического фактора патологический процесс, происходящий в пораженном суставе, характеризуется генерализованным, иммунологически обусловленным воспалением с обязательным развитием синовиита [1–3].

Поиски этиологического фактора развития артропатий коленного сустава направлены на выделение экзо- и эндогенных агентов, запускающих каскад реакций, приводящих к развитию патологического процесса [4, 5].

Микробный агент способен достигать полости сустава гематогенным или лимфогенным путем, стимулируя активность иммунной системы в ответ на попадание чужеродного агента в «стерильную» полость сустава, при этом персистенция возбудителя может наблюдаться как непосредственно в суставной ткани, так и вне ее [5, 6].

По данным Института ревматологии РАМН (РФ), пациенты с реактивными артропатиями коленного сустава составляют около 10 % пациентов ревматологических стационаров, причем на долю ассоциированных с уrogenитальной инфекцией приходится 50–75 % от всех пациентов. При этом отмечается рост числа пациентов с реактивными артропатиями, ассоциированными с инфицированием *Chlamydia trachomatis* [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* — МOMP). Серотип определяет инфекционность возбудителя, которая измеряется количеством включения образующих единиц (ВОЕ) хламидий в клинических образцах, при этом различные серотипы ассоциированы с различными клиническими проявлениями хламидийной инфекции [6].

Одно из ключевых мест в аспекте знаний о механизмах вирулентности *Chlamydia trachomatis* занимает изучение свойств хламидийных белков теплового шока. Белок теплового шока *Chlamydia trachomatis* 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 работы — установление молекулярно-генетических факторов, способствующих проникновению возбудителя *Chlamydia trachomatis* в полость коленного сустава при артропатиях.

Материалы и методы. В данное исследование было включено 72 пациента с хламидийно-ассоциированной артропатией коленного сустава, у которых в соскобах эпителиальных клеток из уrogenитального тракта и образцах синовиальной жидкости методом ПЦР в реальном времени выявлялся возбудитель *Chlamydia trachomatis*.

Все пациенты были условно разделены на 2 группы: группа 1 ($n = 45$) — пациенты, у которых возбудитель обнаруживался как в соскобах эпителиальных клеток из уrogenитального тракта, так и в синовиальной жидкости, группа 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 уrogenитального тракта пациентов с артропатиями коленного сустава проводилось с использованием тест-системы АмплиСенс® *C.trachomatis*-скрин-титр-FL (РФ).

Определение серотипного профиля *Chlamydia trachomatis* проводилось с помощью метода мультиплексной ПЦР с использованием специально подобранных специфических пар праймеров и молекулярных зондов.

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

$$\% \text{уровня экспрессии} = 2^{-(CT_{\text{интересующего гена}} - CT_{\text{гена omp1}})} \cdot 100\%,$$

где *CT* — пороговый цикл (*cycle threshold*).

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 перцентилей: *Me (Q25/75)*. Для относительных показателей определяли 95 % доверительный интервал (*ДИ*). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна – Уитни (*U*-тест). 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 . Для каждого из факторов определяли диагностическую чувствительность (*ДЧ*), диагностическую специфичность (*ДС*), прогностическую ценность положительного (*ПЦ+*) и отрицательного (*ПЦ-*) результатов. Критическим принят уровень значимости $p < 0,05$ [7].

Результаты и их обсуждение. В ходе проведенных молекулярно-генетических исследований было установлено, что значение концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* *Me (25/75 перцентили)* в соскобах эпителиальных клеток из уrogenитального тракта для группы 1 составило $2,19 (1,59/4,21) \cdot 10^3$ копий/мл, для группы 2 — $41,18 (18,96/65,22) \cdot 10^3$ копий/мл (рисунок 1).

