

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

**С. А. Костюк, Т. В. Руденкова, Т. В. Глинкина**

**ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА *Mycoplasma pneumoniae* И *Mycoplasma genitalium*,  
ОПТИМИЗАЦИЯ ИХ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ**



Минск БГМУ 2024

**Костюк, С. А.** Патогенные свойства *Mycoplasma pneumoniae* и *Mycoplasma genitalium*, оптимизация их этиологической диагностики / С. А. Костюк, Т. В. Руденкова, Т. В. Глинкина. – Минск : БГМУ, 2024. – 172 с. ISBN 978-985-21-1525-4

В монографии подробно описаны биологические особенности микоплазм, дана характеристика их обменных процессов, строения клеток, и организации генома, включая нуклеотидных перестроек в их генах, контролирующих формирование факторов патогенности данных микроорганизмов. Особое внимание уделено изучению генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам, оптимизации подходов к этиологической диагностике микоплазм, основанной на использовании новых авторских методических приемов для бактериологического и молекулярно-генетического методов

Данная работа представляет интерес для врачей клинической лабораторной диагностики, микробиологов, дерматовенерологов, акушеров-гинекологов, врачей инфекционистов, а также научных сотрудников, преподавателей, клинических ординаторов, аспирантов медицинских университетов.

Табл. 45, ил. 22. Библиогр. 314 назв.

Рекомендовано Научно-техническим советом Белорусской медицинской академии  
последипломного образования 13.09.2023 г., протокол № 7

#### Р е ц е н з е н т ы:

д-р мед. наук, проф., зав. каф. дерматовенерологии Гродненского государственного медицинского университета Д. Ф. Хворик; д-р мед. наук, проф., проф. каф. инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета Д. Е. Данилов; д-р биол. наук, зав. лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии Е. Г. Фомина

## ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА МИКРООРГАНИЗМЫ РОДА *Mycoplasma*

**Микоплазмы** — гетерогенная группа микроорганизмов, которые являются самыми мелкими свободноживущими и способными к саморепликации организмами. В соответствии с современной классификацией патогенные для человека мико-уреаплазмы относят к классу Mollicutes, порядку Mycoplasmatales, семейству Mycoplasmataceae, которое включает микроорганизмы двух родов: *Mycoplasma* и *Ureaplasma*. К роду *Mycoplasma* принадлежат виды *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. fermentans*, которые являются патогенными для человека. К роду *Ureaplasma* относят вид *U. urealyticum*, который по результатам филогенетического анализа делят на два биовара *U. urealyticum* и *U. parvum*. Каждый из биоваров включает в себя несколько серотипов: *U. urealyticum* — 10 серотипов (2, 4, 5, 7–13), *U. parvum* — 4 серотипа (1, 3, 6, 14) [1, 5].

Микоплазмы — мельчайшие (0,15–0,30 мкм) среди прокариотов микроорганизмы, способные к самостоятельному метаболизму и репродукции [7]. Малые размеры возбудителя обеспечивают тесное прилегание к мембране клеток организма хозяина и облегчают внедрение мико-уреаплазм в клетку, что обеспечивает им защиту от воздействия гуморальных и клеточных факторов иммунной системы. Прикрепление к клетке макроорганизма позволяет возбудителю с помощью токсинов оказывать на нее повреждающий эффект, а непосредственный контакт усиливает эффективность воздействия, т. к. даже небольшие дозы токسينа достигают мишени [2, 4, 7, 12].

В процессе эволюции микоплазмы приспособились к сосуществованию с клетками эукариот и являются факультативными паразитами человека. Для некоторых микоплазм получены данные о внутриклеточной локализации — *M. pneumoniae*, тогда как другие считаются облигатно внеклеточными паразитами — *M. genitalium*. Однако в обоих случаях микоплазмы находятся в тесном контакте с мембранами клеток хозяина и способны активно вмешиваться в их метаболизм [8, 12].

В организме человека микоплазмы способны вызывать заболевания респираторного и урогенитального трактов, активировать аутоиммунные процессы, быть причиной развития артрита, иммунодефицита, а также усиливать воспалительные реакции организма вирусной этиологии [2, 10, 11]. Внутриутробное инфицирование микоплазмами может приводить к различным нарушениям развития плода [3, 6, 9]. Развитие заболевания во многом зависит от «массивности» инфицирования организма, когда в эпителий попадает патологически значимая концентрация микоплазм [6, 7, 13].

Колонизация различных эпителиев в организме человека микоплазмами не всегда приводит к развитию острого инфекционного процесса, что некоторые исследователи интерпретируют как свидетельство об условнопатогенной природе возбудителя [3]. В то же время, в долгосрочной перспективе, при развитии в макроорганизме нарушений иммунного статуса и/или гормонального профиля, изменений состава микробиоценоза эпителиев, в которых персистенция микоплазм, приводят к активации микоплазменной инфекции с дальнейшим развитием патологических процессов [1–3].

По данным различных эпидемиологических исследований, уровень инфицированности возбудителями микоплазменной природы довольно высок и составляет 15–60 % популяции. В то же время сложно оценить реальное количество инфицированных из-за довольно широкого распространения бессимптомного носительства микоплазм среди клинически здоровых лиц, особенно при урогенитальном инфицировании. Поэтому микоплазменные инфекции относят к заболеваниям сложным с точки зрения диагностики и лечения, для которых характерно длительное, мало- или бессимптомное течение инфекционного процесса, а исчезновение симптомов инфекции не означает элиминации возбудителя из организма [10–12].

Следствием инфицирования микоплазмами могут быть как острый инфекционный процесс, так и длительная (иногда пожизненная) персистенция микоплазм в организме. При этом явные признаки патологических нарушений в макроорганизме могут отсутствовать, однако развиваются изменения на клеточном и молекулярном уровнях, которые связаны с формированием иммунной дисфункции, накоплением продуктов перекисного окисления липидов, угнетением системы антиоксидантной защиты, активацией гемокоагуляционного каскада, а также угнетением фибринолиза и угрозой развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [2, 4, 7, 12].

Проблема терапии микоплазменных инфекций состоит в том, что возбудитель быстро приобретает резистентность к антибактериальным лекарственным средствам [3, 6, 9]. Это связано с наличием у микоплазм уникальных механизмов генетической трансформации, определяющих высокую скорость мутационного процесса и нестабильность их генома, вследствие частых перестроек ДНК, а также за счет механизмов оперативной реорганизации генома у данного возбудителя [4, 7, 13].

Разрешение проблем подавления микоплазменных инфекций связывают с изучением молекулярных основ патогенеза персистенции этих микроорганизмов. Исследования механизмов взаимодействия микоплазм с организмом человека сдерживаются не только естественными

трудностями контроля молекулярных процессов в системе «паразит–хозяин», но и особенностями биологии микоплазм.

1. Одной из значимых проблем является персистенция микоплазм, т. е. процесс их длительного взаимодействия с организмом человека, что приводит к развитию латентной, хронической или медленной формы инфекционного процесса. Именно персистенция является основной формой существования микоплазм [2, 12, 13]. Наличие общих антигенных детерминант у микоплазм и клеток организма человека, а также появление комбинированных и новых антигенов в результате тесного межмембранного взаимодействия обеспечивают антигенную мимикрию микоплазм, являются причиной аутоиммунных реакций и отсутствия специфических защитных антител, которые способствовали бы элиминации возбудителя. Выживание микоплазм обеспечивается также широкой внутривидовой иммунологической гетерогенностью, которая характерна для многих видов возбудителя [4, 9, 12].

2. Проблемы персистенции микоплазм и их патогенности тесно связаны. Для микоплазменных инфекций человека характерно длительное сохранение и депонирование возбудителя в пораженных тканях, а также постоянное эндогенное реинфицирование организма. Микоплазмы способны ускользать от иммунного надзора организма-хозяина, в том числе посредством внутриклеточной локализации и превращения в малоактивные некультивируемые формы, характеризующиеся замедленной метаболической активностью, что, безусловно, способствует уменьшению остроты реакций каскада патологических процессов в организме хозяина и формированию персистентного инфекционного процесса [9, 11].

3. К факторам, которые способствуют персистенции микоплазм, относят и их способность, в силу тесного контакта патологического агента и клеток организма-хозяина, непосредственно воздействовать на метаболизм клеток макроорганизма (клетки слизистой оболочки, иммунной системы, форменные элементы крови) и на их генетический аппарат, приводя к нарушениям их структуры и функций [4, 7, 13].

4. При хроническом течении микоплазменных инфекций микробиологическое выделение возбудителя затруднено из-за потери способности к автономному росту после паразитирования на клетках организма хозяина [7, 8, 12]. Наличие у микоплазм антигенов, перекрестно реагирующих с тканью хозяина, их присутствие в составе труднодоступных иммунных комплексов ограничивают возможности серологической детекции инфекционного агента, поэтому наиболее оптимальным является применение метода ПЦР-диагностики для выявления инфекций, обусловленных микоплазмами [5, 6, 8, 13].

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Генитальные* микоплазмы как фактор риска развития акушерской и перинатальной патологии / А. С. Анкирская [и др.] // Вестник АШЮСР. 1991. С. 17–20.
2. *Астратян, А. А.* Сероэпидемическая характеристика инфекции, вызванной *M. hominis* / А. А. Астратян, О. В. Козлова // Микоплазмы и микоплазмозы : сб. Москва, 1985. С. 31–35.
3. *Микоплазмы.* Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С. Н. Борхсениус [и др.]. Санкт-Петербург : Наука, 2002.
4. *Глик, Б.* Молекулярная биотехнология: принципы и применение : пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак ; под ред. Н. К. Янковского. Москва : Мир, 2002. 590 с.
5. *Медицинская микробиология* / под ред. В. И. Покровского, О. К. Поздеева. Москва, 1999.
6. *Молекулярная клиническая диагностика.* Методы : пер. с англ. / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. Москва : Мир, 1999. 558 с.
7. *Немченко, О. И.* Урогенитальный микоплазмоз (обзор литературы) / О. И. Немченко, Е. В. Уварова // Consilium medicum. 2007. Т. 9, № 1. С. 15–19.
8. *Определитель бактерий Берджи* : в 2 т. / под ред. Дж. Хулта [и др.] ; пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. Москва, 2001.
9. *Прозоровский, С. В.* Медицинская микоплазмология / С. В. Прозоровский, И. В. Раковская, Ю. В. Вульфович. Москва : Медицина, 1995.
10. *Раковская, И. В.* Урогенитальные микоплазмозы / И. В. Раковская, Ю. В. Вульфович // Сборник ВНИИМИ. 1990. С. 80.
11. *Теплов, С. А.* Уретриты, циститы, кольпиты, вульвовагиниты / С. А. Теплов, Л. С. Назарова, И. П. Елисеева. Москва : КРОН-Пресс, 2000.
12. *Чернова, О. А.* Генетическая изменчивость микоплазм при взаимодействии их с организмами хозяина (вертикальный перенос и реорганизация в генах поверхностных антигенных детерминант) : доклад РАН / О. А. Чернова, В. М. Чернов. 1999. № 366 (1). С. 125–127.
13. *Razin, S.* Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas / S. Razin, D. Yogevev, Y. Naot // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998. P. 1094–1156.

## РАЗДЕЛ 1 *MYCOPLASMA GENITALIUM*

### ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения  
ГЭ/л — количество геномных эквивалентов на литр  
ДК<sub>233</sub> — диеновые конъюгаты  
ДК<sub>278</sub> — диенкетоны  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДС — диагностическая специфичность  
ДЧ — диагностическая чувствительность  
ИЛ-4 — интерлейкин 4  
ИЛ-8 — интерлейкин 8  
ИНФ-γ — интерферон гамма  
ИО — истинно отрицательный (результат)  
ИП — истинно положительный (результат)  
ИППП — инфекции, передаваемые половым путем  
ЛДГ — лактатдегидрогеназа  
ЛО — ложно отрицательный (результат)  
ЛП — ложно положительный (результат)  
ЛС — лекарственное средство  
МДА — малоновый диальдегид  
МИК — минимальная ингибирующая концентрация  
ОПМ — облигатно-патогенный микроорганизм  
ПОЛ — перекисное окисление липидов  
ПЦ- — предсказательная ценность отрицательного результата (теста)  
ПЦ+ — предсказательная ценность положительного результата (теста)  
ПЦР — полимеразная цепная реакция  
ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
УПМ — условно-патогенный микроорганизм  
УЭЗ — удельная экономия затрат  
ФНО-α — фактор некроза опухоли альфа  
ЭЗ — экономия затрат  
*C. trachomatis* — *Chlamydia trachomatis*  
*Candida spp.* — микроорганизмы рода *Candida*  
*gap* — glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы)  
*M. genitalium* — *Mycoplasma genitalium*  
*M. hominis* — *Mycoplasma hominis*

*msrA* — methionine sulfoxide reductase A (ген метионин сульфоксид редуктазы A)

*T. vaginalis* — *Trichomonas vaginalis*

TGF- $\beta$  — transforming growth factor beta (трансформирующий фактор роста бета)

*Ur. urealyticum* — *Ureaplasma urealyticum*

*Ureaplasma spp.* — микроорганизмы рода *Ureaplasma*

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), являются одним из ключевых факторов, оказывающих влияние на репродуктивное здоровье населения (В. Г. Панкратов, 2019; МЗ Республики Беларусь, 2013; В. П. Адаскевич и соавт., 2015). По данным Всемирной организации здравоохранения, *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) является самостоятельным этиологическим фактором ИППП. Распространенность инфекций урогенитального тракта, связанных с присутствием *M. genitalium*, по данным, полученным разными исследователями, колеблется в пределах от 4,5 % (S. Jorgen, 2018) до 25 % (D. Taylor-Robinson et al., 2018) среди пациентов с негонококковым уретритом. Присутствие инфекционного агента в урогенитальном тракте беременных женщин может приводить к возникновению осложнений течения беременности и родов (V. L. Short et al., 2010; Н. Moi et al., 2019), инфицированию новорожденных (О. К. Кулага, 2018). Ранняя диагностика и эффективное лечение инфекций, обусловленных *M. genitalium*, как среди беременных, так и у половых партнеров в ходе прегравидарной подготовки, являются основой формирования репродуктивной безопасности населения.

Особенностью течения инфекций, обусловленных присутствием *M. genitalium*, является склонность к персистенции (D. Taylor-Robinson et al., 2010), при этом присутствие возбудителя в урогенитальном тракте пациентов приводит к развитию воспаления независимо от степени выраженности клинических проявлений (В. И. Кисина и соавт., 2009), однако механизмы формирования и течения, причины и последствия длительной персистенции этого инфекционного агента в урогенитальном тракте пока недостаточно изучены.

Показано, что присутствие *M. genitalium* влияет на продукцию цитокинов и продуктов перекисного окисления липидов в клеточных культурах (С. L. McGowin et al., 2012). К тому же описаны изменения концентраций молекул межклеточной адгезии в крови пациентов, инфицированных *M. genitalium* (М. Р. Анфилова, 2016). Это позволяет полагать, что состояние биохимических и иммунологических процессов

в урогенитальном тракте пациентов во многом определяется механизмами, лежащими в основе взаимодействия возбудителя и организма хозяина на молекулярно-генетическом уровне. Изучение состояния метаболических процессов в урогенитальном тракте при инфицировании *M. genitalium* с особенностями в нуклеотидных последовательностях определенных участков генов, контролирующих формирование факторов патогенности, будет способствовать раскрытию механизмов влияния инфекционного агента на макроорганизм.

Молекулярно-генетические особенности *M. genitalium*, обусловленные небольшим размером генома, существенно ограничивают биосинтетические возможности возбудителя, что создает объективные трудности в разработке пригодной для культивирования микроорганизма питательной среды. Преодоление указанных сложностей возможно путем подбора сбалансированного состава среды и условий выявления и культивирования *M. genitalium*.

Изменения содержания метаболитов окислительного стресса и иммунологических маркеров как на системном, так и на локальном уровнях в присутствии инфекционного агента напрямую связаны со степенью патогенного влияния, которое он оказывает на клетки организма-хозяина. Патогенный потенциал микроорганизмов, в свою очередь, обусловлен активностью генов, контролирующих формирование факторов вирулентности (С. А. Костюк и соавт., 2009). *M. genitalium* прикрепляется к клеткам эпителия посредством комплексной структуры, известной как органелла прикрепления (attachment organelle). Данная структура состоит из цитоадгезинов и белков цитоадгезии, которые кодируются генами *mg191* и *mg192*, входящими в состав MgPa оперона. Мутации в этих генах могут приводить к структурным изменениям в продуктах данных генов (О. В. Горшков, 2011), тем самым оказывая влияние на патогенный потенциал возбудителя.

Одним из механизмов, направленным на сохранение жизнеспособности возбудителя и поддержание его патогенных свойств, является синтез ферментов, обеспечивающих ему защиту от воздействия метаболитов окислительного стресса. Геном, контролирующим синтез фермента, участвующего в формировании антиоксидантного потенциала *M. genitalium*, является ген *msrA*. Изучение генетических особенностей возбудителя позволит установить их влияние на свойства микроорганизма и его патогенный потенциал.

Ввиду сложности культивирования *M. genitalium* затруднено определение устойчивости возбудителя к действию антибактериальных лекарственных средств с использованием классических микробиологических методов исследования. Разработанные протоколы лечения инфекций,

обусловленных *M. genitalium*, предлагают использовать на выбор несколько лекарственных средств из групп тетрациклинов и макролидов (И. Г. Шиманская и соавт., 2009). При этом выбор проводится эмпирически, без учета возможной устойчивости возбудителя к назначаемому лекарственному средству.

Основой лечения пациентов, страдающих ИППП, является назначение антибактериальных лекарственных средств (Н. В. Соловей и соавт., 2015). В связи с этим перспективной оказывается разработка молекулярно-биологических методов исследования, позволяющих быстро и достоверно определять наличие генетических маркеров устойчивости микроорганизмов к действию антибактериальных лекарственных средств. Решению этой актуальной задачи лабораторной службы и посвящено одно из основных направлений настоящего исследования.

Проведение исследований в указанных направлениях позволит существенно расширить существующие представления о патохимических механизмах развития патологического процесса, а также повысить эффективность диагностики и лечения инфекции уrogenитального тракта, обусловленной *M. genitalium*.

## **ГЛАВА 1** **ИНФЕКЦИЯ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА,** **ОБУСЛОВЛЕННАЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM***

### **1.1. РОЛЬ *MYCOPLASMA GENITALIUM* В ФОРМИРОВАНИИ** **ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА**

Одним из этиологических факторов, лежащих в основе формирования воспалительных процессов уrogenитального тракта, являются возбудители ИППП. Проблемы распространения, диагностики и лечения инфекционных процессов, обусловленных возбудителями ИППП, значимы в таких областях медицины как урология, акушерство и гинекология, неонатология. ИППП являются одним из существенных факторов, влияющих на репродуктивное здоровье взрослого населения и здоровье новорожденных.

По данным ВОЗ, ежедневно инфицирование возбудителями ИППП происходит у 1 миллиона человек [1]. По официальным данным Министерства здравоохранения за 2021 г., в Республике Беларусь, начиная с 1996 г., регистрируется постоянное снижение заболеваемости сифилисом, гонореей и хламидийной инфекцией [2, 3 с. 81, 5, 6]. Однако уровень первичного выявления ИППП по-прежнему остается высоким. Со-

гласно статистическим данным, в 2015 году в г. Минске было выявлено 6073 случая ИППП, что составляет 320,8 случаев на 100 000 населения. Эти данные позволяют сделать вывод об увеличении количества случаев выявленных ИППП на 5,5 % по сравнению с аналогичным показателем за 2011 г. Суммарный уровень заболеваемости ИППП по г. Минску ниже среднего аналогичного показателя по Республике на 5,3 % [3 с. 64, 7–9].

Наибольший процент выявления ИППП (до 70 % случаев) приходится на молодых людей в возрасте от 15 до 24 лет. А возникновение осложнений ИППП является основной причиной нарушения репродуктивной функции как у мужчин, так и у женщин [10]. Важную роль в распространении ИППП играют социальные факторы (возраст начала половой жизни, применение барьерных контрацептивов, количество половых партнеров и др.). В Республике Беларусь национальная стратегия в области ИППП ориентирована на усиление мер первичной профилактики среди населения, особенно среди молодых людей. Такой подход должен в будущем обеспечить снижение заболеваемости ИППП [10, 12–15].

Кроме отрицательного влияния, которое возбудители ИППП оказывают на репродуктивное здоровье, необходимо отметить их негативное влияние на плод, а также возможность инфицирования новорожденных в течение беременности и в процессе родов [16 с. 285].

К возбудителям ИППП, согласно данным ВОЗ, относят более 30 видов различных бактерий, вирусов и паразитов [1]. *M. genitalium* была впервые описана J. G. Tully и D. Taylor-Robinson в 1981 г. В соответствии с данными ВОЗ данный микроорганизм является самостоятельным этиологическим фактором ИППП [17].

В 2014 г. в УЗ «Городской клинический кожно-венерологический диспансер» г. Минска было зарегистрировано 839 случаев (48,3 случаев на 100 000 населения) микоплазмоза, вызванного *M. genitalium*. Следует отметить, что несмотря на общую тенденцию к снижению количества ИППП в Республике Беларусь, наблюдается рост количества выявляемых случаев инфицирования вирусами (вирус простого герпеса I и II типов (на 16,5 %), вирусов папилломы человека (16,4 %) и др.), а также возбудителем бактериальной природы — *M. genitalium* (на 19,7 %) [3 с. 56]. Основной причиной увеличения количества выявляемых инфекций вирусной и микоплазменной этиологии является широкое внедрение молекулярно-биологических методов клинической лабораторной диагностики для обнаружения данных возбудителей ИППП [18, 19].

## 1.2. ПАТОГЕНЕЗ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА, ОБУСЛОВЛЕННЫХ *Mycoplasma genitalium*

Выявление *M. genitalium* как этиологического фактора воспалительных процессов уrogenитального тракта получило распространение после внедрения метода ПЦР в практику клинической лабораторной диагностики. Именно данный метод позволил быстро и достоверно выявлять ДНК *M. genitalium* в биологическом материале пациентов [19–23, 24 с. 12].

Данные, полученные в ходе клинико-эпидемиологических наблюдений и экспериментальных исследований, позволяют сделать заключение о самостоятельной этиопатогенетической роли *M. genitalium* в развитии воспалительных процессов уrogenитального тракта мужчин (негонококковый уретрит) и женщин (аднексит, цервицит, кольпит) [25–30, 31, 34].

Результаты исследований влияния данного патогена на течение беременности, здоровье матери и плода немногочисленны и противоречивы [31–34]. Так, R. Edwards и соавт. установили связь между инфицированием беременных женщин *M. genitalium* и преждевременными родами [35]. В то же время V. L. Short и соавт. были проведены исследования, направленные на изучение влияния *M. genitalium* на течение беременности и установление связи перинатальной микоплазменной инфекции и самопроизвольного выкидыша. Авторами показано, что у беременных женщин с инфекцией, обусловленной *M. genitalium*, не увеличивается риск развития самопроизвольного выкидыша, однако у них чаще наблюдались нарушения репродуктивной функции по сравнению с таковыми у женщин контрольной группы [36]. Эти данные свидетельствуют о необходимости дальнейших научных исследований и установлении роли *M. genitalium* в репродуктивных нарушениях и влиянии на течение беременности, здоровье матери и ребенка.

Инфекционные заболевания родовых путей, возникающие во время беременности, обуславливают инфицирование плода, что приводит к увеличению ранней детской смертности и возникновению пороков развития, поэтому необходимо проведение целенаправленной диагностики для выявления инфекционных процессов уrogenитального тракта именно у беременных женщин [16, 29, 34, 37 с. 97, 38, 39].

Антенатальный путь передачи инфекции при хламидиозе и уреоплазмозе подтвержден многими исследователями. В результате внутриутробного инфицирования хламидиями, уреоплазмами и сопутствующими им микроорганизмами у новорожденных могут развиваться тяжелые поражения легких, сердца, почек, печени, желудочно-кишечного тракта, головного мозга и мозговых оболочек, конъюнктивиты, дакриоциститы, отиты, вульвиты, уретриты, остеомиелиты, изменения

в общем составе крови, геморрагический синдром, врожденные пороки развития [17, 25, 39, 40].

Распространенность инфекций урогенитального тракта, обусловленных присутствием *M. genitalium*, по данным, полученным разными исследователями, оценивается на уровне от 4,5 % [41] до 25 % пациентов с негонококковым уретритом [42].

Инфекции микоплазменной этиологии в большинстве случаев протекают с минимальными клиническими проявлениями и носят хронический рецидивирующий характер [43–47]. Однако возможно и формирование острого инфекционного процесса, при котором возбудитель диссеминирует по организму [28, 45, 48 с. 242, 49 с. 14, 50–52].

### 1.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКОПЛАЗМ

#### 1.3.1. Характеристика обменных процессов и строения клеток *Mycoplasma genitalium*

В соответствии с современной классификацией микоплазмы относят к классу *Mollicutes*, порядку *Mycoplasmatales*, семейству *Mycoplasmataceas*, включающему в себя два рода *Mycoplasma* и *Ureaplasma* [50, 53 с. 423]. *Mollicutes* — это прокариоты, у которых отсутствует клеточная стенка [54]. Клетки *Mollicutes* содержат цитоплазму, в которой присутствуют нуклеоид и рибосомы [55].

Размеры *Mollicutes* могут составлять от 0,1 до 0,45 мкм, что сближает их с крупными вирусами, однако как и все бактерии, данные микроорганизмы содержат обе нуклеиновые кислоты — РНК и ДНК, а также способны к самостоятельному воспроизведению, и поэтому согласно одной из теорий их происхождения *Mollicutes* рассматривают как переходную ступень от вирусов к бактериям. Согласно другой теории *Mollicutes* — это регрессивная ветвь эволюции некоторых грамположительных бактерий и/или кластридий, а отсутствие у них клеточной стенки объясняется ее утратой в процессе эволюции [56 с. 144, 57].

Ввиду отсутствия клеточной стенки ее функцию у микоплазм и уреаплазм берет на себя трехслойная цитоплазматическая мембрана, что обуславливает многообразие форм и изменчивость данных микроорганизмов. Состав мембраны у *Mollicutes* сходен с составом плазматических мембран эукариотических клеток, в его основе белки, липиды, углеводные компоненты в виде полисахаридов и гликоконъюгантов (липогликанов, гликолипидов и гликопротеинов), основной функцией которых является формирование поверхностных антигенных детерминант микроорганизмов [57, 58].

Малый размер клеток и отсутствие клеточной стенки позволяет микоплазмам проникать через поры диаметром до 0,22 мкм, а также обеспечивает им защиту от воздействия антибактериальных лекарственных средств, механизм действия которых связан с нарушением синтеза структурных компонентов клеточной стенки [59].

Для ряда микоплазм, обладающих подвижностью (*M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*, *M. mobile*, *M. genitalium*), описаны элементы субклеточной морфологии, напоминающие цитоскелет. В клетках этих микоплазм обнаружены цитоскелетоподобные белки, гомологичные актину, а также тубулину эукариот [56, 60, 61]. Культивирование микоплазм на бесклеточных средах часто приводит к потере их подвижности и патогенности. Однако после нескольких пассажей на эукариотических клетках утраченные свойства восстанавливаются. Подобный эффект связан с неспецифическими условиями культивирования микоплазм и возникающими вследствие этого нарушениями механизмов симбиотических связей микоплазм и эукариотических клеток [56, 62].

Основными субстратами для получения энергии у микоплазм являются глюкоза и аргинин, которые сбраживаются благодаря работе ферментативной системы этих микроорганизмов. Некоторые виды микоплазм (*A. laidlawii*, *M. pneumoniae*, *M. mycoides*, *M. fermentans*), используя в качестве субстрата глюкозу, выделяют в качестве конечного продукта молочную кислоту, тем самым создавая кислую среду. Другие виды микоплазм (*M. hominis*, *M. arginini*, *M. salivarium*, *M. arthritidis*, *M. gallisepticum*) используя в качестве субстрата аргинин, выделяют в питательную среду аммиак и углекислоту, тем самым создавая щелочную pH. Данные свойства используются в качестве первичных диагностических признаков при идентификации микроорганизмов [56, 57, 62].

### 1.3.2. Организация генома у *Mycoplasma genitalium*

Размер клеток *M. genitalium* колеблется в пределах от 0,2 до 0,4 мкм, размер генома составляет около 600 тысяч пар нуклеотидов. Данный микроорганизм характеризуется полиморфизмом как по морфологии, так и по ультраструктурной организации поверхностных структур. Подвижность *M. genitalium* обусловлена наличием особых жгутикоподобных структур [56].

Высокая антигенная вариабельность *M. genitalium* является генетически детерминированным признаком и определяет циркуляцию в одной популяции фенотипически различающихся разновидностей микроорганизма. Генетические характеристики и фенотипические особенности возбудителя определяют его вирулентность [63, 64].

Геном *M. genitalium*, как у всех *Mollicutes*, представлен кольцевой двухцепочечной молекулой ДНК. Среди прокариот размер генома *M. genitalium* является наименьшим (580–1800 тыс. п.о., что составляет 1/16 генома *E. coli*) среди микроорганизмов, способных к саморепликации. Генетической особенностью микоплазм является минимальное содержание G+C пар в составе молекул ДНК (23–41 %). Однако это не сказывается на способности данных микроорганизмов кодировать белки с нормальным аминокислотным составом, но в то же время является фактором, ограничивающим их биосинтетические возможности и определяющим высокие требования к условиям их культивирования [54, 55].

В геноме микоплазм большинство генов кодируют белки, обеспечивающие катаболизм и транспорт метаболитов, однако мало генов, кодирующих белки анаболических путей. Данный феномен объясняет ограниченность метаболических возможностей этих возбудителей и их зависимость от поступления ряда соединений из внешней среды. Преобладание в их геноме генов, кодирующих белки транспортной системы, связано с необходимостью обеспечения доставки веществ, нужных для поддержания процессов жизнедеятельности микроорганизма (аминокислот, предшественников нуклеиновых кислот и др.). Именно неспособность микоплазм к биосинтезу пуринов и пиримидинов *de novo* обуславливает необходимость экзогенной транспортировки предшественников нуклеиновых кислот в клетки возбудителя для осуществления процессов репликации [55, 56, 65].

В процессе приспособления ДНК к низкому уровню содержания G-C пар у микоплазм сформировались особенности генетического кода. Так у большинства *Mollicutes* генетический код отклоняется от универсального: триплет нуклеотидов TGA не является стоп-кодоном, а кодирует триптофан, причем в десять раз чаще, чем кодон TGG, который обычно используется для кодирования этой аминокислоты [55, 65].

ДНК микоплазм, несмотря на малые размеры генома, содержит повторяющиеся последовательности, доля которых может достигать 10 %. Повторяющиеся последовательности ДНК микоплазм присутствуют, как правило, в генах, кодирующих основные поверхностные антигены возбудителя. Например, варибельность гена *P1 M. pneumoniae* и, соответственно, его продукта (белка P1) обеспечивается рекомбинацией между повторяющимися участками ДНК микроорганизма. Ген P1 содержит повторяющиеся единицы, которые распределены по хромосоме, при этом копии каждой повторяющейся единицы гена являются высокогомологичными, но не идентичными друг другу участками [55, 66, 67]. Рекомбинация между генами, кодирующими поверхностные антигены, и повторяющимися элементами, входящими в состав этих генов,

может вносить существенный вклад в антигенные вариации микоплазм и обеспечивать им ускользание от иммунного надзора организма-хозяина [66].

У микоплазм и уреоплазм присутствуют и подвижные элементы (*Tn* и *IS*) генома, в которых также могут содержаться повторяющиеся последовательности. Подвижные элементы генома могут участвовать в переносе генов между разными, иногда филогенетически неродственными микроорганизмами. При этом происходит встраивание в геном микроорганизма «негомологичной» информации. Именно этот механизм лежит в основе миграции генов между различными генетическими системами. Примером такого процесса у микоплазм является приобретение ими стрептококковой детерминанты устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов — *tetM* [68].

Процесс размножения микоплазм происходит путем равновеликого и неравновеликого деления материнской клетки, фрагментации, а также почкования. Описаны и варианты образования «элементарных телец» размером 0,1–0,25 мкм в цитоплазме или на ограничивающей мембране клетки [56]. Механизм деления клеток микоплазм аналогичный процессу деления у других бактерий, но возможно отставание скорости деления цитоплазмы от скорости процесса репликации генома, результатом чего является появление многоядерных форм. Тесная связь клеток микоплазм с клетками организма-хозяина определяет зависимость скорости метаболических процессов и размножения микроорганизма от состояния клеток организма [56, 57].

Большинство видов микоплазм являются симбионтами или паразитами. Поражение микоплазмами органов и систем организма человека связано с их негативным воздействием на клетки эпителия, крови, нервной системы, мышц, эндокринных желез [25, 40]. Микоплазмы, являясь мембранными паразитами, прикрепляются к поверхности клеток организма-хозяина, могут сливаться с ними или углубляться в них, тем самым скрываясь от воздействия защитных факторов.

### 1.3.3. Особенности культивирования *Mycoplasma genitalium*

Исследования, направленные на выделение и изучение биологических свойств циркулирующих изолятов *M. genitalium*, сейчас активно ведутся во многих странах мира. По данным литературы, в Дании выделены 4 лабораторных изолята возбудителя (M2282, M2300, M2321, M2341), в Швеции — 5 изолятов (M6257, M6280, M6285, M6286, M6328), во Франции — 2 изолята (M6090, M6151), в Японии — 4 изолята (M6282, M6283, M6284, M6287). Следует отметить, что все они выделены от мужчин с негонококковым уретритом [50].

В целом же с момента открытия *M. genitalium* в 1981 г. и до настоящего времени удалось выделить и накопить лишь несколько штаммов возбудителя. В Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection — ATCC) хранятся 7 штаммов *M. genitalium* (G37, M30, R32, TW10-5G, TW10-6G, TW48-5G, UTMB-10G). Это количество незначительно по сравнению с таковым для других возбудителей урогенитальных инфекций (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* и др.), что, с одной стороны, значительно затрудняет экспериментальные исследования по моделированию инфекции *in vitro* (в культуре клеток) и *in vivo* (на лабораторных животных), а с другой — свидетельствует об актуальности и целесообразности выполнения научной работы, направленной на выделение и изучение молекулярно-биологических свойств циркулирующих в Республике Беларусь изолятов *M. genitalium*. Подобные исследования в Республике Беларусь до настоящего времени не проводились.

В связи со сложностями культивирования данного патогена многие исследования направлены на разработку метода изоляции, накопления и получения чистой культуры микроорганизма [62]. В доступной литературе имеются сообщения некоторых исследователей об успехе выделения *M. genitalium* на перевиваемых культурах клеток (Vero, McCoy, HeLa и др.) [69, 70 с. 116, 73]. Другие исследователи культивируют данного возбудителя в бесклеточных жидких питательных средах (SP4, Friis) или добавляя в эти среды агар или агарозу [74, 75], считая это способ наиболее эффективным. Также возможен комбинированный подход: на первых пассажах используют жидкие среды, а затем после фильтрации возбудитель накапливают на плотных средах — тиюгликолиевой среде или ВНИ агаре, либо перевиваемых культурах клеток [69].

Однако, несмотря на некоторые достижения в культивировании *M. genitalium*, продолжается поиск оптимальных условий для роста данного микроорганизма в клеточных культурах и на бесклеточных питательных средах. Основное внимание исследователей сосредоточено на выборе клеточной линии, подборе состава питательной среды, pH, дозы антибактериальных лекарственных средств для предотвращения роста сопутствующей микрофлоры, температуры культивирования. Поэтому исследования, направленные на разработку методических подходов культивирования *M. genitalium*, несомненно, имеют научную и практическую новизну.

Среди сред, пригодных для культивирования данного возбудителя, можно выделить несколько часто используемых. Так, известен способ получения модифицированной среды Хайфлика, заключающийся в том, что смешивают настой говяжьего сердца (Difco) — 2,85 г и дистиллиро-

ванную воду — 90 мл. Полученный раствор стерилизуют автоклавированием (121 °С, 20 мин, 1,5 атм.). Далее в простерилизованный раствор для получения агаризованной среды добавляют 1,4 г очищенного агара (L28, Oxoid) либо 0,6–0,8 % агара Нобеля (Difco). После тщательного перемешивания раствора в него добавляют сыворотку крови лошади — 20 мл, 25 % экстракт дрожжей — 10 мл, препарат ДНК (Sigma) — 1,2 мл, таллия ацетат (1 % раствор) — 1 мл, пенициллин; при контроле рН должна находиться на уровне 7,7 [70]. Данная среда пригодна для культивирования большинства видов микоплазм, в том числе и *M. genitalium*.

Недостатком данной среды является использование пенициллина в качестве антимикробного агента, т. к. большинство микроорганизмов сопутствующей микрофлоры, присутствующих в биологических образцах наряду с *M. genitalium*, устойчивы к действию данного препарата. В результате в культуре происходит размножение этих микроорганизмов и невозможно получение чистой культуры *M. genitalium*.

Известен способ получения среды, разработанной Г. Я. Каган и используемой в Научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (Москва, Российская Федерация). Данный способ заключается в том, что смешивают триптический гидролизат мышцы говяжьего сердца — 200 мл, мясную воду — 400 мл, 25 % дрожжевой экстракт — 100 мл, 0,5 % NaCl — 20 мл, воду водопроводную — 300 мл. После тщательного перемешивания добавляют сыворотку крови лошади — 20 мл, 40 % раствор аргинина — 20 мл, 40 % раствор глюкозы — 10 мл, пенициллин из расчета 100 ЕД/мл (конечная концентрация), таллия ацетат 1 : 2000 (конечная концентрация). Для трудно культивируемых штаммов рекомендуется добавлять 25 % раствор пептона — 2 мл, комплекс витаминов для среды «Игла» — 0,02 мл, НАД — 0,002 мл. НАД, таллия ацетат и аргинин разводят в дистиллированной воде, стерилизуют фильтрованием через фильтр с порами 220 нм. Проводят контроль рН, данный показатель должен быть равен 7,8. Для приготовления агаризованной среды перед автоклавированием добавляют агар — 30 мл (полужидкая среда) или 130 мл (полутвердая среда) [49]. Данная среда также пригодна для культивирования большинства видов микоплазм.

На территории Российской Федерации широко используется питательная среда «Микоплазма гениталиум-среда» (ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора»), пригодная для выявления глюкозоферментирующих микоплазм (в том числе *M. genitalium*), однако она не зарегистрирована в Республике Беларусь. Состав данной среды неизвестен.

Одной из лучших считается среда SP-4 (Hardy Diagnostics, США), для приготовления которой в 690 мл деионизированной воды добавляют панкреатический гидролизат козеина — 10,0 г, панкреатический гидролизат желатина — 5,0 г, питательную среду PPLO без кристаллического фиолетового — 3,5 г, полимиксин В — 50,0 мг, амфотерицин В — 5,0 мг, сыворотку плодов коров — 170,0 мл, среду CMRL 1066 (10X) — 50,0 мл, дрожжевой экстракт — 35,0 мл, раствор препарата дрожжей Yeastolate 10 % — 20,0 мл, пенициллин — 1,000,000 МЕ. Данная питательная среда широко используется за рубежом для культивирования *M. genitalium* [71].

#### **1.4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *Mycoplasma genitalium* С ИММУННОЙ СИСТЕМОЙ ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА**

Недостаточность и неэффективность терапевтических мероприятий при лечении микоплазменной инфекции может сопровождаться неполной элиминацией возбудителя из организма, что переводит острый инфекционный процесс в латентный [76–78]. При этом возбудитель переходит в некультивируемую форму и его идентификация классическими методами (культуральное исследование, серологическая диагностика) становится невозможной. В данной ситуации для выявления инфекционного агента применяют методы молекулярно-биологической диагностики.

Иммунная система организма человека способна элиминировать или сдерживать размножение патогенных микроорганизмов за счет неспецифических и специфических реакций. Влияние на иммунную систему различных внешних (стресс, сопутствующие инфекции) и внутренних (гормональный профиль) факторов приводит к активации инфекционного процесса.

Реакция иммунной системы на присутствие в организме микоплазм неоднозначна. Могут происходить как поликлональная стимуляция Т- и В-клеточного иммунитета, так и подавление активности отдельных звеньев локального и системного иммунитета с формированием иммунодефицитных состояний [57, 79]. Неспособность иммунной системы адекватно реагировать на внедрение микоплазм может быть связана с тесным мембранным контактом между клетками возбудителя и организма-хозяина, что приводит с одной стороны к невозможности клеткам иммунной системы идентифицировать чужеродные антигены и элиминировать возбудителя, а с другой стороны, возможен срыв толерантности в отношении собственных клеток.

Микоплазмы обладают рядом механизмов, направленных на ускользание от иммунного надзора организма-хозяина. Маленькие размеры возбудителей позволяют им избегать фагоцитоза, скрываясь в крипах

клеток организма-хозяина. Также у возбудителей существует возможность заблокировать начавшийся процесс фагоцитоза, он, как правило, остается незавершенным, и клетки возбудителя способны длительное время сохраняться в фагоцитах [80, 82].

Цитокины — полипептиды, которые синтезируются и секретируются, как правило, клетками иммунной системы, осуществляют регуляцию функций клеток при нормальных физиологических и при патологических процессах в организме. В первую очередь цитокины влияют на функции и активность клеток, участвующих в регуляции и формировании иммунного ответа. Для некоторых цитокинов существует физиологический уровень их продукции и содержания в тканях, что необходимо для нормального функционирования клеток. Синтез и продукция других цитокинов происходят только при формировании воспалительной реакции и иммунного ответа [41, 83].

Индукторами активного синтеза цитокинов клетками иммунной системы могут служить проникновение в организм инфекционных агентов, антигенная стимуляция или повреждение клеток организма. В ответ на стимуляцию происходит выработка цитокинов, которые оказывают локальное воздействие на ближайшие клетки-мишени. Передача сигнала происходит по принципу лиганд-рецепторного взаимодействия: после синтеза и секреции цитокина клеткой-продуцентом он связывается с соответствующим рецептором на клетке-мишени, передавая ей определенный сигнал [84].

Принимая во внимание тот факт, что основной функцией цитокинов является обеспечение межклеточных взаимодействий, они тем самым отвечают за процессы клеточной био-, хемо- и иммунорегуляции. Являясь регуляторными молекулами, цитокины обеспечивают рост, дифференцировку, активацию клеток, а также являются медиаторами провоспалительных и противовоспалительных реакций. Это позволяет выделить цитокины в отдельную регуляторную систему, которая вместе с нервной и эндокринной системами принимает участие в поддержании гомеостаза [76, 85].