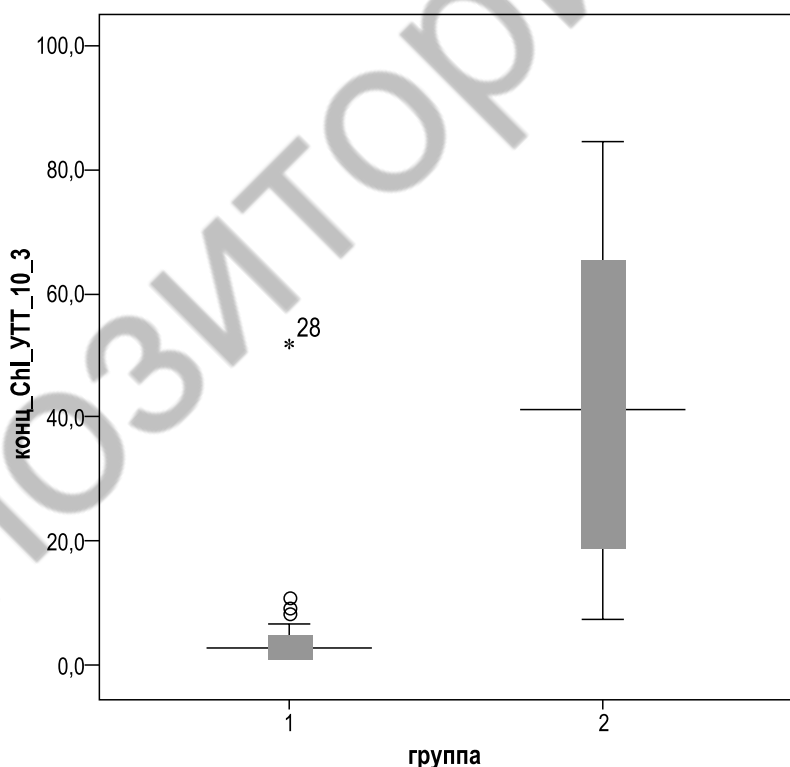


Рисунок 1 — Концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* в образцах из уrogenитального тракта пациентов хламидия-ассоциированной артропатией коленного сустава

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

Для установления порогового значения количественного предиктора «концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта» был проведен ROC-анализ с определением *AUC* (рисунок 2).

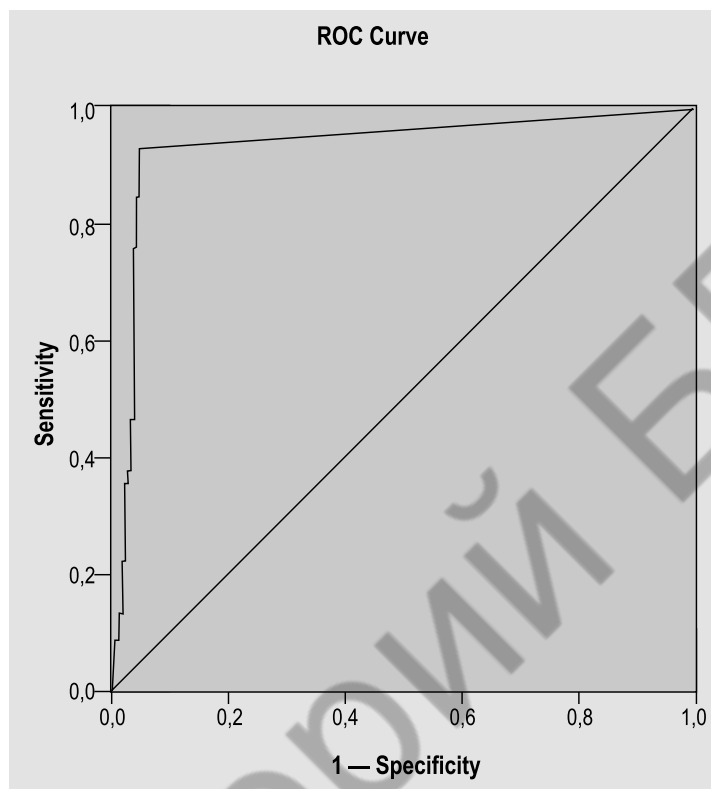


Рисунок 2 — ROC-кривая соотношения диагностической чувствительности и диагностической специфичности в зависимости от величины точки разделения: *Specificity* — специфичность, *Sensitivity* — чувствительность