Цитокины являются доминирующим фактором, регулирующим функциональную активность клеток, вовлеченных в иммунный ответ. В ходе течения инфекционных процессов в урогенитальном тракте клетки эндотелия и клетки иммунной системы продуцируют широкий спектр цитокинов: интерфероны (ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ), интерлейкины (ИЛ-1, 4, 6, 8), факторы некроза опухолей (ФНО- $\alpha$ ), факторы роста (трансформирующий фактор роста  $\beta$  — TGF $\beta$ ) [83, 84].

Для инфекционных процессов, обусловленных присутствием *M. genitalium*, характерно затяжное течение с минимальными клиниче-

ским проявлениями и длительной персистенцией возбудителя в урогенитальном тракте. Это стало основой гипотезы о том, что *M. genitalium* может ускользать от воздействия иммунной системы организма-хозяина. Если это действительно так, то вопрос о том, какие механизмы обеспечивают этому микроорганизму такие возможности, до сих пор остается спорным. К числу факторов, принимающих участие в «ускользании» от иммунного ответа, могут быть отнесены высокая вариабельность поверхностных антигенов возбудителя и его способность к внутриклеточной локализации [86–90].

Как показано на экспериментальных моделях *in vitro*, эпителиальные клетки в ответ на присутствие возбудителя продуцируют провоспалительные цитокины [88]. Развитие воспаления вызывает нарушение функций клеток эпителия урогенитального тракта, что может оказывать непосредственное влияние на состояние репродуктивного здоровья, а также служить фактором риска для увеличения восприимчивости к другим возбудителям ИППП.

### 1.5. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ МИКОПЛАЗМ

Патогенность возбудителя, являющуюся основным свойством любого инфекционного агента, можно определить как потенциальную способность микроорганизма вызывать развитие инфекционного процесса [42, 64]. Патогенность — генетически детерминированный признак, который определяет образование факторов вирулентности в зависимости от наличия в геноме микроорганизма конкретных генов.

Факторы вирулентности, в свою очередь, являются фенотипическим выражением патогенного генотипа и могут проявляться прямыми токсическими и косвенными (потенциальными) факторами патогенности. Молекулы адгезии обеспечивают прикрепление мико-уреаплазм к эпителиальным клеткам и поэтому являются одними их основных факторов вирулентности данных возбудителей.

Адгезины связываются с определенными структурами на поверхности клетки хозяина, причем возможность связывания для данной молекулы адгезина и сила взаимодействия определяются в значительной степени структурой адгезинов. В связи с этим различные мутации в генах, контролирующих синтез адгезинов, могут привести к конформационным изменениям молекул адгезии микоплазм, что может являться причиной как ослабления взаимодействия микроорганизмов с клетками организма-хозяина, так и определять формирование конформационно более подходящей структуры для взаимодействия с молекулярными комплексами на поверхности клетки хозяина [83].

Одним из основных факторов патогенности микоплазм являются адгезины [55, 83]. Адгезины — молекулярные структуры, которые локализуются на поверхности клеточных мембран возбудителя, основная функция которых заключается в обеспечении прикрепления микроорганизма к клеткам организма-хозяина. При попадании инфекционного агента в макроорганизм вначале происходит его неспецифическое связывание с клетками-мишенями, а уже затем формируется прочная связь между эукариотической и прокариотической клетками по лиганд-рецепторному принципу.

Для *M. genitalium* белок P140, отвечающий за адгезию возбудителя к клеткам эпителия уrogenитального тракта, является одним из ключевых компонентов цитоадгезии. Это было подтверждено в эксперименте с мутантными штаммами возбудителя, у которых ген P140 был выключен. Отсутствие протеина P140 в клетках *M. genitalium* приводило к неспособности возбудителя прикрепляться к клеткам-мишеням макроорганизма и потере вирулентности микроорганизмом [83].

В геноме микоплазм около 5 % приходится на гены, кодирующие адгезины. В этих генах, также как и в остальном геноме микоплазм, постоянно происходят процессы рекомбинации, что обуславливает изменение специфичности и аффинных свойств продуктов этих генов — адгезинов. Данный механизм также лежит в основе высокой антигенной изменчивости возбудителя. Однако у микоплазм эпитопы адгезинов, отвечающих за антигенные свойства, не идентичны участкам, отвечающим за адгезию.

Эпитопы адгезии находятся в однокопийных регионах генов и являются высоко консервативными. Этот механизм связан с закреплением их роли в распознавании микроорганизмом рецепторов клеток организма-хозяина в процессе колонизации [61, 83]. В свою очередь, иммунный ответ макроорганизма связан с распознаванием переменных эпитопов, которые не имеют непосредственного отношения к процессу адгезии. Поэтому не происходит образования антител, способных блокировать адгезию микоплазм, что частично объясняет механизм персистенции возбудителя.

К настоящему времени недостаточно изучены механизмы формирования и течения микоплазменных инфекций, причины и последствия длительной персистенции этих инфекционных агентов в уrogenитальном тракте у взрослых и у детей.

Определение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) является показателем активности протекания окислительных реакций и позволяет судить о развитии окислительного стресса [92]. Первичными продуктами ПОЛ являются диеновые конъюгаты (ацил-

гидроперекиси), которые быстро «деградируют» с образованием вторичных продуктов, к которым относят малоновый диальдегид (МДА). МДА является мутагеном и обладает выраженной цитотоксичностью [93]. Усиление процессов ПОЛ не только повреждает мембранные структуры клеток, но и приводит к образованию токсичных соединений, которые усугубляют повреждения в клетках организма хозяина [94].

Изменения показателей ПОЛ на фоне присутствия того или иного микроорганизма напрямую связаны со степенью патогенного влияния, которое он оказывает на клетки организма хозяина. Патогенный потенциал микроорганизмов обусловлен активностью генов, контролирующих формирование факторов вирулентности [93]. К этим факторам можно отнести гены, контролирующие синтез белков цитоадгезии, которые обеспечивают прикрепление клеток микроорганизма к клеткам организма хозяина [93–95].

Адгезины связываются с определенными структурами на поверхности клетки хозяина, причем возможность связывания для данной молекулы адгезина и сила взаимодействия определяются в значительной степени ее структурой. В связи с этим различные мутации в генах, контролирующих синтез адгезинов, могут привести к конформационным изменениям молекул адгезии микроорганизма, что может являться причиной как ослабления их взаимодействия с клетками организма хозяина, так и определять формирование оптимальной конформационной структуры для взаимодействия с молекулярными комплексами на поверхности клетки-мишени [95, 96].

*M. genitalium* прикрепляется к клеткам эпителия посредством комплексной структуры, известной как органелла прикрепления (attachment organelle). Данная структура состоит из цитоадгезинов и белков цитоадгезии. Белки цитоадгезии P140 и P110 кодируются генами *mg191* и *mg192*, входящими в состав MgPa оперона, и необходимы для образования и функционирования органеллы прикрепления. Мутации в генах *mg191* и *mg192* могут приводить к изменениям в продуктах данных генов [95–99].

К факторам вирулентности можно отнести также и способность микроорганизма синтезировать ферменты с антиоксидантными свойствами, которые обеспечивают защиту клеток возбудителя от воздействия бактерицидных защитных факторов, синтезируемых клетками организма хозяина. Для *M. genitalium* ключевую роль в формировании антиоксидантного потенциала играет функционирование гена *msrA* (methionine sulfoxide reductas A) [96]. Метионин-сульфоксид-редуктазная система является основой преобразования метионин-сульфоксидных изменений в белках, которые приводят к накоплению в клетках карбоилированных белков.

## 1.6. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ *Mycoplasma genitalium* К ОСНОВНЫМ ГРУППАМ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Активное использование антибактериальных лекарственных средств в терапии различных воспалительных заболеваний привело к росту числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, что делает актуальным изучение феномена антибиотикорезистентности, а также разработку методов определения устойчивости к антибиотикам у возбудителей [16, 64, 101, 102].

Развитие у микроорганизмов устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам может быть обусловлено морфологическими особенностями микроорганизмов. Еще одним механизмом является присутствие в геноме микроорганизма генетических детерминант, кодирующих белки, которые модифицируют или разрушают мишени, на которые направлено действие антибактериального лекарственного средства, или оказывают воздействие на мембрану клеток, делая невозможным проникновение лекарственного средства в клетку. Возникновение точечных мутаций в генах, кодирующих мишени антибактериальных лекарственных средств и транспортные белки, также может выступать механизмом формирования резистентности у микроорганизма [59, 103].

Присутствие в организме пациента инфекционного агента, устойчивого к действию антибактериальных лекарственных средств, определяет необходимость изменения лечебной тактики (замена лекарственного средства, изменение дозы лекарственного средства) [60]. В связи с этим важной задачей лабораторной службы является разработка и внедрение методов обнаружения у возбудителей маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам [104–111].

Для лечения инфекций урогенитального тракта, обусловленных *M. genitalium*, в настоящее время применяют три группы антибактериальных лекарственных средств: тетрациклины (доксциклин), макролиды (азитромицин, джозамицин, кларитромицин, эритромицин), фторхинолоны [104, 112, 113]. Чаще всего для проведения антибактериальной терапии инфекций, обусловленных *M. genitalium*, назначают макролиды. Однако по данным литературы, от 12 до 30 % пациентов являются носителями штаммов *M. genitalium*, устойчивых к лекарственным средствам группы макролидов [50, 77, 78].

Тетрациклины являются одной из первых открытых групп антибактериальных лекарственных средств, первые исследования были проведены в конце 40-х годов XX века. Механизм действия тетрациклинов основан на нарушении синтеза белка в клетке микроорганизма, что поз-

воляет получить бактериостатический эффект. Тетрациклины являются группой антибактериальных лекарственных средств с широким спектром активности. Их применение в клинической практике на сегодняшний день ограничено в связи с появлением большого количества микроорганизмов, резистентных к лекарственным средствам группы тетрациклинов, а также с многочисленными побочными эффектами, возникающими при их применении. В клинической практике в настоящее время применяют тетрациклин и полусинтетический препарат доксициклин [114 с. 352].

Генетическим маркером резистентности возбудителя к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов является наличие гена *tetM*.

Антибактериальные лекарственные средства группы макролидов классифицируются в зависимости от количества атомов углерода, включенных в лактонное кольцо, и подразделяются на 14-членные макролиды (эритромицин, кларитромицин), 15-членные макролиды (азитромицин), 16-членные макролиды (спирамицин, джозамицин). Так как токсичность данной группы антибактериальных лекарственных средств ниже, чем у других групп, их рекомендуют применять при лечении беременных женщин [50, 77, 78, 115, 116].

В основе антимикробного действия макролидов лежит нарушение синтеза белка на рибосомах клетки микробного агента. Как правило, макролиды оказывают бактериостатическое действие, но высокие концентрации препарата могут оказывать и бактерицидный эффект. Кроме того, лекарственные средства группы макролидов оказывают модулирующий эффект на иммунную систему и обладают противовоспалительным действием [117]. Исходя из литературных данных, мутации в гене 23S рРНК *M. genitalium* являются следствием нерациональной антимикробной терапии и приводят к формированию устойчивости возбудителя к действию лекарственных средств группы макролидов [77, 78, 115–117].

### **1.7. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ *MYCOPLASMA GENITALIUM***

Для диагностики инфекций, обусловленных *M. genitalium*, применяют серологические, культуральный, молекулярно-биологические методы исследования.

Принципы серологических методов основаны на выявлении антигенов возбудителя или антител, продуцируемых иммунной системой в ответ на проникновение возбудителя в организм. В качестве биологического материала используют сыворотку крови пациента. К этой груп-

пе методов относят реакцию агрегат-гемагглютинации, реакцию пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ, реакции прямой и непрямой иммунофлюоресценции и др. Однако высокая антигенная вариабельность *M. genitalium* снижает чувствительность серологических тестов при идентификации данного возбудителя.

Применение культурального метода для выявления *M. genitalium* в биологическом материале пациентов затруднено в связи со сложностями культивирования этого микроорганизма. Это связано с ограничением биосинтетических возможностей возбудителя из-за малого размера генома.

Метод ПЦР, обладая высокими показателями аналитической и диагностической пригодности, является основой диагностики инфекций, обусловленных *M. genitalium*.

### **Выводы**

1. Активное внедрение методов молекулярно-биологической диагностики в практическое здравоохранение привело к росту числа выявляемых случаев уrogenитального микоплазмоза, обусловленного *M. genitalium* (на 19,7 %). К числу отрицательных последствий инфицирования данным возбудителем можно отнести негативное влияние на репродуктивное здоровье населения, возникновение осложнений течения беременности и родов, возможность перинатального инфицирования новорожденных. Повышение эффективности лабораторной диагностики инфекций, обусловленных *M. genitalium*, является актуальной задачей лабораторной службы [127, 130, 147].

2. Развитие и совершенствование технологий в медицине приводит к упрощению процесса диагностического поиска инфекционных агентов, однако многие аспекты, касающиеся взаимодействий микроорганизмов и организма-хозяина, остаются неизученными, что мешает в полной мере понять механизмы, лежащие в основе развития инфекционного процесса, возможности длительной бессимптомной персистенции возбудителя в макроорганизме, факторов, оказывающих влияние на данные процессы [129, 133].

3. Успешное лечение уrogenитальных инфекций, обусловленных *M. genitalium*, зависит от адекватного назначения антибактериальных лекарственных средств. Рациональный выбор при этом должен быть основан на результатах лабораторных исследований. Выявление у микроорганизмов генетических детерминант устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам с использованием метода ПЦР позволяет быстро (в течение 3–4 часов) получать результаты и целесообразно проводить выбор курса антибиотикотерапии. Наиболее перспективным направлением является разработка методов на основе ПЦР-РВ в мульт-

типлексном формате, использование которых позволяет снизить затраты труда, времени и расходных материалов при выявлении у микроорганизмов генетических детерминант устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам [127, 133, 149].

## ГЛАВА 2 РАЗРАБОТКА СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM*

### 2.1. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И УСЛОВИЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM*

В группу исследования I было включено 36 беременных, в биологическом материале которых методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) определяли присутствие ДНК *M. genitalium*. Материалом для молекулярно-генетического анализа являлись соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала и уретры пациенток. В результате исследования у 8 пациенток (22,22 %) было обнаружено присутствие ДНК *M. genitalium*. Биологический материал от данных пациенток использовали для разработки состава питательной среды и оптимизации культурального метода выявления *M. genitalium*.

В качестве прототипа при разработке состава питательной среды для выявления *M. genitalium* была выбрана среда SP-4, которая широко применяется для культивирования *M. genitalium*, однако при ее использовании можно выделить ряд недостатков:

– данная питательная среда пригодна для выделения и культивирования различных видов микоплазм человека (*M. hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma spp.*), поэтому с ее использованием невозможно добиться получения чистой культуры *M. genitalium*, т. к. в биологических образцах *M. genitalium* может находиться в ассоциации с другими видами уrogenитальных микоплазм (*M. hominis*, *Ureaplasma spp.*). Это вынуждает применять дополнительные тесты для установления вида микоплазм, присутствующих в биологическом образце, а также затрудняет получение чистых изолятов *M. genitalium*;

– данная питательная среда не зарегистрирована в Республике Беларусь, и ее использование возможно только в рамках выполнения научных исследований;

– данная питательная среда является дорогостоящей, и ее использование экономически невыгодно.

В ходе разработки состава питательной среды, пригодной для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*, были апробированы 10 экспериментальных составов, отличающихся по количеству вносимых стимуляторов роста и составу антибактериального комплекса (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Прописи экспериментальных составов питательной среды

Название реагента	Питательная среда										
	SP-4	ПС-1	ПС-2	ПС-3	ПС-4	ПС-5	ПС-6	ПС-7	ПС-8	ПС-9	ПС-10
Основа микоплазматического бульона	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Триптон	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Пептон	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Среда «CMRL-1066» с глутамином, но без NaHCO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Дрожжевой экстракт	+	+	+	+	+						
Свежий дрожжевой экстракт	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Феноловый красный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Агароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Пенициллин	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ципрофлоксацин 0,2 мкг/мл	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Ципрофлоксацин 0,25 мкг/мл	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Полимиксин В	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Флуконазол	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Амфотерицин В	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Инулин	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Наилучшие результаты были получены при использовании состава питательной среды, для приготовления 100 мл которой брали: «Основа микоплазматического бульона» («Mycoplasma Broth Base») (Becton Dickinson, США) — 0,35 г, триптон (T9410, SIGMA) — 1 г, пептон (ЗАО «Беласептика», Республика Беларусь) — 0,53 г, глюкозу (РУПП «Экзон-глюкоза», Республика Беларусь) — 0,5 г, дистиллированную воду — 61,5 мл; pH раствора доводили с помощью 1 N NaOH (РУП «Белмед-препараты», Республика Беларусь) до 7,6–7,8; стерилизовали при 121 °C 15–20 минут, охлаждали при комнатной температуре.

Далее в раствор добавляли следующие стерильные компоненты: среду «СМRL-1066» с глутамином, но без  $\text{NaHCO}_3$  (ГУ «РНПЦ ЭИМ», Республика Беларусь) — 5 мл, свежий дрожжевой экстракт (25 %) (ОАО «Дрожжевой комбинат. Ошмянский дрожжевой завод», Республика Беларусь) — 3,5 мл, дрожжевой раствор (2 %) (ОАО «Дрожжевой комбинат. Ошмянский дрожжевой завод», Республика Беларусь) — 10 мл, эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (предварительно прогретую при 56 °С в течение 1 ч) (ГУ «РНПЦ ЭИМ», Республика Беларусь) — 17 мл, феноловый красный (0,1 %) (АО «Реахим», Российская Федерация) — 2 мл. Объем полученного раствора доводили до 100 мл 0,6 % агарозой (УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Республика Беларусь), добавляли ципрофлоксацин (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь) — 0,25 мкг/мл, полимиксин В (Xellia Pharmaceuticals ApS, Дания) — 500 мкг/мл, флуконазол (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь) — 50 мкг/мл, инсулин (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) — 0,05 ед./мл.

В состав предложенной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» ввели инсулин, который регулирует транспорт и метаболизм глюкозы, жирных кислот и аминокислот, стимулирует активность ряда ферментных процессов, тем самым улучшая размножение и рост клеток микроорганизма.

Также в состав предложенной питательной среды включен оптимальный антибактериальный комплекс, состоящий из ципрофлоксацина (в среде SP4 — пенициллин), флуконазола (в среде SP4 — амфотерицин В) и полимиксина В, который позволяет предотвратить размножение сопутствующей микрофлоры в образце (в том числе *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*) и получить чистую культуру *M. genitalium*.

После посева биологического материала питательную среду инкубировали при температуре 37 °С и атмосфере 10 % (vol/vol)  $\text{CO}_2$  в течение 3–21 суток. Контроль роста возбудителя в питательной среде осуществляли по изменению цвета рН-индикатора питательной среды с красной на желтую, что являлось свидетельством размножения *M. genitalium*, а также методом ПЦР-РВ [145–146].

## **2.2. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM* МГ-9 и МГ-20**

В ходе выполнения исследований проводилось внесение биологического материала пациенток группы исследования I, инфицированных *M. genitalium* (n = 8), как в среду сравнения (SP-4), так и разработанную

питательную среду. В результате было выделено, накоплено, охарактеризовано и депонировано два штамма возбудителя: МГ-9 и МГ-20 в титрах  $10^6$  и  $10^7$  КОЕ/мл соответственно. При этом не было выявлено отличий в характере роста анализируемых штаммов возбудителя на разработанной «Питательной среде для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» в сравнении со стандартной средой SP-4.

Результаты сравнительного анализа морфологии и ультраструктуры штаммов *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20, выделенных как на среде сравнения, так и на разработанной питательной среде, позволили установить значительный полиморфизм внеклеточных форм возбудителя. На обеих средах чаще всего визуализировались бактериальные структуры грушевидной или бокаловидной («бутылочной») формы со средними размерами 250–400 нм, соответствующие типичным вегетативным активно-пролиферирующим формам *M. genitalium* (рис. 2.1).

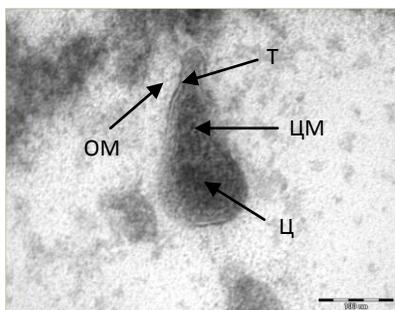


Рис. 2.1. Ультраструктурные особенности типичной бокаловидной формы *M. genitalium* (МГ-20):

ОМ — ограничивающая мембрана; ЦМ — цитоплазматическая мембрана; Ц — цитоплазма; Т — терминальная структура («bleb») (увеличение  $\times 300\,000$ )

Кроме типичных вегетативных форм *M. genitalium* на ультратонких срезах были зафиксированы также палочковидные и гантелеобразные формы (рис. 2.2, а), небольшие сферы (рис. 2.2, б), а также различные полигональные структуры возбудителя, ограниченные по периферии трехслойной мембраной. В ходе изучения был установлен полиморфизм выделенных штаммов *M. genitalium*. При электронной микроскопии визуализировались бактериальные структуры, соответствующие типичным вегетативным активно-пролиферирующим формам *M. genitalium*. На поверхности ограничивающей мембраны возбудителя были хорошо выражены такие элементы ультраструктуры как капсулоподобное образование и зернистые нитевидные образования, имевшие вид тонких диффузных отростков.

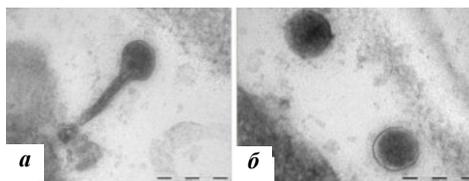


Рис. 2.2. Полиморфизм различных морфологических форм *M. genitalium* (МГ-9): а — гантелеобразная форма возбудителя (увеличение  $\times 300\,000$ ); б — возбудитель сферической, кокковидной формы (увеличение  $\times 300\,000$ )

Изучение репродуктивных особенностей выделенных штаммов *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20 проводили в культуре клеток *Vero*. Это позволило установить, что модельная система, основанная на первоначальном накоплении возбудителя в питательной среде с последующим внесением в культуру клеток, перспективна как для изучения особенностей морфогенеза, так и при анализе механизмов повреждающего воздействия на внутриклеточные органеллы клеток-мишеней.

По результатам сиквенс-анализа высоко консервативных регионов участков ДНК, кодирующих метионил-тРНК синтетазу, было установлено, что выделенные штаммы *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20 имеют 100 % гомологию с нуклеотидными последовательностями штаммов *M. genitalium* G-37 и M2288.

В ходе проведения исследований с использованием разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» и среды сравнения (SP-4) было накоплено, охарактеризовано и депонировано в «Специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека» ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» два штамма *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20).

Таким образом, разработанная питательная среда по своим свойствам не уступает среде сравнения (SP-4) и может быть использована для выявления и культивирования *M. genitalium*, а также для накопления возбудителя с последующим изучением его биологических свойств.

### **2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНЫХ ИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАННЫХ ШТАММОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM***

При проведении исследования использовали депонированные штаммы *M. genitalium*: МГ-9 (№ штамма В18/2013) и МГ-20 (№ штамма В19/2013) (ГУ «РНПЦ Эпидемиологии и микробиологии»).

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибактериальных лекарственных средств использовали метод серийных

разведений. МИК определяли как наименьшую концентрацию лекарственного средства, которая подавляет рост микроорганизма в питательной среде. Культивирование *M. genitalium* проводили в разработанной «Питательной среде для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» с 2-кратным разведением антибактериальных лекарственных средств (доксциклин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, левофлоксацин).

Для проведения эксперимента были выбраны антибактериальные лекарственные средства, применяемые для лечения инфекций, обусловленных *M. genitalium* [125]: тетрациклины — доксициклин; макролиды — эритромицин, азитромицин, кларитромицин; и лекарственное средство группы фторхинолонов — левофлоксацин. Антибактериальные лекарственные средства добавляли в «Питательную среду для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» в концентрациях от 0,001 до 2,0 мг/л (по 12 разведений для каждого лекарственного средства).

В качестве контрольных образцов использовали штаммы *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20, культивируемые с использованием «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» без добавления антибактериальных лекарственных средств.

В контрольной культуре штамма *M. genitalium* МГ-20 на 3 сутки эксперимента было зарегистрировано изменение цвета pH-индикатора питательной среды от красной до желтой, а в контрольной культуре штамма *M. genitalium* МГ-9 изменение цвета индикатора было зарегистрировано на 6 сутки. Различные сроки роста возбудителя в культуре можно объяснить изначально различными концентрациями *M. genitalium* в исходных накопленных культурах штаммов МГ-9 и МГ-20 ( $10^6$  КОЕ/мл и  $10^7$  КОЕ/мл соответственно). Таким образом, определение минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных лекарственных средств проводили на 3 сутки эксперимента для штамма МГ-20 *M. genitalium* и на 6 сутки — для штамма *M. genitalium* МГ-9. Полученные результаты по определению минимальных ингибирующих концентраций для изученных антибактериальных лекарственных средств представлены в табл. 2.2.

Таблица 2.2

**Результаты определения минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных лекарственных средств для штаммов *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20**

Лекарственное средство	МИК, мг/л	
	МГ-9	МГ-20
Доксициклин	0,5	1,0
Эритромицин	0,125	0,25
Азитромицин	0,002	0,002
Кларитромицин	0,031	0,063
Левофлоксацин	0,5	1,0

В результате анализа полученных при выполнении эксперимента данных было установлено, что все исследованные антибактериальные лекарственные средства позволили достичь угнетения роста штаммов *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20. При этом минимальные ингибирующие концентрации варьировали в пределах от 0,002 мг/л (для азитромицина) до 1,0 мг/л (для доксицилина и левофлоксацина).

Для азитромицина минимальная ингибирующая концентрация была определена на уровне 0,002 мг/л для обоих штаммов возбудителя; для кларитромицина — на уровне 0,031 мг/л для штамма МГ-9 и 0,063 мг/л для штамма МГ-20; для эритромицина — на уровне 0,125 мг/л для штамма МГ-9 и 0,25 мг/л для штамма МГ-20; для доксицилина и левофлоксацина — на уровне 0,5 мг/л для штамма МГ-9 и 1,0 мг/л для штамма МГ-20. Полученные более низкие значения минимальных ингибирующих концентраций для штамма *M. genitalium* МГ-9 можно объяснить тем, что концентрация возбудителя в накопленной культуре изначально была ниже ( $10^6$  КОЕ/мл), чем в культуре штамма *M. genitalium* МГ-20 ( $10^7$  КОЕ/мл).

Таким образом, в ходе проведения эксперимента с использованием культурального метода удалось установить, что депонированные штаммы *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20) чувствительны ко всем применяемым группам антибактериальных лекарственных средств (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), однако при применении лекарственных средств группы макролидов угнетение роста возбудителя достигается с использованием более низких концентраций лекарственных средств.

Контроль роста возбудителя в среде проводился также с использованием метода количественной ПЦР-РВ. При этом расчет уровня ингибирования роста *M. genitalium* проводился по формуле (2.1) [16 с.231]:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{\text{концентрация ДНК}_{\text{контр}} - \text{концентрация ДНК}_{\text{исслед}}}{\text{концентрация ДНК}_{\text{контр}}} \times 100 \%, \quad (2.1)$$

где % ингибирования — уровень ингибирования роста *M. genitalium* в процентах; концентрация ДНК<sub>контр</sub> — концентрация ДНК *M. genitalium* в контрольной культуре (без добавления антибактериального лекарственного средства); концентрация ДНК<sub>исслед</sub> — концентрация ДНК *M. genitalium* в исследуемой культуре (с добавлением антибактериального лекарственного средства в определенной концентрации).

Результаты, полученные при расчете уровня ингибирования роста возбудителя для минимальных ингибирующих концентраций каждого из тестируемых антибактериальных лекарственных средств, представлены в табл. 2.3, 2.4.

Таблица 2.3

**Результаты определения уровня ингибирования роста штамма *M. genitalium* МГ-9 антибактериальными лекарственными средствами**

Концентрация лекарственного средства	% ингибирования			
	3 суток	6 суток	9 суток	12 суток
Концентрация МГ-9 в контрольной культуре (×102)	6,1	9,3	10,1	12,8
Доксициклин 0,5	37,4	87,5	92,3	99,8
Эритромицин 0,125	26,1	42,3	84,7	99,9
Азитромицин 0,002	76,9	84,2	93,5	99,7
Кларитромицин 0,031	41,7	69,3	87,7	99,9
Левифлоксацин 0,5	31,2	78,2	99,8	–

Таблица 2.4

**Результаты определение уровня ингибирования роста штамма *M. genitalium* МГ-20 антибактериальными лекарственными средствами**

Концентрация лекарственного средства	% ингибирования			
	3 суток	6 суток	9 суток	12 суток
Концентрация МГ-20 в контрольной культуре (×103)	2,9	8,1	15,6	21,1
Доксициклин 1,0	31,8	78,4	97,1	99,9
Эритромицин 0,25	36,7	63,8	81,6	99,9
Азитромицин 0,002	78,8	89,1	99,7	-
Кларитромицин 0,063	54,3	75,1	81,9	99,8
Левифлоксацин 1,0	72,2	88,7	99,9	–

Определение концентраций ДНК *M. genitalium* в контрольной и исследуемых культурах проводили на 3, 6, 9 и 12 сутки выполнения экспериментальных исследований. По полученным в ходе выполнения количественной ПЦР-РВ данным был проведен расчет уровня ингибирования роста штаммов *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20 антибактериальными лекарственными средствами.

На основании результатов, полученных с применением количественной ПЦР-РВ, было установлено, что полное (100 %) угнетение роста изучаемых штаммов *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20) с использованием минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных лекарственных средств *in vitro* было достигнуто к 9–12 суткам эксперимента. Полученные результаты подтверждают необходимость рационального подхода не только при выборе антибактериального лекарственного средства и его дозировки при лечении инфекций урогенитального тракта, обусловленных присутствием *M. genitalium*, но также и при определении оптимальных сроков применения антибактериального лекарственного средства для успешной элиминации возбудителя и исключения возможности рецидивов инфекции или ее перехода в хроническую форму [132, 142].

#### 2.4. ВАЛИДАЦИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM* С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗРАБОТАННОЙ «ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM*»

Всего было обследовано 393 беременных с осложнениями течения беременности, у которых по клинической картине можно было предположить присутствие инфекционных агентов в урогенитальном тракте.

В структуре осложнений течения беременности были установлены: угроза прерывания беременности — у 80,39 % (n = 287) пациенток; фетоплацентарная недостаточность — у 11,76 % (n = 42) пациенток; внутриутробная задержка роста плода — у 6,72 % (n = 24) пациенток; гестоз — у 1,12 % (n = 4) пациенток.

В группу исследования I было включено 36 беременных, в биологическом материале которых методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) определяли присутствие ДНК *M. genitalium*. Материалом для молекулярно-генетического анализа являлись соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала и уретры пациенток. В результате исследования у 8 пациенток (22,22 %) было обнаружено присутствие ДНК *M. genitalium*. Биологический материал от данных пациенток использовали для разработки состава питательной среды и оптимизации культурального метода выявления *M. genitalium*.

Группу исследования II составили 357 беременных, в биологическом материале 33,89 % пациенток (n = 121) было обнаружено присутствие ДНК *M. genitalium* (по результатам ПЦР-РВ) (рис. 2.3).

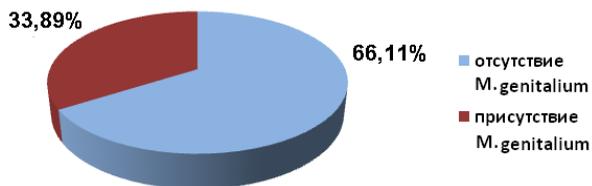


Рис. 2.3. Распределение частоты выявления *M. genitalium* в биологическом материале обследованных беременных пациенток методом ПЦР-РВ

Посев биологического материала пациентов группы исследования II, инфицированных *M. genitalium* (по результатам ПЦР-РВ) (n = 121), пациентов контрольной группы (n = 30), депонированных штаммов *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20), штамма *Ur. urealyticum*, штамма *M. hominis* проводили на разработанную «Питательную среду для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*».

В ходе выполнения валидации культурального метода выявления *M. genitalium* с применением разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» оценивали показатели аналитической чувствительности (предел обнаружения), аналитической специфичности (селективность), сходимости, воспроизводимости [70, 121].

Оценку аналитической чувствительности (предела обнаружения) проводили по минимальной концентрации *M. genitalium* в образце, которая может быть обнаружена с использованием «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*». Для этого проводили определение концентрации ДНК *M. genitalium* в контрольных штаммах возбудителя (МГ-9 и МГ-20) методом количественной ПЦР-РВ. Далее готовили разведения контрольных штаммов от  $10^7$  до  $10^2$  ГЭ/мл и проводили посев полученных разведений контрольных штаммов на «Питательную среду для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*». После инкубации в течение 21 суток проводили выявление ДНК *M. genitalium* в выращенных культурах методом ПЦР-РВ. Показатель аналитической чувствительности (предела обнаружения) при качественном выявлении *M. genitalium* с использованием «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» составил  $10^3$  ГЭ/мл.

Аналитическую специфичность метода оценивали по возможности:

– определять присутствие *M. genitalium* в контрольных штаммах *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20);

– определять присутствие *M. genitalium* в биологических образцах, где присутствуют другие возбудители инфекций, передающихся половым путем (*C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *Ur. urealyticum*, *M. hominis*);

– не определять присутствие *M. genitalium* в контрольных штаммах *Ur. urealyticum* (*Ur. urealyticum* VIII, паспорт штамма НИИЭиМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва), *M. hominis* (*Mycoplasma hominis* Н-34, паспорт штамма НИИЭиМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва);

– не определять присутствие *M. genitalium* в отрицательных контрольных образцах (стерильная дистиллированная вода).

На «Питательную среду для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» проводили посев:

– контрольных штаммов *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20) — посев проводили в триплетах;

– образцов биологического материала, в которых методом ПЦР-РВ была выявлена *M. genitalium* (n = 121), в том числе в ассоциации с *C. trachomatis* (n 1 8), *T. vaginalis* (n = 22), *Ur. urealyticum* (n = 19) или *M. hominis* (n = 2);

- контрольного штамма *Ur. urealyticum* — посев проводили в триплетах;
- контрольного штамма *M. hominis* — посев проводили в триплетах;
- образцов биологического материала, в которых методом ПЦР-РВ не была выявлена ДНК *M. genitalium* (контрольная группа, n = 30);
- отрицательных контрольных образцов (стерильная дистиллированная вода).

После культивирования в течение 21 суток в полученных культурах оценивали результаты выявления *M. genitalium* (визуально и методом ПЦР-РВ), результаты представлены в табл. 2.5.

Таблица 2.5

**Выявление *M. genitalium* в питательной среде после культивирования в течение 21 суток**

Образцы	Визуальный метод		Метод ПЦР-РВ	
	пол., % (n)	отр., % (n)	пол., % (n)	отр., % (n)
Штамм <i>M. genitalium</i> МГ-9 (n = 3)	100 (3)	0 (0)	100 (3)	0 (0)
Штамм <i>M. genitalium</i> МГ-20 (n = 3)	100 (3)	0 (0)	100 (3)	0 (0)
<i>M. genitalium</i> (n = 121)	78,51 (95)	21,49 (26)	78,51 (95)	21,49 (26)
<i>M. genitalium</i> и <i>Ch. trachomatis</i> (n = 18)	100 (18)	0 (0)	100 (18)	0 (0)
<i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> (n = 22)	100 (22)	0 (0)	100 (22)	0 (0)
<i>M. genitalium</i> и <i>Ur. urealyticum</i> (n = 19)	100 (19)	0 (0)	100 (19)	0 (0)
<i>M. genitalium</i> и <i>M. hominis</i> (n = 2)	100 (2)	0 (0)	100 (2)	0 (0)
Штамм <i>Ur. urealyticum</i>	0 (0)	100 (3)	0 (0)	100 (3)
Штамм <i>M. hominis</i>	0 (0)	100 (3)	0 (0)	100 (3)
Контрольная группа (n = 30)	0 (0)	100 (30)	0 (0)	100 (30)
Отрицательные контрольные образцы (n = 3)	0 (0)	100 (3)	0 (0)	100 (3)
$P \pm S_p$	79,53 $\pm$ 3,35			

При оценке аналитических характеристик разработанных методов статистическая обработка данных осуществлялась методом альтернативной вариации, где относительная доля положительно сработавших образцов  $p$  рассчитывалась по формуле 2.2:

$$p = \frac{p_1}{n} \times 100, \quad (2.2)$$

где  $p_1$  — количество положительно сработавших образцов;  $n$  — общее количество исследованных истинно положительных образцов. со средней статистической ошибкой  $S_p$ , которая рассчитывалась по формуле 2.3:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}}, \quad (2.3)$$

где  $p$  — относительная доля положительно сработавших образцов;  $n$  — общее количество исследованных образцов [122].

С целью подтверждения селективности «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» проводили с использованием метода ПЦР-РВ выявление ДНК микроорганизмов сопутствующей флоры (*C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *Ureaplasma spp.*, *M. hominis*, *Candida spp.*) в питательной среде после культивирования в течение 21 суток. В результате проведения ПЦР-анализа ДНК микроорганизмов сопутствующей флоры выявлено не было. Селективность «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» составила 100 %.

Критерием приемлемости при оценке аналитической специфичности было значение  $p$  не менее 75 % и отсутствие ДНК урогенитальных мико-, уреоплазм (*Ureaplasma spp.*, *M. hominis*) и других микроорганизмов сопутствующей флоры в культуре *M. genitalium*. Полученные результаты (рассчитанное значение  $p = 79,53 \pm 3,35$ , и отсутствие в ДНК сопутствующей флоры) позволили сделать вывод, что аналитическая специфичность (селективность) культурального метода выявления *M. genitalium* с использованием «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» соответствует критериям приемлемости.

Для определения диагностической значимости результатов тестов, полученных с использованием усовершенствованных культурального и молекулярно-биологического методов исследования, проводили определение диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), прогностической ценности положительного (ПЦ+) и отрицательного (ПЦ-) результатов теста.

Расчет ДЧ проводили по формуле 2.4:

$$\text{ДЧ} = [\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})] \times 100 \% , \quad (2.4)$$

где ИП — истинно положительные результаты теста; ЛО — ложно отрицательные результаты теста;

Расчет ДС проводили по формуле 2.5:

$$\text{ДС} = [\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})] \times 100 \% , \quad (2.5)$$

где ИО — истинно отрицательные результаты теста; ЛП — ложно положительные результаты теста.

Расчет ПЦ+ проводили по формуле 2.6:

$$\text{ПЦ+} = [\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛП})] \times 100 \% , \quad (2.6)$$

где ИП — истинно положительные результаты теста; ЛП — ложно положительные результаты теста.

Расчет ПЦ– проводили по формуле 2.7:

$$\text{ПЦ} = [\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛО})] \times 100 \%, \quad (2.7)$$

где ИО — истинно отрицательные результаты теста; ЛО — ложно отрицательные результаты теста [121].

Оценку сходимости метода проводили по выявлению *M. genitalium* в разведениях (от  $10^7$  до  $10^2$  ГЭ/мл) контрольных штаммов МГ-9 и МГ-20, посев которых проводил в одно и то же время один исследователь. Посев каждого разведения контрольных штаммов проводили в триплетах, после культивирования в течение 21 суток проводили визуальную оценку результата анализа и рассчитывали сходимость с применением метода альтернативной вариации (формулы 2.4, 2.5). Рассчитанное значение  $p$  составило  $95,8 \pm 8,59 \%$ , что соответствовало критерию приемлемости ( $p \geq 95 \%$ ).

Оценку воспроизводимости проводили по выявлению *M. genitalium* в разведениях (от  $10^7$  до  $10^2$  ГЭ/мл) контрольных штаммов МГ-9 и МГ-20, посев которых проводили два разных исследователя в разное время. Посев каждого разведения контрольных штаммов проводили в триплетах, после культивирования в течение 21 суток проводили визуальную оценку результата анализа и рассчитывали воспроизводимость с применением метода альтернативной вариации (формулы 2.2, 2.3). Рассчитанное значение  $p$  составило  $95,8 \pm 7,19 \%$ , что соответствовало критерию приемлемости ( $p \geq 95 \%$ ).

В ходе оценки диагностической значимости разработанного метода проводили расчет ДЧ, ДС (формулы 2.4, 2.5). Для расчета использовали результаты, полученные в ходе исследования биологического материала пациентов, инфицированных *M. genitalium* ( $n = 121$ ) и пациентов контрольной группы ( $n = 30$ ). В качестве референс-метода использовали метод ПЦР-РВ.

Результаты расчета данных показателей представлены в табл. 2.6.

Таблица 2.6

Результаты оценки диагностической надежности использования культурального метода выявления *M. genitalium* ( $n = 151$ )

ПЦР-РВ		Культуральные исследования			
n	%	n	%	ДЧ	ДС
121	$80,13 \pm 3,25$	95	$62,91 \pm 3,93$	78,51	100

Примечание: ДЧ — диагностическая чувствительность; ДС — диагностическая специфичность.

## 2.5. АПРОБАЦИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ *MYCOPLASMA GENITALIUM* НА КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Для проведения апробации культурального метода выявления *M. genitalium* с применением разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» использовали биологический материал пациенток группы исследования II, в биологическом материале которых методом ПЦР-РВ было установлено присутствие *M. genitalium* (n = 121).

В качестве положительных контрольных образцов использовали депонированные штаммы *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20 (ГУ «РНПЦ Эпидемиологии и микробиологии»). В качестве отрицательных контрольных образцов использовали стерильную дистиллированную воду.

Посев биологического материала (n = 121) и контрольных образцов (положительных и отрицательных) проводили на разработанную «Питательную среду для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» и питательную среду SP-4 (Hardy Diagnostics, США).

С использованием метода визуальной оценки результата в  $7,44 \pm 2,39$  % клинических образцов (n = 9), а также в положительных контрольных образцах (штаммы *M. genitalium* МГ-9 и МГ-20) изменения окраски были отмечены уже на 3 сутки проведения эксперимента в разработанной питательной среде и в  $9,09 \pm 2,61$  % (n = 11) образцов и положительных контролях — в среде сравнения (среда SP-4). На 21 сутки после инокуляции материала в  $78,51 \pm 3,73$  % (n = 95) образцов культивируемых с использованием разработанной питательной среды и среды SP-4 было отмечено изменение окраски, что свидетельствовало о росте *M. genitalium* (табл. 2.7). Дальнейшее культивирование с использованием разработанной среды и среды сравнения в течение 28 суток не привело к увеличению количества образцов, в которых происходило размножение *M. genitalium*.