Установлено, что концентрация ДНК возбудителя $5,2 \times 10^3$ копий/мл (т. е. точка отсечения) разделяет с чувствительностью 82,2 % и специфичностью 73,3 % ($AUC = 0,938$ (95 % ДИ 0,891–0,985), $p < 0,001$) пациентов с артропатией коленного сустава: у которых *Chlamydia trachomatis* присутствует и в урогенитальном тракте, и в полости сустава, и у которых патоген присутствует только в очаге первичного инфицирования.

Относительный риск (ОР) проникновения *Chlamydia trachomatis* в полость сустава из урогенитального тракта при его обнаружении в концентрации менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл составил $OP = 11,100$ (нижняя-верхняя границы 95 % ДИ 2,905–42,413), $p < 0,05$.

Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 35,092 при $p < 0,01$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска.

Отношение шансов для наличия проникновения патогена в полость сустава составило 57,813 (нижняя-верхняя границы 95 % ДИ 1,322–295,212) при $p < 0,001$.

ДЧ теста составила 82,22 %, ДС — 92,59 %, ПЦ+ и ПЦ– составила 94,87 % и 75,76 % соответственно. Выявление в соскобе эпителиальных клеток ДНК возбудителя в концентрации менее $5,2 \times 10^3$ копий/мл у пациентов хламидия-ассоциированной артропатией коленного сустава позволяет выявить этот же возбудитель в синовиальной жидкости в 94,87 % случаев от исходной величины 82,22 % (показателя ДЧ) всех пациентов с артропатией коленного сустава.

На следующем этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по определению серотипного профиля *Chlamydia trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта и синовиальной жидкости с использованием усовершенствованного метода мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с самостоятельно подобранными олигонуклеотидными парами праймеров и зондами, оптимизированным составом реакционной смеси и программой амплификации.

В ходе проведенных молекулярно-генетических 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 (рисунок 3), тогда как моно-серотипный профиль инфицирования был характерен для тех пациентов с артропатией коленного сустава, у которых возбудитель выявлялся только в месте первичного инфицирования (т. е. в урогенитальном тракте).

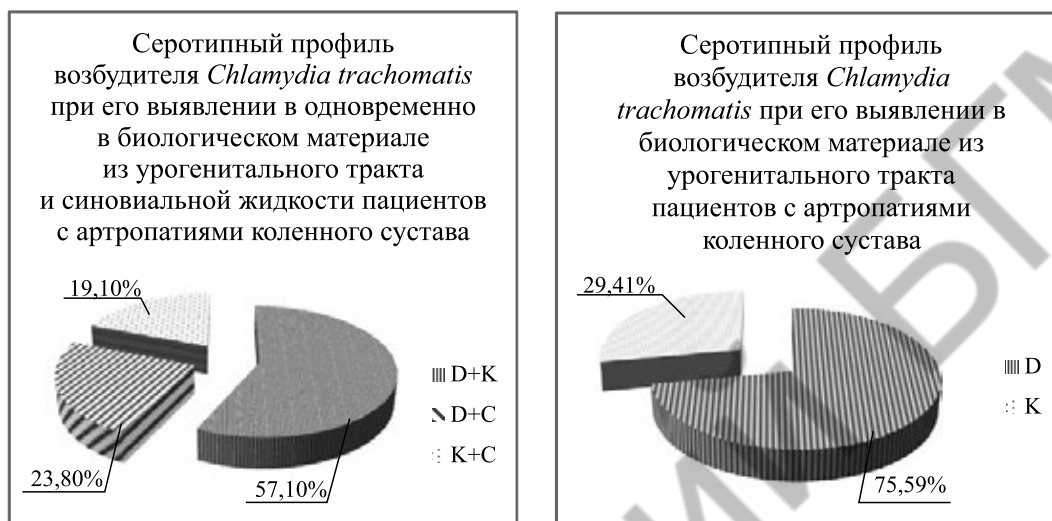


Рисунок 3 — Серотипный профиль *Chlamydia trachomatis* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта пациентов с артропатиями коленного сустава