Таблица 2.7

Динамика выявления *M. genitalium* с использованием  
визуального метода оценки результата

Сутки	Количество положительных образцов, % (n)	
	«Питательная среда для культивирования и выявления <i>Mycoplasma genitalium</i> »	Среда SP-4
3	$7,44 \pm 2,39$ (9)	$9,09 \pm 2,61$ (11)
7	$12,39 \pm 2,99$ (15)	$14,05 \pm 3,16$ (17)
14	$55,37 \pm 4,52$ (67)	$56,19 \pm 4,51$ (68)
21	$78,51 \pm 3,73$ (95)	$78,51 \pm 3,73$ (95)

С применением метода количественной ПЦР-РВ были определены показатели числа копий ДНК *M. genitalium* в питательных средах: на 14 сутки культивирования для среды SP-4 значение данного показателя

составило  $2,4 (0,15/8,42) \times 10^2$  ГЭ/мл; для разработанной питательной среды —  $3,1 (0,22/10,21) \times 10^2$  ГЭ/мл; на 21 сутки эксперимента значения концентраций ДНК возбудителя в среде SP-4 находились на уровне  $6,21 (2,52/10,4) \times 10^4$  ГЭ/мл, в разработанной питательной среде —  $8,42 (3,65/12,87) \times 10^4$  ГЭ/мл. Достоверных отличий количественных показателей уровня ДНК *M. genitalium* при использовании среды SP-4 и разработанной питательной среды выявлено не было (критерий Манна–Уитни,  $p = 0,58$ ) (табл. 2.8).

Таблица 2.8

**Значения концентраций ДНК *M. genitalium* в питательных средах, выявленные с использованием метода количественной ПЦР-РВ**

Сутки	Концентрация ДНК <i>M. genitalium</i> , Me (Q25/75) ГЭ/мл	
	«Питательная среда для культивирования и выявления <i>Mycoplasma genitalium</i> »	Среда SP-4
3	0,17 (0,1/4,22)	0,21 (0,13/2,14)
7	1,1 (0,2/5,12)	1,03 (0,3/4,51)
14	$3,1 (0,22/10,21) \times 10^2$	$2,4(0,15/8,42) \times 10^2$
21	$8,42 (3,65/12,87) \times 10^4$	$6,21 (2,52/10,4) \times 10^4$

В образцах, в которых не было зафиксировано изменение цвета питательной среды с применением метода ПЦР-РВ, не было зафиксировано нарастания концентрации ДНК *M. genitalium* [141, 135, 138, 139].

## **2.6. ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *MYCOPLASMA GENITALIUM* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ**

Для определения фенотипической устойчивости *M. genitalium*, присутствующей в клинических образцах, к действию антибактериальных лекарственных средств использовали метод серийных разведений с определением МИК.

С учетом различных вариантов инфицирования пациентки, у которых было установлено инфицирование *M. genitalium* — основная группа исследования, были разделены на три подгруппы: подгруппа 1 — 34 пациентки, в биологическом материале которых была выявлена ДНК *M. genitalium* в виде моно-инфекции; подгруппа 2 — 40 пациенток, в биологическом материале которых была выявлена ДНК *M. genitalium* в ассоциации с ДНК облигатно-патогенных микроорганизмов (ОПМ) (*C. trachomatis*, *T. vaginalis*); подгруппа 3 — 21 пациентка, в биологическом материале которых была выявлена ДНК *M. genitalium* в ассоциации с ДНК условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) (*Ur. urealyticum*, *M. hominis*).

В качестве биологического материала использовали соскобы эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала пациенток 1–3 под-

групп (n = 95). Посев проводили на разработанную «Питательную среду для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» с добавлением антибактериальных лекарственных средств: доксициклин (группа тетрациклинов) в концентрациях 0,5 мг/л, 1,0 мг/л и 2,0 мг/л; азитромицин (группа макролидов) в концентрациях 0,001 мг/л, 0,002 мг/л и 0,004 мг/л. Контроль роста возбудителя осуществляли визуально по изменению окраски питательной среды на 21 сутки эксперимента.

Исходя из анализа результатов, полученных в ходе исследования, установлено, что среди изученных образцов устойчивостью к доксициклину обладали 43,16 ± 5,08 % (n = 41) (табл. 2.9).

Таблица 2.9

**Результаты изучения фенотипической устойчивости *M. genitalium* к антибактериальным лекарственным средствам**

Показатель	Доксициклин	Азитромицин
Чувствительность к ЛС, % (n)	56,84 ± 5,08 (n = 54)	87,37 ± 3,41 (n = 83)
Устойчивость к ЛС, % (n)	43,16 ± 5,08 (n = 41)	12,63 ± 3,37 (n = 12)

Из 54 образцов, чувствительных к доксициклину, в 21 (38,89 ± 6,63 %) МИК составила 0,5 мг/л; в 31 (57,41 ± 6,73 %) — 1,0 мг/л; и в 2 (3,7 ± 2,57 %) — 2,0 мг/л.

Устойчивость к азитромицину была выявлена в 12,63 ± 3,37 % (n = 12) образцов. Из 83 изученных образцов, чувствительных к азитромицину, в 8 (9,64 ± 3,24 %) образцах МИК составила 0,001 мг/л; а в 75 образцах (90,36 ± 3,24 %) — 0,002 мг/л.

Проведенное исследование позволило установить, что частота выявления *M. genitalium*, фенотипически устойчивой к действию антибактериальных лекарственных средств группы тетрациклинов (доксициклин), в обследованных группах пациентов составила 43,16 ± 5,08 % (n = 41). При этом количество изолятов, устойчивых к действию доксициклина, в образцах пациентов подгруппы 1 составило 51,22 ± 7,81 % (n = 21), подгруппы 2 — 31,71 ± 7,27 % (n = 13), подгруппы 3 — 17,07 ± 5,88 % (n = 7). Достоверных отличий по данному показателю между группами установлено не было (p > 0,05, критерий  $\chi^2$  Пирсона).

Частота выявления *M. genitalium*, фенотипически устойчивой к действию антибактериальных лекарственных средств группы макролидов (азитромицин), в обследованных группах пациентов составила 12,63 ± 3,37 % (n = 12). При этом количество изолятов, устойчивых к действию азитромицина, в образцах пациентов подгруппы 1 составило 33,33 ± 13,61 % (n = 4), подгруппы 2 — 50,0 ± 14,43 % (n = 6), подгруппы 3 — 16,67 ± 10,76 % (n = 2). Достоверных отличий по данному показателю между группами установлено не было (p > 0,05, критерий  $\chi^2$  Пирсона).

В  $2,11 \pm 1,47$  % ( $n = 2$ ) образцов была выявлена устойчивость к действию обоих антибактериальных лекарственных средств (доксциклин и азитромицин).

Таким образом, впервые на территории Республики Беларусь выявлены изоляты *M. genitalium*, устойчивой к действию антибактериальных лекарственных средств групп тетрациклинов и макролидов, а также изучена частота их выявления среди беременных с осложнениями течения беременности и инфицированных *M. genitalium* [132].

### **Выводы**

1. Разработанный состав «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» дает возможность обнаруживать присутствие в биологическом материале *M. genitalium* при культивировании в течение 3–21 суток.

2. С использованием разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» и среды SP-4 накоплено, охарактеризовано (морфологические, ультраструктурные, генетические характеристики) и депонировано в «Специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека» ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» два штамма *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20).

3. Проведенное изучение фенотипической устойчивости депонированных штаммов *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20) с применением культурального метода позволило установить, что все рекомендованные для лечения инфекции уrogenитального тракта, обусловленной *M. genitalium*, группы антибактериальных лекарственных средств (тетрациклины, макролиды) позволяют достичь угнетения роста возбудителя *in vitro*. При этом минимальные ингибирующие концентрации для исследованных лекарственных средств находятся в пределах от 0,002 мг/л (макролиды) до 1,0 мг/л (тетрациклины), что подтверждает высокую активность и эффективность антибактериального действия лекарственных средств группы макролидов в отношении *M. genitalium*.

4. Применение метода количественной ПЦР-РВ позволило установить, что абсолютное угнетение роста *M. genitalium in vitro* достигается к 9–12 суткам эксперимента, что подтверждает необходимость адекватного выбора длительности применения антибактериального лекарственного средства для полной элиминации инфекционного агента.

5. Для культурального метода выявления *M. genitalium* с применением разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» установлены высокие значения показателей аналитической чувствительности ( $10^3$  ГЭ/мл), аналитической специфичности (79,53 %), сходимости (95,8 %), воспроизводимости

сти (95,8 %), диагностической чувствительности (78,51 %), диагностической специфичности (100 %).

6. Использование разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» дает возможность монокультур возбудителя, что важно при проведении работ по изучению свойств возбудителя.

7. Установлено, что частота выявления *M. genitalium*, фенотипически устойчивой к действию антибактериальных лекарственных средств группы тетрациклинов (доксциклин), в обследованных группах пациентов (беременные с осложнениями течения беременности и инфицированные *M. genitalium*) составила  $43,16 \pm 5,08$  % ( $n = 41$ ), частота выявления *M. genitalium*, фенотипически устойчивой к действию антибактериальных лекарственных средств группы макролидов (азитромицин) —  $12,63 \pm 3,37$  % ( $n = 12$ ).

### **ГЛАВА 3** **ИЗУЧЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ГЕНАХ,** **КОНТРОЛИРУЮЩИХ ФОРМИРОВАНИЕ ФАКТОРОВ** **ПАТОГЕННОСТИ *MYCOPLASMA GENITALIUM***

#### **3.1. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ** **ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *mg191*, *mg192* и *msrA*** ***MYCOPLASMA GENITALIUM***

В качестве биологического материала для усовершенствования метода анализа нуклеотидных последовательностей генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium* с применением секвенирования использовали депонированные штаммы возбудителя МГ-9 и МГ-20.

На первом этапе, с использованием программного обеспечения Vector NTI были подобраны пары праймеров (прямой — forward, обратный — reverse) для амплификации фрагментов генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium*:

*mg191-f* — GAAGTCTTGAGCCTTTCTAACCGC (forward),

*mg191-r* — GCCTCAGTAAACTCCTTCTCTGCC (reverse).

Данная пара праймеров позволяет амплифицировать специфический фрагмент гена *mg191* длиной в 930 п.о. Последовательность праймеров выбирали в соответствии с референсным штаммом *Mycoplasma genitalium* G37, complete genome; GenBank: L43967.2.

*mg192-f* — GCACTAGCCAATACCTTCCTTGTC (forward),

*mg192-r* — AGTTGGGTGATAACATTTCTTGGG (reverse).

Данная пара праймеров позволяет амплифицировать специфический фрагмент гена *mg192* длиной в 815 п.о. Последовательность праймеров выбирали в соответствии с референсным штаммом *Mycoplasma genitalium* G37, complete genome; GenBank: L43967.2.

*msrA*-f — GAACCATCGCTTCACCTACATGAC (forward)

*msrA*-r — CGTGACTTGGAACGCATTTGTG (reverse).

Данная пара праймеров позволяет амплифицировать специфический фрагмент гена *msrA* длиной в 1065 п.о. Последовательность праймеров выбирали в соответствии с референсным штаммом *Mycoplasma genitalium* G37, complete genome; GenBank: L43967.2.

Для проведения реакции амплификации в пробирку объемом 0,5 мл вносили:

15,0 мкл 2X Quick-Load Taq Master Mix (Праймтех, Республика Беларусь),

1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров,

10,9 мкл воды (Nuclease-free water, Qiagen, Германия),

25 мкл минерального масла,

3 мкл ДНК выделенной сорбентным методом из культуральной жидкости.

Состав амплификационной смеси был идентичен для всех генов и отличался только вносимой парой праймеров (для каждого гена).

Общий объем реакции амплификации составлял 55 мкл.

В соответствии с расчетной температурой отжига подобранных пар праймеров, а также с учетом длины амплифицируемых фрагментов были протестированы несколько режимов амплификации для каждого из изучаемых генов. При этом варьировали температуру отжига праймеров (от 54 °С до 58 °С), длительность этапа отжига праймеров (от 15 до 20 секунд), длительность этапа элонгации (от 20 до 30 секунд). Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», Российская Федерация).

Полученные в ходе амплификации фрагменты анализировали с применением метода электрофореза в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием. При этом оценивали уровень амплификации специфических (на уровне 930 п.о., Mass DNA Ladder, Qiagen, Германия) и неспецифических фрагментов ДНК в амплифицированном образце.

Наилучший результат амплификации для гена *mg191* был достигнут при использовании режима: 1 цикл: 95 °С — 15 мин; 45 циклов: 95 °С — 15 с, 55 °С — 20 с, 72 °С — 30 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин.

Наилучший результат амплификации для гена *mg192* был достигнут при использовании режима: 1 цикл: 95 °С — 15 мин; 45 циклов: 95 °С — 15 с, 55 °С — 15 с, 72 °С — 20 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин.

Наилучший результат амплификации для гена *msrA* был достигнут при использовании режима: 1 цикл: 95 °С — 15 мин; 45 циклов: 95 °С — 15 с, 56 °С — 20 с, 72 °С — 40 с; 1 цикл: 72 °С — 10 мин.

При использовании данных режимов амплификации на электрофореграммах присутствовали четкие полосы на уровне детекции специфических фрагментов, а уровень амплификации неспецифических фрагментов был незначительным.

После проведения этапа электрофореза из геля вырезали фрагменты, содержащие ампликоны, и извлекали из них ДНК с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия) для постановки секвенирующей ПЦР.

Секвенирующую ПЦР проводили с использованием forward-прайма для каждого гена и набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Амплификацию выполняли на термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Российская Федерация).

Полученные фрагменты ДНК подвергали очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Германия) и последующему анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США).

Полученные данные о нуклеотидной последовательности анализируемых генов сравнивали с зарегистрированными последовательностями генов в on-line поисковой системе BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)) для идентификации принадлежности той или иной последовательности к определенному гену.

Для зарегистрированных штаммов МГ-9 и МГ-20 совпадение нуклеотидных последовательностей генов *mg191*, *mg192* и *msrA* с зарегистрированными (*Mycoplasma genitalium* G37, complete genome, GenBank: L43967.2) находилось на уровне 100 %. Это позволило сделать вывод о том, что специфичность разработанного метода для анализа нуклеотидных последовательностей генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium* составляет 100 % [140].

### **3.2. АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *mg191*, *mg192* И *msrA MYCOPLASMA GENITALIUM* В КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ**

Для оценки наличия перестроек в генах *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium* были изучены нуклеотидные последовательности данных генов в образцах биологического материала пациентов основной группы, инфицированных *M. genitalium* (n = 95).

В качестве референсной использовали нуклеотидную последовательность *Mycoplasma genitalium* G37, complete genome, GenBank: L43967.2.

В ходе изучения нуклеотидных последовательностей генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium* были выявлены одно-, двух- и трехнуклеотидные замены в их структуре в  $18,95 \pm 4,02$  % ( $n = 18$ ) образцов (табл. 3.1). Все изученные образцы несли изменения только в одном из генов.

Таблица 3.1

Нуклеотидные замены в последовательностях генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium*

Ген	Количество замен	Замена	Количество образцов, n (%)
<i>mg191</i>	2	C145A A217C	6 ( $6,32 \pm 2,49$ )
	3	C145A A217C A243C	2 ( $2,11 \pm 1,48$ )
<i>mg192</i>	2	G117T T169C	4 ( $4,21 \pm 2,06$ )
	2	A203C G216A	2 ( $2,11 \pm 1,48$ )
<i>msrA</i>	1	A314G	4 ( $4,21 \pm 2,06$ )

Для гена *mg191* были выявлены: замена двух нуклеотидов (C145A и A217C) в 6 образцах ( $6,32 \pm 2,49$  %) и замена трех нуклеотидов (C145A, A217C и A243C) в 2 образцах ( $2,11 \pm 1,48$  %).

Для гена *mg192* были выявлены: замена двух нуклеотидов (G117T и T169C) в 4 образцах ( $4,21 \pm 2,06$  %), а также замена двух нуклеотидов (A203C и G216A) в 2 образцах ( $2,11 \pm 1,48$  %).

Для гена *msrA* была выявлена замена одного нуклеотида (A314G) в 4 образцах ( $4,21 \pm 2,06$  %).

У пациентов подгруппы 1 были выявлены замены одного нуклеотида в гене *msrA* ( $n = 3$ ). У пациентов подгруппы 2 были выявлены замены двух и трех нуклеотидов в гене *mg191* ( $n = 4$  и  $n = 2$  соответственно), замена двух нуклеотидов в гене *mg192* ( $n = 4$ ), а также замена одного нуклеотида в гене *msrA* ( $n = 1$ ). В образцах пациентов подгруппы 3 были выявлены замены двух нуклеотидов в генах *mg191* и *mg192* ( $n = 2$  и  $n = 2$ ) (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Распределение нуклеотидных замены в обследованных группах

Группа	Ген	Количество замен	n
Группа 1	<i>msrA</i>	1	3
Группа 2	<i>mg191</i>	2	4
		3	2
	<i>mg192</i>	2	4
	<i>msrA</i>	1	1
Группа 3	<i>mg191</i>	2	2
	<i>mg192</i>	2	2

Использование метода секвенирующей ПЦР для анализа нуклеотидных последовательностей генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium* позволило выявить нуклеотидные замены и точно определить их локализацию в данных генах, контролирующих формирование факторов патогенности возбудителя [140].

### **Выводы**

1. Усовершенствован метод анализа нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих формирование факторов патогенности *M. genitalium*, использование которого позволяет выявлять наличие нуклеотидных замен в участках генов *mg191*, *mg192* и *msrA* возбудителя. Аналитическая специфичность предложенного метода составляет 100 %.

2. Проведенный с использованием усовершенствованного метода анализ нуклеотидных последовательностей участков генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium* в образцах биологического материала позволил выявить наличие и локализацию нуклеотидных замен в этих генах.

3. Частота встречаемости различных геновариантов *M. genitalium* в биологическом материале пациентов обследованных групп с учетом выявленных перестроек в гене *mg191* составляет: замена двух нуклеотидов (С145А и А217С) —  $6,32 \pm 2,49$  %, замена трех нуклеотидов (С145А, А217С и А243С) —  $2,11 \pm 1,48$  %; в гене *mg192*: замена двух нуклеотидов (G117Т и Т169С) —  $4,21 \pm 2,06$  %, замена двух нуклеотидов (А203С и G216А) —  $2,11 \pm 1,48$  %; в гене *msrA*: замена одного нуклеотида (А314G) —  $4,21 \pm 2,06$  %.

## **ГЛАВА 4**

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ *Mycoplasma genitalium* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ**

#### **4.1. Усовершенствование метода одновременного выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов и макролидов**

В качестве биологического материала использовали соскобы эпителиальных клеток пациенток с моно-инфекцией уrogenитального тракта, обусловленной *M. genitalium* (метод ПЦР-РВ) (n = 8), у которых была выявлена фенотипическая устойчивость к доксициклину (n = 3; образцы № 1–3); к азитромицину (n = 3; образцы № 4–6); к обоим лекарственным средствам (n = 2; образцы № 7–8).

Включение в геном *M. genitalium* стрептококковой детерминанты устойчивости к тетрациклину (например, *tetM*) является результатом

переноса генов между филогенетически неродственными микроорганизмами. Наличие гена *tetM* является маркером резистентности возбудителя к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов [68].

Устойчивость к антибактериальным препаратам из группы макролидов у *M. genitalium* связана с нуклеотидными заменами в V домене гена 23S рРНК в позициях A2058, A2059 (*E. coli*). Наиболее частой нуклеотидной заменой является замена A2058G.

Исходя из изложенного, на первом этапе исследования были подобраны пары праймеров (forward и reverse) и TaqMan-зонды для гена *tetM* и измененного гена 23S рРНК (A2058G) *M. genitalium* с использованием программного обеспечения Vector NTI.

Для гена *tetM*:

*tet-f-5* — TGGACAAAGGTACAACGAGGACG,

*tet-r-5* — GCGTGTCTATGATGTTACCTTCG;

*tet-p-5* — FAM-TAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGA-BHQ1;

*Streptococcus suis* strain FX90 tetracycline resistance determinant (*tetM*) gene, complete cds; GenBank: GQ221244.1. Размер фрагмента 116 п.о.

Для измененного гена 23S рРНК (A2058G):

23S-f-2 — TGAAGACACCCGTTAGGCGCAA,

23S-r-2 — CGAACTTGCATCAATTGCTCCTACC;

23S-p-2 — ROX-GGAAAGACCCCGTGAAGCTTTACTG-BHQ1;

*Mycoplasma genitalium* strain G-37 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; GenBank: NR\_077054.1. Размер фрагмента 117 п.о.

Для изучения возможности использования подобранных пар праймеров и зондов для амплификации каждого из исследуемых генов проводили моноплексную ПЦР, отдельно для каждого гена. Для образцов 1–3 и 7–8 — амплификацию гена *tetM*, для образцов 4–6 и 7–8 — амплификацию измененного гена 23S рРНК (A2058G) (пробы ставили в дублях).

В пробируку объемом 0,2 мл вносили: 15,0 мкл 2X Quick-Load Taq Master Mix (Праймтех, Республика Беларусь), 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда, 10,9 мкл воды и 3 мкл выделенной ДНК. Общий объем реакции составлял 30 мкл. Состав амплификационной смеси был универсален для всех генов и различался только вносимыми парой праймеров и зондом.