Относительный риск инфицирования полости сустава *Chlamydia trachomatis* при микст-серотипном инфицировании урогенитального тракта составил $OR = 13,200$ (нижняя-верхняя границы 95 % ДИ 3,476–50,127), $p < 0,05$.

Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 55,882 при $p < 0,001$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска.

Отношение шансов для наличия проникновения патогена в полость сустава при инфицировании серотипами в виде ассоциаций составило 550,000 (нижняя-верхняя границы 95 % ДИ 47,453–6347,726) при $p < 0,001$.

Показатель ДЧ составил 97,78 %, ДС — 92,59 %, ПЦ+ и ПЦ- — 95,65 % и 96,15 % соответственно.

Нормализованные уровни экспрессии гена Ct110 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* Me (Q25/75) для группы 1 составили 192,97 (116,27/236,94) %, для группы 2 — 146,79 (100,16/224,30) %. Уровни нормализованной экспрессии гена Ct755 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* для группы 1 составили 85,36 (38,75/129,35) %, для группы 2 — 86,32 (55,59/123,09) % (рисунок 4). 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 уровней нормализованной экспрессии гена Ct604 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* Me (Q25/75) для группы 1 составили 214,44 (165,72/241,82) %, для группы 2 — 64,00 (40,50/89,00) % (рисунок 4). 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 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* — 100 %, разделяющее изучаемые группы с чувствительностью теста 84,4 % и специфичностью 76,5 %. AUC составила 0,925 (95 % ДИ 0,863–0,987), $p < 0,001$.

Относительный риск проникновения *Chlamydia trachomatis* в полость сустава при условии выявления уровня нормализованной экспрессии гена Ct604 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis*

более 100 % в соскобе эпителиальных клеток из урогенитального тракта составил $OP = 5,700$ (нижняя-верхняя границы 95 % ДИ 2,287–14,205), $p < 0,05$.

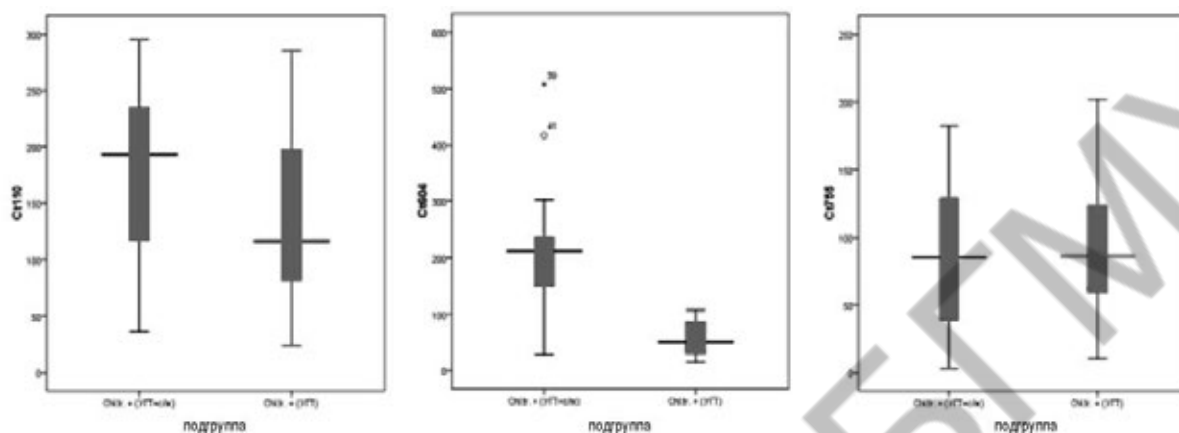


Рисунок 4 — Нормализованные уровни экспрессии генов Ct110, Ct604 и Ct755 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis*: Chl.tr. + (УГТ + с/ж) — группа 1, Chl.tr. + (УГТ) — группа 2

Критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 30,857 при $p < 0,001$, что свидетельствует о статистически достоверной значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска.