Так как расчетная температура отжига всех пар праймеров была 59–62 °С, то для амплификации всех генов использовали универсальную программу. Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). Амплификацию проводили по следующей программе: 1 цикл: 95 °С — 5 мин; 40 циклов: 95 °С — 20 с, 60 °С — 20 с, 72 °С — 25 с.

Детекцию флуоресценции проводили по каналам Green (*tetM*) и Orange (23S рРНК (A2058G)).

После завершения амплификации проводили анализ кривых флуоресценции для определения значений пороговых циклов (СТ).

Если значения СТ по каналу Green находились в пределах 17–34 циклов, то делали заключение о наличии в образце гена *tetM* (генетический маркер устойчивости к лекарственным средствам группы тетрациклинов). Если значения СТ по каналу Orange находились в пределах 17–34 циклов, делали заключение о наличии в образце измененного гена 23S рРНК (A2058G) (генетический маркер устойчивости к лекарственным средствам группы макролидов). Во всех исследованных образцах значения Ст были получены в пределах установленных значений (17–34 цикла). В образцах 1–3 и 7–8 значения Ст были получены по каналу Green. В образцах 4–6 и 7–8 — по каналу Orange.

Дополнительно был проведен электрофоретический анализ полученных ампликонов с целью оценки уровня амплификации неспецифических фрагментов ДНК. Во всех образцах присутствовали четкие полосы фракции на уровне детекции специфических фрагментов.

Для оценки аналитической специфичности разработанного метода ДНК из геля после проведения электрофореза извлекли с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия) и проводили постановку секвенирующей ПЦР с дальнейшим анализом нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК.

Секвенирующую ПЦР проводили с использованием BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, США). Полученные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США).

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями анализируемых генов в on-line поисковой системе BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)) для идентификации принадлежности той или иной последовательности к определенному гену. Для всех проанализированных образцов совпадение нуклеотидных последовательностей находилось на уровне 100 %, что позволило сделать вывод о 100%-ной аналитической специфичности разработанного метода.

Исходя из анализа результатов амплификации, образцы 2 (ген *tetM*) и 6 (измененный ген 23S рРНК (A2058G)) были взяты для оценки эффективности протекания ПЦР, т. к. для этих образцов значения пороговых циклов амплификации были самыми низкими.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов ДНК с целью построения стандартной кривой. Концентрацию ДНК в неразведенном образце условно принимали за 100 и делали 10-кратные разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях.

Рассчитанные значения корреляции ( $R^2$ ) между значениями пороговых циклов СТ и  $\log_{10}$  условной концентрации ДНК в образце находились на уровне от 0,997 для гена *tetM* и 0,993 — для гена 23S рРНК. Показатели эффективности ПЦР составили 1,67 для гена *tetM* и 1,65 — для гена 23S рРНК (A2058G). Все полученные результаты представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Значения пороговых циклов, эффективности и корреляции для генов *tetM* и 23S рРНК (A2058G)

Ген	Значения пороговых циклов (Ct)						E	R <sup>2</sup>
	100		10		1			
	100.1	100.2	10.1	10.2	1.1	1.1		
<i>tetM</i>	25,41	25,62	29,28	29,22	35,17	35,48	1,67	0,997
23S рРНК	27,03	27,14	31,21	31,5	38,42	38,82	1,65	0,993

В качестве внутреннего контроля использовали house-keeping ген *M. genitalium gap* (кодирующий glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Определение house-keeping гена проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию исследуемых таргетных генов (*tetM* и 23S рРНК (A2058G)).

Для амплификации гена *gap* использовали специально подобранные праймеры и TaqMan-зонд:

*gap-f* — АСАСТГГААСАСГГАГТГАСАСАТСС,

*gap-r* — GCCACAACAACAGGAGCAGCTAA,

*gap-p* — JOE-AAGTTTGCCATTTGCTTCTGGAACA-BHQ2.

Размер фрагмента 114 п.о.

При выявлении в исследуемом материале по каналу Yellow (ген *gap*) значений СТ в пределах 17–34 циклов делали заключение о наличии *M. genitalium* в данном образце и возможности проведения дальнейшего анализа данных флуоресценции по каналам Green и Orange.

Оценка эффективности протекания реакции амплификации для выбранного референсного гена *gap* позволила установить, что при использовании подобранных пары праймеров, зонда и условий амплификации (которые были использованы и для таргетных генов) рассчитанное значение эффективности ПЦР составило 1,66.

Сравнение эффективностей протекания ПЦР для house-keeping гена *gap* и таргетных генов (*tetM* и 23S рРНК (A2058G)) позволило сделать

вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации всех трех генов в одной пробирке, т. к. отклонения показателей эффективности не превышали 0,2.

Далее была проведена оптимизация мультиплексной ПЦР, при которой в одной пробирке одновременно амплифицировали оба исследуемых гена (*tetM* и 23S рРНК (A2058G)) и house-keeping ген *gap*. При этом детекцию целевых генов проводили по каналам Green и Orange, т. к. зонды для данных генов были мечены флуорофором FAM и ROX, а детекцию гена *gap* проводили по каналу Yellow, т. к. зонд для него был мечен флуорофором JOE.

В пробирку объемом 0,2 мл вносили 15,0 мкл 2X Quick-Load Taq Master Mix (Праймтех, Республика Беларусь), 8,7 мкл воды, по 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда каждого из исследуемых генов (*tetM* и 23S рРНК (A2058G)), 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда гена *gap* и 3 мкл выделенной ДНК.

После тестирования нескольких режимов амплификации, в которых варьировали температура и длительность этапа отжига праймеров, был выбран режим амплификации: 1 цикл: 95 °С — 5 мин; 40 циклов: 95 °С — 25 с, 60 °С — 25 с, 72 °С — 25 с при использовании термоциклера «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия) [126, 131, 137, 144, 147].

#### **4.2. РАСЧЕТ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ТЕСТА ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ ГРУПП ТЕТРАЦИКЛИНОВ И МАКРОЛИДОВ**

В качестве материала для проведения исследования использовали образцы, полученные при культивировании *M. genitalium* с применением «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» в течение 21 суток (биологический материал от пациентов основной (n = 95) и контрольной (n = 30) групп) (см. гл. 2.4, 2.5).

Для расчета показателей диагностической чувствительности, диагностической специфичности, прогностической ценности положительно-го и отрицательного результатов разработанного метода в исследуемом материале проводили выявление генетических маркеров устойчивости *M. genitalium* к действию антибактериальных лекарственных средств групп тетрациклинов (ген *tetM*) и макролидов (измененный ген 23S рРНК (A2058G)) с использованием усовершенствованной мультиплексной ПЦР-РВ.

В качестве референсного метода использовали культуральный метод определения фенотипической устойчивости *M. genitalium* с приме-

нением «Питательной среды для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*» (n = 125) (см. гл. 3.6). Результаты, полученные в ходе проведения лабораторных тестов, представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

**Результаты определения фенотипической и генетической устойчивости *M. genitalium* в изолятах (n = 125)**

Фенотипическая устойчивость к доксициклину, % (n)	Присутствие <i>tetM</i> гена, % (n)	Фенотипическая устойчивость к азитромицину, % (n)	Анализ гена 23S рРНК, % (n)
32,8 ± 4,19 (n = 41)	28,0 ± 4,02 (n = 35)	9,6 ± 2,63 (n = 12)	8,8 ± 2,53 (n = 11)

Расчет показателей диагностической чувствительности, диагностической специфичности, прогностической ценности положительного и отрицательного результатов теста проводили по формулам 2.4–2.7.

Значения показателей диагностической специфичности и прогностической ценности положительного результата теста составили 100 % как при выявлении генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов, так и группы макролидов. Значения диагностической чувствительности и прогностической ценности отрицательного результата теста при выявлении генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов были определены на уровне 85,37 % и 93,33 % соответственно. Значения показателей диагностической чувствительности и прогностической ценности отрицательного результата теста при выявлении генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы макролидов были определены на уровне 91,67 % и 99,12 % соответственно.

Результаты расчета данных показателей представлены в табл. 4.3, 4.4.

Таблица 4.3

**Результаты оценки ДЧ, ДС, ПЦ+, ПЦ-метода выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов у *M. genitalium* (n = 125)**

Культуральный метод		Мультиплексная ПЦР-РВ					
n	%	n	%	ДЧ	ДС	ПЦ+	ПЦ-
41	32,8 ± 4,19	35	28,0 ± 4,02	85,37	100	100	93,33

Таблица 4.4

**Результаты оценки ДЧ, ДС, ПЦ+, ПЦ-метода выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы макролидов у *M. genitalium* (n = 125)**

Культуральный метод		Мультиплексная ПЦР-РВ					
n	%	n	%	ДЧ	ДС	ПЦ+	ПЦ-
12	9,6 ± 2,63	11	8,8 ± 2,53	91,67	100	100	99,12

### 4.3. АПРОБАЦИЯ МЕТОДА ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ ГРУПП ТЕТРАЦИКЛИНОВ И МАКРОЛИДОВ

В качестве биологического материала для выполнения исследований использовали соскобы эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала пациенток основной группы исследования ( $n = 95$ ), в которых проводили определение генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов и макролидов.

Анализ полученных в ходе исследования данных позволил установить, что генетические маркеры устойчивости к лекарственным средствам группы тетрациклинов присутствуют в  $56,84 \pm 5,08$  % образцов ( $n = 54$ ). При этом из 54 образцов присутствие *tetM* гена было обнаружено у 18 пациентов ( $33,33 \pm 4,84$  %) из подгруппы 1, у 27 пациентов ( $50,0 \pm 5,13$  %) из подгруппы 2, и у 9 пациентов ( $16,67 \pm 3,82$  %) из подгруппы 3.

Сопоставление результатов определения фенотипической устойчивости к доксициклину (см. главу 2.6) и молекулярно-генетического анализа позволило установить, что у пациентов из группы 1 (моно-*M. genitalium*-инфекция) фенотипическая устойчивость к доксициклину была выявлена у 21 пациента, а ген *tetM* был обнаружен в 18 образцах (табл. 4.5).

Таблица 4.5

Результаты определения устойчивости к доксициклину в обследованных группах пациентов

Группа	n	Фенотипическая устойчивость	Присутствие <i>tetM</i> гена
Подгруппа 1	34	21	18
Подгруппа 2	40	13	27
Подгруппа 3	21	7	9
Всего	95	41	54

Несовпадение результатов можно объяснить тем, что присутствие гена *tetM* является основным, но не единственным механизмом формирования устойчивости к лекарственным средствам группы тетрациклинов у микроорганизмов. Совпадение результатов при использовании культурального и молекулярно-генетического методов при обследовании пациентов подгруппы 1 составило  $85,71 \pm 3,59$  %.

В ходе анализа результатов, полученных при обследовании пациентов подгруппы 2, у которых *M. genitalium* присутствовала в биологическом материале в ассоциации с ОПМ, ген *tetM* был выявлен в образцах 27 пациентов, в то время как фенотипическая устойчивость *M. genitalium*

к доксициклину была обнаружена только в 13 образцах. Совпадение результатов при использовании культурального и молекулярно-генетического методов при обследовании пациентов подгруппы 2 составило  $48,15 \pm 5,12$  %.

У пациентов подгруппы 3 (ассоциация *M. genitalium* и УПМ) ген *tetM* был выявлен в образцах биологического материала 9 пациентов, а с использованием культурального метода устойчивость *M. genitalium* была обнаружена в образцах 7 пациентов. Совпадение результатов определения устойчивости к лекарственным средствам группы тетрациклинов при использовании культурального и молекулярно-генетического методов при обследовании пациентов подгруппы 3 составило  $77,78 \pm 4,27$  %.

Полученные данные можно объяснить присутствием в биологическом материале пациентов подгрупп 2 и 3 других возбудителей ИППП, которые также могут нести в своем геноме *tetM* ген. В ходе проведения молекулярно-генетических исследований происходит выделение и анализ суммарной ДНК (ДНК всех микроорганизмов, присутствующих в образце), в результате чего выявление *tetM* гена происходит независимо от того, в геноме какого из микроорганизмов он изначально присутствовал. При определении фенотипической устойчивости с использованием культурального метода в селективной среде может расти и размножаться только *M. genitalium*.

Генетические маркеры устойчивости к лекарственным средствам группы макролидов были выявлены в  $16,84 \pm 3,84$  % образцов ( $n = 16$ ). При этом из 16 образцов присутствие измененного гена 23S рРНК (A2058G) было обнаружено у 3 пациентов ( $18,75 \pm 4,01$  %) из подгруппы 1, у 9 пациентов ( $56,25 \pm 5,09$  %) из подгруппы 2, и у 4 пациентов ( $25,0 \pm 4,44$  %) из подгруппы 3.

Сопоставление результатов определения фенотипической устойчивости к азитромицину (см. главу 2.6) и молекулярно-генетического анализа позволило установить, что у пациентов из подгруппы 1 (моно-*M. genitalium*-инфекция) фенотипическая устойчивость к азитромицину была выявлена у 4 пациентов, а измененный ген 23S рРНК (A2058G) был обнаружен в 3 образцах (табл. 4.6).

Таблица 4.6

**Результаты определения устойчивости к азитромицину  
в обследованных группах пациентов**

Группа	n	Фенотипическая устойчивость	Анализ гена 23S рРНК
Группа 1	34	4	3
Группа 2	40	6	9
Группа 3	21	2	4
Всего	95	12	15

Несовпадение результатов можно объяснить тем, что выбранные для молекулярно-генетического анализа изменения в гене 23S рРНК (A2058G) являются основным, но не единственным механизмом формирования устойчивости к лекарственным средствам группы макролидов у микроорганизмов. Совпадение результатов при использовании культурального и молекулярно-генетического методов при обследовании пациентов подгруппы 1 составило  $75,0 \pm 4,44$  %.

В ходе анализа результатов, полученных при обследовании пациентов подгруппы 2, у которых *M. genitalium* присутствовала в биологическом материале в ассоциации с ОППМ, измененный ген 23S рРНК (A2058G) был выявлен в образцах 9 пациентов, в то время как фенотипическая устойчивость *M. genitalium* к азитромицину была обнаружена только в 6 образцах. Совпадение результатов при использовании культурального и молекулярно-генетического методов при обследовании пациентов группы 2 составило  $66,67 \pm 4,84$  %.

У пациентов подгруппы 3 (ассоциация *M. genitalium* и УППМ) измененный ген 23S рРНК (A2058G) был выявлен в образцах 4 пациентов, а с использованием культурального метода устойчивость *M. genitalium* была обнаружена в образцах 2 пациентов. Совпадение результатов при использовании культурального и молекулярно-генетического методов при обследовании пациентов подгруппы 3 составило  $50,0 \pm 5,13$  %.

Полученные данные можно объяснить присутствием в биологическом материале пациентов подгрупп 2 и 3 других возбудителей ИППП, которые также могут нести в своем геноме измененный ген 23S рРНК (A2058G).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что использование культурального метода с применением селективной питательной среды позволяет определять устойчивость именно *M. genitalium* к действию антибактериальных лекарственных средств. Метод молекулярно-генетического анализа позволяет выявлять генетические детерминанты, отвечающие за формирование антибиотикорезистентности у всей совокупности микроорганизмов, присутствующих в образце биологического материала. Однако необходимо принимать во внимание и тот факт, что присутствие в геноме микроорганизмов отдельных генетических маркеров является лишь одним из механизмов формирования устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам. Все это может обуславливать несовпадение результатов при определении фенотипической устойчивости с применением культурального метода и при использовании методов молекулярно-генетического анализа для выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности [131, 137].

В случае необходимости уточнения присутствия генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам именно в клетках *M. genitalium* необходимо использовать комбинированный метод, включающий культивирование *M. genitalium* на селективной питательной среде («Питательная среда для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*») с последующим выявлением генетических маркеров устойчивости в культуре возбудителя.

### **Выводы**

1. Усовершенствован метод одновременного выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов и макролидов у *M. genitalium* с использованием метода ПЦР-РВ. Аналитическая специфичность разработанного способа составляет 100 % (референс-метод — метод секвенирующей ПЦР).

2. ДЧ теста выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов (ген *tetM*) составила 85,37 %, ДС — 100 %, прогностическая ценность положительного результата теста (ПЦ+) — 100 %, прогностическая ценность отрицательного результата теста (ПЦ-) — 93,33 %. ДЧ теста выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы макролидов (измененный ген 23S рРНК (A2058G)) составила 91,67 %, ДС — 100 %, ПЦ+ — 100 %, ПЦ- — 99,12 %.

3. Частота выявления в биологическом материале беременных с осложнениями течения беременности и инфицированных *M. genitalium* генетических маркеров устойчивости к лекарственным средствам группы тетрациклинов составляет  $56,84 \pm 5,08$  %, группы макролидов —  $16,84 \pm 3,84$  %.

4. Среди образцов, в которых установлено присутствие *tetM* гена,  $33,33 \pm 4,84$  % составляли образцы с моно-инфицированием *M. genitalium*,  $50,0 \pm 5,13$  % — образцы с ассоциацией *M. genitalium* и ОПМ,  $16,67 \pm 3,82$  % — образцы с ассоциацией *M. genitalium* и УПМ.

5. Среди образцов с выявленными изменениями в гене 23S рРНК (A2058G)  $18,75 \pm 4,01$  % составляли образцы с моно-инфицированием *M. genitalium*,  $56,25 \pm 5,09$  % — образцы с ассоциацией *M. genitalium* и ОПМ,  $25,0 \pm 4,44$  % — образцы с ассоциацией *M. genitalium* и УПМ.

6. Совпадение результатов при использовании культурального и молекулярно-генетического методов определения устойчивости микроорганизмов к действию антибактериальных лекарственных средств составляет  $75,93 \pm 4,39$  % для группы тетрациклинов и  $80,0 \pm 4,1$  % — для группы макролидов, что можно объяснить присутствием в биологическом материале пациентов генетического материала других микроорганизмов, которые также могут нести генетические детерминанты устойчивости.

7. Использование культурального метода позволяет определять устойчивость именно *M. genitalium* к антибактериальным лекарственным средствам, в то время как метод молекулярно-генетического анализа позволяет выявлять генетические детерминанты, отвечающие за формирование антибиотикорезистентности у всей совокупности микроорганизмов, присутствующих в образце биологического материала.

8. С целью выявления присутствия генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам именно в клетках *M. genitalium* необходимо использовать комплексный метод, включающий культивирование *M. genitalium* на селективной питательной среде («Питательная среда для культивирования и выявления *Mycoplasma genitalium*») с последующим выявлением генетических маркеров устойчивости в культуре возбудителя.

## **ГЛАВА 5**

### **ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В УРОГЕНИТАЛЬНОМ ТРАКТЕ БЕРЕМЕННЫХ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *MYCOPLASMA GENITALIUM***

#### **5.1. ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ БИОХИМИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕСТОВ, ОТРАЖАЮЩИХ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В УРОГЕНИТАЛЬНОМ ТРАКТЕ БЕРЕМЕННЫХ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *MYCOPLASMA GENITALIUM***

В качестве биологического материала использовали слизь и соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта пациенток основной ( $n = 95$ ) и контрольной ( $n = 30$ ) групп.

С учетом различных вариантов инфицирования пациентки основной группы исследования были разделены на три подгруппы: подгруппа 1 — 34 пациентки, в биологическом материале которых была выявлена ДНК *M. genitalium* в виде моно-инфекции; подгруппа 2 — 40 пациенток, в биологическом материале которых была выявлена ДНК *M. genitalium* в ассоциации с ДНК облигатно-патогенных микроорганизмов (ОПМ) (*C. trachomatis*, *T. vaginalis*); подгруппа 3 — 21 пациентка, в биологическом материале которых была выявлена ДНК *M. genitalium* в ассоциации с ДНК условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) (*Ur. urealyticum*, *M. hominis*).

В контрольную группу были включены 30 практически здоровых беременных женщин без осложнений течения беременности, в биологическом материале которых не выявили ДНК возбудителей ИППП (метод ПЦР-РВ).

Медиана возраста пациентов составила 31,6 (20,4/41,3) лет.

Общими критериями включения пациенток в исследование были следующие:

– пациентки на сроке I – начало II триместра беременности, с осложнениями течения беременности инфекционной этиологии;

– пациентки, от которых получено информированное согласие на участие в исследовании;

Критериями исключения были следующие:

– пациентки с тяжелыми соматическими и психическими заболеваниями;

– пациентки, которым в период беременности была проведена местная или общая антибактериальная терапия;

– пациентки, которым в период беременности была проведена гормональная терапия.

В качестве биологического материала для определения биохимических и иммунологических показателей использовали слезь из уrogenитального тракта пациенток. Взятие биологического материала осуществляли с использованием ложки Фолькмана в пробирки объемом 1,5 мл (типа «эппендорф», Германия) до проведения мануального исследования. Материал сразу же доставляли в лабораторию. Отбирали ложкой Фолькмана из пробирки 0,5 г слизи. Взвешивание проводили в пробирках типа «эппендорф» (масса материала = (общая масса «эппендорфа» и материала) – (масса пустого «эппендорфа»)) (весы Adventurer, ОНАУС, Китай). Далее вносили в пробирку равное по массе количество стерильного физиологического раствора (0,9 % раствора хлорида натрия). Образцы биологического материала центрифугировали 3000 об./мин в течение 20 мин (центрифуга MPW55, Польша). Супернатант переносили в чистую пробирку и использовали для выполнения исследований [118, 119].

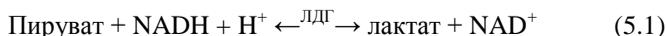
В биологическом материале проводили определение содержания первичных (ДК<sub>233</sub>) и вторичных (ДК<sub>278</sub>, МДА) метаболитов ПОЛ, активности ЛДГ, концентрации ДНК *M. genitalium*.

Принцип метода определения ДК<sub>233</sub> и ДК<sub>278</sub> основан на установлении их содержания в биологическом материале по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра (233 нм — диеновые конъюгаты; 278 нм — диенкетоны). Учет результатов при определении содержания диенкетонов и диенконъюгатов проводили с помощью спектрофотометра «UV-VIS спектрофотометр РВ 2201 Solar» (Республика Беларусь) [120]. Расчет проводили в единицах оптической плотности на 1 мл биологического материала, а также проводили пересчет содержания ДК<sub>233</sub> и ДК<sub>278</sub> с учетом разведения биологического материала в 2 раза.

Принцип метода определения МДА основан на образовании окрашенного комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты. Интенсивность окраски образованного комплекса измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре «Solar PV 1251» (Республика Беларусь) [120 с. 89, 121 с. 315]. Расчет концентрации МДА (мкмоль/л) проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА и разведения биологического материала в 2 раза.

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) проводили кинетическим методом с использованием зарегистрированного коммерческого диагностического набора для определения активности лактатдегидрогеназы Liquick Cor-LDH 30 (PZ CORMAY S.A., Польша).

Принцип метода основан на различии спектров поглощения окисленной и восстановленной форм NAD при 340 нм. Скорость окисления NADH в NAD<sup>+</sup> пропорциональна активности ЛДГ (формула 5.1):



Исследование проводили с использованием автоматического биохимического анализатора Dialab (Австрия). Расчет активности проводили с учетом разведения биологического материала в 2 раза.

В ходе анализа полученных данных установлено, что содержание первичных и вторичных метаболитов ПОЛ (ДК<sub>233</sub>, ДК<sub>278</sub> и МДА) достоверно выше в биологическом материале пациентов, инфицированных *M. genitalium*, в сравнении с показателями пациентов контрольной группы (тест Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ) (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Значения содержания продуктов ПОЛ, активности ЛДГ и уровня ДНК *M. genitalium* в биологическом материале пациентов обследованных групп

Показатель	Значения содержания, Me (min...max)				
	Основная группа исследования	Подгруппа 1	Подгруппа 2	Подгруппа 3	Контрольная группа
ДК <sub>233</sub> (усл. ед./мл)	1,92 (0,0...9,42)*	1,37 (0,0...5,31)*	2,6 (0,0...9,42)*	1,52 (0,0...3,15)	0,0 (0,0...5,31)
ДК <sub>278</sub> (усл. ед./мл)	0,21 (0,0...0,96)*	0,15 (0,0...0,67)	0,26 (0,0...0,96)*	0,19 (0,0...0,42)	0,0 (0,0...0,67)
МДА (мкмоль/л)	2,13 (0,26...11,65)*	1,77 (0,26...11,65)	2,46 (0,91...10,23)*	2,15 (0,62...4,12)*	1,44 (0,21...3,65)
ЛДГ (Е/л)	0,0 (0,0...91,0)*	0,0 (0,0...0,0)	0,0 (0,0...91,0)*	0,0 (0,0...0,0)	0,0 (0,0...0,0)
ДНК <i>M. genitalium</i> (ГЭ/л)	59,66 (0,05...902,19)	12,51 (0,05...85,32)	466,79 (83,89...902,19)	38,41 (0,06...134,2)	–

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

Сравнение значений изученных показателей с использованием критерия Краскала–Уоллеса позволило установить наличие достоверных отличий между значениями всех показателей для подгрупп 1–3 и контрольной группы (ДК<sub>233</sub> —  $p < 0,001$  ( $\chi^2 = 27,33$ ); ДК<sub>278</sub> —  $p = 0,001$  ( $\chi^2 = 17,58$ ); МДА —  $p = 0,004$  ( $\chi^2 = 13,33$ ); ЛДГ —  $p = 0,001$  ( $\chi^2 = 15,61$ )). Дальнейший попарный анализ с использованием критерия Манна–Уитни позволил выявить достоверные отличия между показателями подгруппы 2 (инфицирование *M. genitalium* и ОПМ) и контрольной группы для всех показателей, между показателями подгрупп 1 и 4 для ДК<sub>233</sub> и между показателями подгрупп 3 и 4 для МДА. Таким образом, на фоне присутствия в биологическом материале пациентов инфекционных агентов было установлено достоверное увеличение содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ (ДК<sub>233</sub>, ДК<sub>278</sub>, МДА), а также маркера повреждения клеток — ЛДГ. Изменения в значениях лабораторных показателей были наиболее выражены в подгруппе пациентов, инфицированных ассоциацией *M. genitalium* и ОПМ.

В ходе изучения нуклеотидных последовательностей генов *mg191*, *mg192* и *msrA* *M. genitalium* были выявлены одно-, двух- и трехнуклеотидные замены в их структуре в  $18,95 \pm 4,02$  % ( $n=18$ ) образцов (*Mycoplasma genitalium* G37, complete genome, GenBank: L43967.2) (см. главу 5).

Дальнейший анализ лабораторных показателей проводился, исходя из деления образцов в соответствии с выявленными вариантами реорганизации генома *M. genitalium*: отсутствие перестроек в изученных генах; замена одного нуклеотида (ген *msrA*); замена двух или трех нуклеотидов (гены *mg191*, *mg192*).

Анализ результатов значений содержания ДК<sub>233</sub> с использованием критерия Манна–Уитни позволил установить, что в образцах биологического материала, где присутствовала *M. genitalium* с двух- и трехнуклеотидными заменами в гене *mg191*, было выявлено достоверное увеличение содержания ДК<sub>233</sub> в сравнении с показателями в образцах, содержащих *M. genitalium* без перестроек в изучаемых генах ( $p = 0,003$ ).

Статистический анализ результатов определения уровня ДК<sub>233</sub> в образцах, содержащих *M. genitalium* с перестройками в гене *mg192*, позволил выявить достоверное увеличение значений данного показателя с уровнем статистической значимости  $p = 0,014$  в образцах, содержащих *M. genitalium* с заменами нуклеотидов в сравнении с аналогичными показателями в образцах без генетических перестроек.

Присутствие в биологическом материале *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *msrA* (ген антиоксидантного фермента) не было ассоциировано с достоверным изменением в значениях уровня ДК<sub>233</sub> ( $p = 0,39$ ) (табл. 5.2).

Таблица 5.2

**Значения содержания ДК<sub>233</sub> в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения содержания ДК <sub>233</sub> , Me (min...max), усл. ед./мл
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	1,78 (0,0...5,31)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	5,87 (4,68...6,01)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	8,08 (6,74...9,42)*
<i>msrA</i>	A314G	4	2,38 (1,13...3,11)

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

Применение критерия Манна–Уитни для анализа значений показателя ДК<sub>278</sub> позволило выявить его достоверное увеличение в образцах, в которых было выявлено присутствие *M. genitalium* с заменами двух и трех нуклеотидов в гене *mg191* ( $p = 0,003$  и  $p = 0,014$  соответственно) в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в исследуемых генах. Достоверное увеличение содержания ДК<sub>278</sub> было установлено в образцах, содержащих *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в генах *mg192* ( $p = 0,014$ ) и *msrA* ( $p = 0,015$ ) (табл. 5.3).

Таблица 5.3

**Значения содержания ДК<sub>278</sub> в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения содержания ДК <sub>278</sub> , Me (min...max), усл. ед./мл
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	0,19 (0,0...0,45)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	0,79 (0,62...0,87)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	0,88 (0,84...0,92)*
<i>msrA</i>	A314G	4	0,34 (0,25...0,67)*

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

В ходе статистического анализа с использованием критерия Манна–Уитни было установлено, что достоверное увеличение содержания МДА происходило в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium*

с нуклеотидными заменами в генах *mg191* ( $p = 0,003$ ), *mg192* ( $p = 0,016$ ) и *msrA* ( $p=0,012$ ) в сравнении с аналогичными показателями в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в изучаемых генах (табл. 5.4).

Таблица 5.4

**Значения содержания МДА в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения содержания МДА, Ме (min...max), мкмоль/л
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	1,89 (0,26...4,12)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	5,75 (5,03...6,47)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	9,45 (9,26...9,64)*
<i>msrA</i>	A314G	4	6,89 (5,88...11,65)*

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

Данные, полученные в ходе определения активности ЛДГ в биологическом материале пациентов, представлены в табл. 5.5.

Таблица 5.5

**Значения активности ЛДГ в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения активности ЛДГ, Ме (min...max), Е/л
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	0,0 (0,0...0,0)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	61,0 (52,0...84,0)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	82,0 (73,0...91,0)*
<i>msrA</i>	A314G	4	0,0 (0,0...0,0)

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

Результаты статистического анализа значений активности ЛДГ позволили выявить достоверное увеличение данного показателя в образцах, содержащих *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в генах *mg191* ( $p < 0,001$ ) и *mg192* ( $p < 0,001$ ), в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в изу-

чаемых генах (критерий Манна–Уитни). Присутствие в биологическом материале *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *msrA* не было ассоциировано с достоверным изменением в значениях активности ЛДГ.

В ходе анализа значений концентраций ДНК *M. genitalium* в соскобах эпителиальных клеток из урогенитального тракта пациенток было выявлено достоверное увеличение значений данного показателя в образцах биологического материала, в которых присутствовала *M. genitalium* с заменами в генах *mg191* ( $p = 0,003$ ) и *mg192* ( $p = 0,016$ ), в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в изучаемых генах (критерий Манна–Уитни). Для образцов, содержащих *M. genitalium* с перестройками в гене *msrA*, достоверных изменений в концентрации ДНК *M. genitalium* выявлено не было ( $p = 0,093$ ) (табл. 5.6).

Таблица 5.6

**Значения концентрации ДНК *M. genitalium* в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения концентрации ДНК <i>M. genitalium</i> , Me (min...max), ГЭ/л
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	71,98 (3,28...689,62)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	811,67 (795,33...828,01)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	756,69 (732,54...780,84)*
<i>msrA</i>	A314G	4	1,47 (0,6...710,32)

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

Таким образом, в образцах биологического материала, в которых присутствовала *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *mg191* ( $n = 8$ ), было установлено достоверное увеличение содержания ДК<sub>233</sub>, ДК<sub>278</sub>, МДА, активности ЛДГ, а также концентрации ДНК *M. genitalium* в сравнении с аналогичными показателями в образцах, содержащих *M. genitalium* без изменений в генах, контролирующих формирование факторов патогенности ( $n = 77$ ) (критерий Манна–Уитни).

Для образцов, в которых присутствовала *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *mg192* ( $n = 6$ ), было выявлено достоверное увеличение таких лабораторных показателей как ДК<sub>233</sub>, ДК<sub>278</sub>, МДА, активности ЛДГ, а также концентрации ДНК *M. genitalium* в сравнении с образцами, где присутствовала *M. genitalium* без изменений в генах ( $n = 77$ ) (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ).

Анализ наличия связи между частотой выявления нуклеотидных замен в участках генов *mg191*, *mg192* и *msrA M. genitalium* и различными вариантами ассоциаций *M. genitalium* (моно-*M. genitalium* инфекция, ассоциация *M. genitalium* и ОПМ, ассоциация *M. genitalium* и УПМ) проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия  $\chi^2$  Пирсона. В результате было установлено, что варианты инфицирования не связаны с частотой выявления нуклеотидных замен в генах *mg191*, *mg192* и *msrA* ( $p > 0,05$ ).

Выявленное в ходе исследования увеличение содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ (ДК<sub>233</sub>, ДК<sub>278</sub>, МДА) и активности ЛДГ на фоне присутствия *M. genitalium* с заменами двух или трех нуклеотидов в гене *mg191*, а также *M. genitalium* с заменой двух нуклеотидов в гене *mg192*, позволяет сделать вывод об усилении патогенного влияния возбудителя с данными генетическими особенностями на клетки организма-хозяина. Так как гены *mg191* и *mg192* отвечают за формирование факторов цитоадгезии возбудителя, то можно предположить, что эти изменения в генах приводят к усилению адгезивных свойств микроорганизма, тем самым способствуя накоплению возбудителя в очаге воспаления, что подтверждается достоверным увеличением концентрации ДНК *M. genitalium* в урогенитальном тракте ( $p < 0,05$ ).

ЛДГ является внутриклеточным гликолитическим ферментом, который содержится в большинстве тканей организма и участвует в обратимом превращении лактата в пируват. Обнаружение ЛДГ во внеклеточном пространстве является показателем повреждения плазматической мембраны клеток. Полученные в ходе проведения исследования результаты позволили установить, что в урогенитальном тракте пациентов, инфицированных *M. genitalium*, с перестройками в генах, контролирующим формирование белков цитоадгезии, происходит увеличение активности ЛДГ. Это подтверждает, что присутствие *M. genitalium* с данными генетическими особенностями ассоциировано с усилением процессов повреждения клеток организма-хозяина.

В образцах биологического материала, в которых содержалась *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *msrA* ( $n = 4$ ), было установлено достоверное увеличение содержания вторичных продуктов ПОЛ: ДК<sub>278</sub> и МДА (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ). Ген *msrA* отвечает за синтез фермента, обладающего антиоксидантными свойствами. Выявленное достоверное увеличение локального содержания вторичных продуктов ПОЛ, которое не сопровождается изменениями (уменьшением или увеличением) концентрации ДНК *M. genitalium* в урогенитальном тракте, позволяет предположить, что присутствие этого геноварианта возбудителя оказывает патогенное воздействие на клетки организма-

хозяина, вызывая активизацию процессов ПОЛ в репродуктивном тракте. Наряду с этим происходит усиление антиоксидантного потенциала самого возбудителя, что позволяет ему сохранять жизнеспособность и активно репродуктивный потенциал в очаге инфекции [130, 136].

## **5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЛИЗИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА БЕРЕМЕННЫХ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *Mycoplasma genitalium***

В качестве биологического материала использовали слизь из урогенитального тракта пациенток основной ( $n = 95$ ) и контрольной ( $n = 30$ ) групп. В биологическом материале методом иммуноферментного анализа проводили определение содержания цитокинов: ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , TGF- $\beta$ .

Для определения концентрации цитокинов использовали метод иммуноферментного анализа (для ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$  — тест-системы «Вектор-Бест», Российская Федерация; для TGF- $\beta$  — «Quantikine ELISA», R&D Systems). В основе метода иммуноферментного анализа лежит ферментативная реакция, которая происходит после добавления хромогенного субстрата к комплексу антитела и антигена, один из которых конъюгирован с ферментом. Субстрат расщепляется ферментом, что приводит к изменению цвета продукта реакции; при этом интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Исследования выполняли с использованием ИФА-анализатора «Имуноферментная система Sirio-Brio» (Италия), строго в соответствии с инструкцией производителя. Подсчет концентраций цитокинов проводили с учетом разведения биологического материала в 2 раза.

В ходе анализа полученных данных установлено, что содержание провоспалительных цитокинов ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$  достоверно выше в биологическом материале пациентов, инфицированных *M. genitalium*, в сравнении с показателями пациентов контрольной группы (группа 4) (тест Манна–Уитни,  $p > 0,05$ ) (табл. 5.7).

В результате анализа полученных данных с применением критерия Краскала–Уоллеса было установлено, что между показателями содержания ИЛ-8 в обследованных группах пациентов существуют достоверные различия с уровнем статистической значимости  $p < 0,001$  ( $\chi^2 = 80,72$ ) (табл. 5.7, рис. 5.1).

Значения содержания цитокинов в биологическом материале пациентов обследованных групп

Показатель	Значения содержания, Ме (min...max), нг/л				
	Основная группа исследования	Подгруппа 1	Подгруппа 2	Подгруппа 3	Контрольная группа
ИЛ-8	0,48 (0,15...0,67)*	0,43 (0,15...0,56)*	0,65 (0,26...0,67)*	0,39 (0,16...0,51)*	0,02 (0,0...0,09)
ИНФ- $\gamma$	0,41 (0,16...0,71)*	0,33 (0,16...0,39)*	0,51 (0,32...0,71)*	0,41 (0,21...0,64)*	0,08 (0,0...0,15)
ФНО- $\alpha$	2,97 (0,55...4,01)*	2,75 (1,68...4,01)*	3,38 (2,25...3,91)*	2,68 (0,55...3,21)*	0,77 (0,42...1,32)
ИЛ-4	0,75 (0,01...1,77)	1,48 (1,03...1,77)*	0,12 (0,01...0,52)*	0,84 (0,49...1,23)	0,46 (0,21...1,13)
TGF- $\beta$	19,02 (9,49...30,15)	25,17 (11,13...30,15) *	14,78 (9,49...19,25)	18,97 (12,45...24,37)	17,43 (12,24...20,92)

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

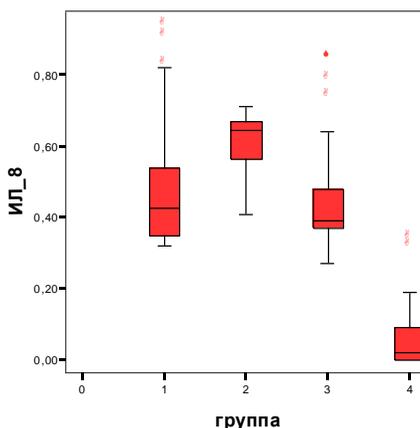


Рис. 5.1. Предел колебаний содержания ИЛ-8 в слизи урогенитального тракта пациентов обследованных групп

В ходе дальнейшего анализа было проведено сравнение показателей концентрации ИЛ-8 попарно между подгруппами с использованием критерия Манна–Уитни для сопоставления результатов, полученных в подгруппах пациентов с различными вариантами инфицирования *M. genitalium*. При этом различия в значениях концентрации ИЛ-8 были обнаружены между показателями содержания данного цитокина у паци-

ентов подгруппы 1 и контрольной группы ( $p < 0,001$ ), подгруппы 2 и контрольной группы ( $p < 0,001$ ), подгруппы 3 и контрольной группы ( $p = 0,002$ ). Таким образом, у пациентов, инфицированных *M. genitalium* в форме моно-инфекции или в ассоциации с другими возбудителями ИППП, концентрация ИЛ-8 в слизи урогенитального была достоверно выше в сравнении с аналогичным показателем пациентов контрольной группы. Также было установлено, что в биологическом материале пациентов подгруппы 2 концентрация ИЛ-8 была достоверно выше, чем у пациентов подгруппы 1 ( $p = 0,018$ , критерий Манна–Уитни).

ИЛ-8 является провоспалительным цитокином, синтезируемым макрофагами, эндотелиальными и эпителиальными клетками. Он выступает как хемотаксический фактор для Т-клеток и как фактор, активирующий нейтрофилы. ИЛ-8 инициирует экспрессию молекул межклеточной адгезии, тем самым усиливая прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным матричным белкам. Достоверное увеличение концентрации этого цитокина в биологическом материале пациентов, инфицированных *M. genitalium* как в форме моно-инфекции, так и в ассоциации с другими возбудителями ИППП, позволяет сделать вывод, что присутствие данного инфекционного агента приводит к активации ряда проявлений иммунных реакций и формированию воспаления в репродуктивном тракте. Достоверно более высокая концентрация ИЛ-8 была выявлена при ассоциации *M. genitalium* с ОПМ в сравнении с присутствием данного возбудителя в качестве единственного патологического агента, что может служить объяснением вялотекущего характера воспалительной реакции при моно-*M. genitalium*-инфекции.

Согласно результатам статистического анализа с использованием критерия Краскала–Уоллеса между показателями концентрации ИФН- $\gamma$  в обследованных группах пациентов обнаружены различия с уровнем статистической значимости  $p = 0,002$  ( $\chi^2 = 79,33$ ). При попарном сравнении показателей обследованных подгрупп с использованием критерия Манна–Уитни различия в концентрации ИФН- $\gamma$  были обнаружены между содержанием данного цитокина у пациентов подгруппы 1 и контрольной группы ( $p = 0,001$ ), подгруппы 2 и контрольной группы ( $p < 0,001$ ), подгруппы 3 и контрольной группы ( $p = 0,002$ ), при этом у пациентов основной группы исследования (подгруппы 1–3) концентрация ИФН- $\gamma$  была достоверно выше в сравнении с аналогичным показателем пациентов контрольной группы. Достоверное увеличение концентрации ИФН- $\gamma$  было установлено также для показателей пациентов подгрупп 2 и 3 в сравнении с показателями у беременных подгруппы 1 ( $p < 0,001$  и  $p = 0,021$  соответственно) (табл. 5.7, рис. 5.2).