Отношение шансов составило 31,214 (нижняя-верхняя границы 95 % ДИ 8,229–118,396) при $p < 0,001$.

ДЧ теста составила 84,40 %, ДС — 85,18 %, ПЦ+ и ПЦ– составила 90,48 % и 76,67 % соответственно. Определение в соскобе эпителиальных клеток из урогенитального тракта уровня экспрессии гена Ct604 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* у пациентов с хламидия-ассоциированной артропатией коленного сустава свидетельствует о присутствии данного патогена в синовиальной жидкости в 90,48 % случаев от исходной величины 84,4 % (показателя ДЧ) всех пациентов с артропатиями коленного сустава.

Заключение. На основании проведенных молекулярно-генетических исследований установлены характеристики возбудителя, способствующие его проникновению из очага первичного инфицирования (урогенитальный тракт) в полость сустава при артропатиях коленного сустава: пороговая концентрация ДНК *Chlamydia 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 *Chlamydia trachomatis* в виде ассоциаций (риск диссеминации увеличивается в 13 раз); уровень нормализованной экспрессии гена Ct604 белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* (превышение 100%-ного уровня экспрессии приводит к увеличению риска инфицирования полости сустава более чем в 5 раз).

Литература

1. Ревматология. Клинические рекомендации / под ред. Е. Л. Насонова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
2. McInnes, I. B. The pathogenesis of rheumatoid arthritis / I. B. McInnes, G. Schett // N. Engl. J. Med. — 2011. — Vol. 365, iss. 23. — P. 2205–2219.
3. The molecular basis for disease phenotype in chronic Chlamydia-induced arthritis / J. D. Carter [et al.] // Int. J. Clin. Rheumtol. — 2012. — Vol. 7, iss. 6. — P. 627–640.
4. Fauvart, M. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies / M. Fauvart, V. N. de Groote, J. Michiels // J. Med. Microbiol. — 2011. — Vol. 60, iss. 6. — P. 699–709.
5. Wood, T. K. Bacterial persister cell formation and dormancy / T. K. Wood, S. J. Knabel, B. W. Kwan // Appl. Environ. Microbiol. — 2013. — Vol. 79, iss. 23. — P. 7116–7121.
6. 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.
7. Наследов, А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных. — СПб.: Питер, 2008. — 416 с.

Molecular genetic features of chlamydia trachomatis – the etiological agent of inflammatory knee joint arthropathy

Poluyan O. S., Kostiuk S. A.

*State Educational Institution “The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”,
Minsk, Republic of Belarus*

Knee joint arthropathy is a secondary cartilage damage which is associated with trophic, inflammatory or degenerative-dystrophic changes in the damaged cartilage, that occurs on the background of other pathologic diseases. The disease has a multifactorial etiology, and leading national and foreign experts have a common point of view about the genetic disease determination in conjunction with the microbial infection factor. *Chlamydia trachomatis* is acknowledged and most frequent trigger agent for the arthropathy development: reactive arthritis develops in 10–15 % of cases, rheumatoid arthritis — in 10 % of cases of verified urogenital chlamydial infection. *Chlamydia trachomatis* infectious elementary bodies are capable to undergo phagocytosis by peripheral blood monocytes and to persist the long-term in the body. Thus the attention of researchers is focused on the establishment of *Chlamydia trachomatis* dissemination molecular-genetic factors from the primary infection epitope (urogenital tract) into the joint cavity.

Keywords: knee joint arthropathy, *Chlamydia trachomatis*, dissemination, odds ratio.

Поступила 30.10.2019