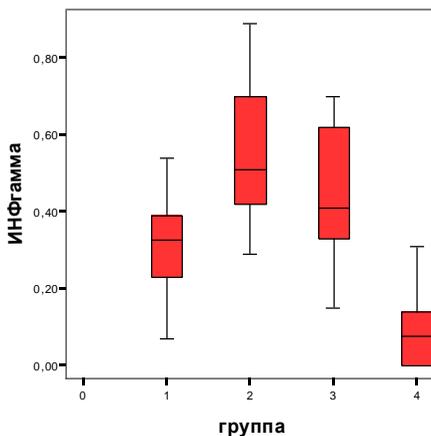


Рис. 5.2. Предел колебаний содержания ИНФ- $\gamma$  в слизи урогенитального тракта пациентов обследованных групп

ИНФ- $\gamma$  относится к интерферонам типа II, продуцируется активированными Т-хелперами 1-го типа и естественными киллерами (ЕК-клетками), оказывая антибактериальное действие, т. к. способен активировать в пораженной клетке ферменты, действие которых направлено на разрушение бактериальной клетки или на нарушение в ней метаболических процессов. Важной функцией интерферона является способность активировать макрофаги, что увеличивает эффективность ликвидации инфекционных агентов, локализованных внутриклеточно. Увеличение локального синтеза ИНФ- $\gamma$  при инфекции урогенитального тракта, обусловленной *M. genitalium*, можно связать со способностью данного возбудителя к внутриклеточной локализации, что и провоцирует усиление продукции ИНФ- $\gamma$  клетками иммунной системы.

Исходя из анализа полученных данных с использованием критерия Краскала–Уоллеса, между значениями концентрации ФНО- $\alpha$  в обследованных группах пациентов были выявлены различия с уровнем статистической значимости  $p < 0,001$  ( $\chi^2 = 76,5$ ).

Дальнейший анализ данных с использованием критерия Манна–Уитни для попарного сравнения между показателями обследованных подгрупп пациентов позволил установить наличие достоверных различий в концентрации ФНО- $\alpha$  между показателями подгруппы 1 и контрольной группы ( $p = 0,012$ ), подгруппы 2 и контрольной группы ( $p = 0,001$ ), подгруппы 3 и контрольной группы ( $p = 0,021$ ), при этом у пациентов 1, 2 и 3 подгрупп значения концентрации ФНО- $\alpha$  были достоверно более высокими в сравнении с показателями пациентов контрольной группы.

Достоверно более высокие показатели были выявлены в биологическом материале пациентов подгруппы 2 в сравнении с показателями пациентов подгруппы 1 ( $p = 0,022$ ) (табл. 5.7, рис. 5.3).

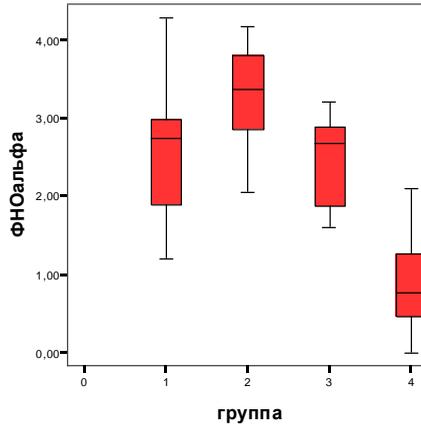


Рис. 5.3. Предел колебаний содержания ФНО- $\alpha$  в слизи урогенитального тракта пациентов обследованных групп

ФНО- $\alpha$  вырабатывается клетками разного типа: макрофагами, В- и Т-лимфоцитами. Его относят к провоспалительным цитокинам. ФНО- $\alpha$  усиливает синтез адгезивных молекул на эндотелиальных клетках, что способствует прикреплению нейтрофилов к стенке сосудов в местах воспаления. Вызывает респираторный взрыв в нейтрофилах, усиливает киллинговую активность фагоцитов. При высоких концентрациях он является важным медиатором, приводящим к развитию индуцированного эндотоксинами септического шока. Усиление синтеза данного цитокина при инфицировании *M. genitalium* подтверждает формирование очага воспаления и активацию иммунных реакций в репродуктивном тракте в ходе развития микоплазменной инфекции, причем независимо от наличия или отсутствия сопутствующих ОПС или УПС.

Результаты статистического анализа данных с использованием критерия Краскала–Уоллеса позволили выявить достоверные различия между показателями содержания ИЛ-4 в биологическом материале пациентов обследованных групп ( $p = 0,005$ ;  $\chi^2 = 61,39$ ). Попарное сравнение показателей с использованием критерия Манна–Уитни позволило выявить достоверные различия концентрации ИЛ-4 в биологическом материале пациентов подгруппы 1 и контрольной группы ( $p = 0,012$ ) с увеличением значений данного показателя в подгруппе 1, а также между показателями подгруппы 2 и контрольной группы ( $p = 0,023$ ) со

снижением концентрации этого цитокина у пациентов в подгруппе 2; между значениями показателей пациентов подгрупп 1 и 3 ( $p = 0,018$ ), 1 и 2 ( $p = 0,009$ ) с увеличением концентрации ИЛ-4 в слизи уrogenитального тракта женщин подгруппы 1 (табл. 5.7, рис. 5.4).

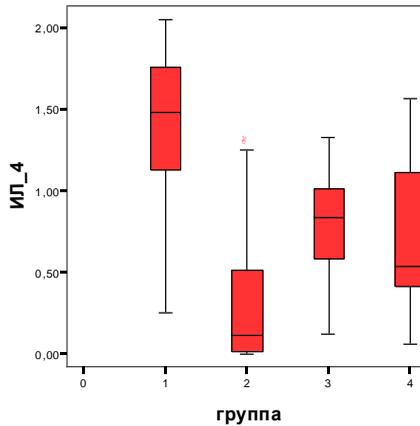


Рис. 5.4. Предел колебаний содержания ИЛ-4 в слизи уrogenитального тракта пациентов обследованных групп

ИЛ-4 является фактором, стимулирующим активность В-клеток. Его относят к противовоспалительным цитокинам, он подавляет синтез интерлейкинов-1, 6, 8 и фактора некроза опухоли, ингибирует цитотоксическую активность Т-клеток и макрофагов, способствует росту тканевых базофилов, стимулирует пролиферацию В-клеток. Достоверное увеличение концентрации этого цитокина в биологическом материале пациентов с моно-*M. genitalium*-инфекцией является признаком нарушения баланса межклеточных сигналов и свидетельствует о способности возбудителя имитировать угасание инфекционно-воспалительного процесса (что возможно связано со способностью *M. genitalium* к внутриклеточной локализации и изменению антигенного «репертуара»). В результате этого возникает нарушение нормального течения иммунных реакций, направленных на элиминацию возбудителя, и создается возможность для длительной персистенции инфекционного агента в репродуктивном тракте.

Анализ полученных данных с использованием критерия Краскала–Уоллеса позволил выявить различия между показателями содержания TGF- $\beta$  в биологическом материале обследованных групп пациентов с уровнем статистической значимости  $p = 0,004$  ( $\chi^2 = 44,2$ ). При попарном сравнении результатов с использованием критерия Манна–Уитни

было установлено наличие достоверных различий между показателями концентрации TGF- $\beta$  в слизи урогенитального тракта пациенток подгруппы 1 и контрольной группы ( $p = 0,024$ ) с увеличением значений данного показателя у пациентов подгруппы 1, а также между показателями пациентов подгрупп 1 и 2 ( $p 0,001$ ), 1 и 3 ( $p = 0,006$ ). При этом в обоих случаях концентрация TGF- $\beta$  были выше у пациентов подгруппы 1 (табл. 5.7, рис. 5.5).

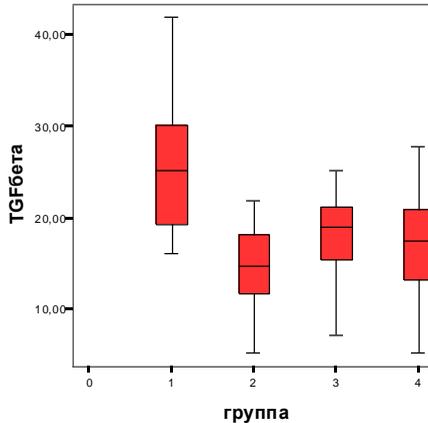


Рис. 5.5. Предел колебаний содержания TGF- $\beta$  в слизи урогенитального тракта пациентов обследованных групп

TGF- $\beta$  вырабатывается клетками различных типов, такими как В- и Т-лимфоциты и макрофаги. Основной функцией этого фактора является подавление роста и активности клеток иммунной системы: Т-клеток, нейтрофилов, макрофагов, В-клеток и ЕК-клеток. Таким образом, основная роль TGF- $\beta$  заключается в подавлении иммунной реакции, когда чужеродный агент ликвидирован, и увеличение концентрации этого цитокина при моно-*M. genitalium*-инфекции может служить подтверждением того, что биологические особенности возбудителя позволяют ему на определенном этапе развития инфекционного процесса «ускользнуть» от иммунного ответа организма-хозяина, инициируя тем самым механизмы подавления иммунных реакций, направленных на элиминацию инфекционного агента.

Увеличение концентрации провоспалительных цитокинов, таких как ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$ , происходит в репродуктивном тракте как пациентов, инфицированных *M. genitalium* в форме моно-инфекции, так и пациентов, у которых *M. genitalium* находится в ассоциации с другими возбудителями ИППП. Это позволяет сделать вывод о том, что присут-

ствии *M. genitalium* приводит к формированию воспалительных реакций в репродуктивном тракте, что служит обоснованием целесообразности выявления данного возбудителя даже при отсутствии клинических проявлений и жалоб со стороны пациента, особенно в ходе прегравидарной подготовки и на ранних сроках беременности.

Выявление достоверно более низких концентраций провоспалительных цитокинов и достоверно более высоких концентраций противовоспалительных цитокинов в группе пациентов, инфицированных *M. genitalium* в качестве единственного патологического агента, в сравнении с показателями пациентов, инфицированных ассоциацией *M. genitalium* и ОПМ, позволяет сделать вывод о меньшей выраженности воспаления и иммунного ответа при моно-*M. genitalium*-инфекции, что можно объяснить наличием у этого микроорганизма биологических особенностей, позволяющих ему «уклоняться» от иммунного ответа со стороны организма-хозяина.

Дальнейший анализ локальных иммунологических показателей проводился, исходя из деления образцов в соответствии с выявленными вариантами реорганизации генома *M. genitalium*: отсутствие перестроек в изученных генах; замена одного нуклеотида (ген *msrA*); замена двух или трех нуклеотидов (гены *mg191*, *mg192*) (см. глава 5). Для оценки перестроек в генах, контролирующих формирование факторов патогенности *M. genitalium*, применяли секвенирующую ПЦР.

Анализ результатов значений содержания ИНФ- $\gamma$  с использованием критерия Манна–Уитни позволил установить, что в образцах биологического материала, где присутствовала *M. genitalium* с двух- и трех нуклеотидными заменами в гене *mg191*, было выявлено достоверное увеличение содержания ИНФ- $\gamma$  в сравнении с показателями в образцах, содержащих *M. genitalium* без перестроек в изучаемых генах ( $p = 0,005$ ).

Статистический анализ результатов содержания ИНФ- $\gamma$  в образцах, содержащих *M. genitalium* с перестройками в гене *mg192*, позволил выявить достоверное увеличение значений данного показателя с уровнем статистической значимости  $p = 0,038$  в образцах, содержащих *M. genitalium* с заменами нуклеотидов, в сравнении с аналогичными показателями в образцах без генетических перестроек.

Присутствие в биологическом материале *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *msrA* не было ассоциировано с достоверным изменением в значениях уровня ИНФ- $\gamma$  ( $p = 0,16$ , критерий Манна–Уитни) (табл. 5.8).

Применение критерия Манна–Уитни для анализа значений содержания ФНО- $\alpha$  позволило выявить его достоверное увеличение в образцах, в которых было выявлено присутствие *M. genitalium* с заменами

двух и трех нуклеотидов в гене *mg191* ( $p = 0,008$ ), в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в исследуемых генах. Достоверное увеличение содержания ФНО- $\alpha$  было установлено также в образцах, содержащих *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *mg192* ( $p = 0,027$ ).

Таблица 5.8

**Значения содержания ИНФ- $\gamma$  в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения содержания ИНФ- $\gamma$ , Me (min...max), нг/л
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	0,41 (0,11...0,88)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	0,76 (0,68...0,89)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	0,71 (0,61...0,81)*
<i>msrA</i>	A314G	4	0,33 (0,16...0,59)

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

Присутствие в биологическом материале *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *msrA* не было ассоциировано с достоверным изменением в значениях уровня ФНО- $\alpha$  ( $p = 0,09$ , критерий Манна–Уитни) (табл. 5.9).

Таблица 5.9

**Значения содержания ФНО- $\alpha$  в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения содержания ФНО- $\alpha$ , Me (min...max), нг/л
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	2,85 (1,21...4,29)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	4,05 (4,01...4,18)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	3,87 (3,75...3,98)*
<i>msrA</i>	A314G	4	2,79 (1,25...3,09)

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

В ходе статистического анализа с использованием критерия Манна–Уитни было установлено, что достоверное снижение содержания ИЛ-4 происходило в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* с нуклео-

тидными заменами в генах *mg191* ( $p = 0,008$ ), *mg192* ( $p = 0,019$ ), в сравнении с аналогичными показателями в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в изучаемых генах (табл. 5.10).

Таблица 5.10

**Значения содержания ИЛ-4 в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения содержания ИЛ-4, Ме (min...max), нг/л
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	0,83 (0,53...2,01)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	0,0 (0,0...0,0)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	0,0 (0,0...0,0)*
<i>msrA</i>	A314G	4	1,58 (0,0...1,96)

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

Результаты статистического анализа значений содержания TGF- $\beta$  позволили выявить достоверное снижение значений данного показателя в образцах, содержащих *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в генах *mg191* ( $p = 0,006$ ) и *mg192* ( $p = 0,027$ ), в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в изучаемых генах (критерий Манна–Уитни). Присутствие в биологическом материале *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *msrA* не было ассоциировано с достоверным изменением в значениях содержания TGF- $\beta$  (табл. 5.11).

Таблица 5.11

**Значения содержания TGF- $\beta$  в биологическом материале при перестройках в генах *mg191*, *mg192*, *msrA* *M. genitalium***

Ген	Вариант реорганизации генома	n	Значения содержания TGF- $\beta$ , Ме (min...max), нг/л
	Отсутствие нуклеотидных замен в изучаемых генах	77	18,33 (5,24...37,22)
<i>mg191</i>	C145A + A217C или C145A + A217C + A243C	8	9,62 (8,24...11,24)*
<i>mg192</i>	G117T + T169C или A203C + G216A	6	8,96 (7,11...10,81)*
<i>msrA</i>	A314G	4	25,87 (13,24...30,28)

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в образцах, в которых присутствует *M. genitalium* без выявленных нуклеотидных замен (критерий Манна–Уитни).

В ходе проведения статистического анализа достоверных изменений значений локального содержания ИЛ-8 в образцах с различными геновариантами *M. genitalium* выявлено не было ( $p = 0,27$ , критерий Краскала–Уоллеса).

Таким образом, при сравнении значений содержания иммунных маркеров в слизи урогенитального тракта пациенток было выявлено достоверное увеличение содержания таких провоспалительных цитокинов как ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  с параллельным снижением содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и фактора роста TGF- $\beta$  в образцах биологического материала, в которых присутствовала *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в генах *mg191* ( $n = 8$ ) или *mg192* ( $n = 6$ ), в сравнении с аналогичными показателями в образцах, содержащих *M. genitalium* без изменений в генах, контролирующих формирование факторов патогенности ( $n = 77$ ) ( $p < 0,05$ , критерий Манна–Уитни).

Полученные данные позволили установить, что в присутствии *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в генах *mg191* и *mg192* в урогенитальном тракте беременных происходит усиление продукции провоспалительных цитокинов, что может быть обусловлено усилением патогенного потенциала возбудителя на фоне генетических перестроек. Таким образом, присутствие данных геновариантов *M. genitalium* стимулирует локальный иммунный ответ и усиливает воспаление в урогенитальном тракте [127, 134].

### **Выводы**

1. Установлены достоверные различия в значениях показателей локального содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ (ДК<sub>233</sub>, ДК<sub>278</sub>, МДА) и активности ЛДГ в слизи из урогенитального тракта беременных пациенток, инфицированных *M. genitalium* в форме моноинфекции или в ассоциации с другими возбудителями ИППП, и здоровых беременных пациенток (критерий Краскала–Уоллеса,  $p < 0,05$ ).

2. Выявлено достоверное увеличение локального содержания ДК<sub>233</sub>, ДК<sub>278</sub>, МДА и активности ЛДГ в слизи из урогенитального тракта беременных пациенток, инфицированных ассоциацией *M. genitalium* и ОПМ, в сравнении с показателями пациенток контрольной группы (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ). У беременных пациенток при моноинфицировании *M. genitalium* выявлено достоверное увеличение локального содержания ДК<sub>233</sub> в сравнении с аналогичным показателем пациенток контрольной группы (критерий Манна–Уитни,  $p = 0,045$ ).

3. В слизи урогенитального тракта беременных, где присутствовала *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в генах *mg191* или *mg192*, установлено достоверное увеличение содержания ДК<sub>233</sub> (5,87 (4,68...9,42) усл. ед.), ДК<sub>278</sub> (0,79 (0,62...0,92) усл. ед.), МДА (5,75

(5,03...9,64) мкмоль/л), общей активности ЛДГ (61,0 (52,0...91,0) Е/л), сопровождавшееся и достоверным увеличением концентрации ДНК *M. genitalium* (756,69 (732,54...828,01) ГЭ/л) [130] в сравнении с показателями в образцах, где присутствовала *M. genitalium* без изменений в генах, контролирующих формирование факторов патогенности (ДК<sub>233</sub> — 1,78 (0,0...5,31) усл. ед., ДК<sub>278</sub> — 0,19 (0,0...0,45) усл. ед., МДА — 1,89 (0,26...4,12) мкмоль/л, общая активность ЛДГ — 0,0 (0,0...0,0) Е/л, концентрация ДНК *M. genitalium* — 71,98 (3,28...689,62) ГЭ/л) (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ), что позволяет судить о значительном увеличении объема образования продуктов ПОЛ в присутствии *M. genitalium* с данными генетическими особенностями. Увеличение концентрации ДНК возбудителя может рассматриваться как признак усиления его адгезивных свойств.

4. Выявлено достоверное увеличение содержания вторичных продуктов ПОЛ (ДК<sub>278</sub> — 0,34 (0,25...0,67) усл. ед.; МДА — 6,89 (5,88...11,65) мкмоль/л) в слизи урогенитального тракта беременных, инфицированных *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в гене *msrA* (ген антиоксидантного фермента), в сравнении с показателями в образцах, где присутствовала *M. genitalium* без изменений в изучаемых генах (ДК<sub>278</sub> — 0,19 (0,0...0,45) усл. ед.; МДА — 1,89 (0,26...4,12) мкмоль/л) (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ). Выявленные изменения не сопровождались достоверным изменением концентрации ДНК *M. genitalium* ( $p > 0,05$ ).

5. Выявлено достоверное увеличение содержания провоспалительных цитокинов ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$  в слизи урогенитального тракта беременных инфицированных *M. genitalium* в сравнении с показателями пациентов контрольной группы (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ).

6. Достоверное увеличение локального содержания провоспалительных цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$ ) происходит в слизи урогенитального тракта беременных пациенток, инфицированных *M. genitalium* как в форме моно-инфекции, так и при ассоциации *M. genitalium* с другими возбудителями ИППП (ОПМ или УПМ) (критерий Краскала–Уоллеса,  $p < 0,05$ ).

7. В присутствии *M. genitalium* в качестве единственного патологического агента в урогенитальном тракте беременных установлено достоверно более низкое содержание ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$  в сравнении с присутствием данного возбудителя в составе ассоциации с ОПМ или УПМ, что может служить объяснением вялотекущего характера воспалительной реакции при моно-*M. genitalium*-инфекции (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ).

8. Выявлено достоверное увеличение концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и фактора роста TGF- $\beta$  в слизи урогени-

тального тракта беременных пациенток, инфицированных *M. genitalium* в форме моно-инфекции, в сравнении с аналогичными показателями беременных пациенток контрольной группы и беременных, инфицированных ассоциацией *M. genitalium* и ОПМ (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ), что позволяет сделать вывод об активации процессов угнетения иммунных реакций при моно-*M. genitalium*-инфекции.

9. Установлено достоверное увеличение локального содержания ИФН- $\gamma$  (0,71 (0,61...0,89) нг/л) и ФНО- $\alpha$  (3,87 (3,75...4,18) нг/л) с одновременным достоверным снижением локального содержания ИЛ-4 (0,0 (0,0...0,0) нг/л) и TGF- $\beta$  (8,96 (7,11...11,24) нг/л) в слизи уrogenитального тракта беременных, инфицированных *M. genitalium* с нуклеотидными заменами в генах *mg191* и *mg192*, в сравнении с аналогичными показателями у пациентов, в образцах которых присутствовала *M. genitalium* без нуклеотидных замен в изучаемых генах (ИФН- $\gamma$  — 0,41 (0,11...0,88) нг/л, ФНО- $\alpha$  — 2,85 (1,21...4,29) нг/л, ИЛ-4 — 0,83 (0,53...2,01) нг/л, TGF- $\beta$  — 18,33 (5,24...37,22) нг/л) (критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ), что позволяет сделать вывод об усилении выраженности в урогенитальном тракте воспалительных иммунных реакций в присутствии возбудителя с данными генетическими особенностями.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ (РАЗДЕЛ 1)

1. Информационный бюллетень № 110 ноябрь 2013 г. [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. Режим доступа: <http://www.who.int>. Дата доступа: 25.01.2015.
2. Официальный статистический сборник Министерства здравоохранения за 2013 г. [Электронный ресурс] / Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Режим доступа: <http://minzdrav.gov.by>. Дата доступа: 25.01.2015.
3. История становления медицинской помощи по кожным, венерическим болезням и косметологии в Республике Беларусь / Белорусская общественная организация дерматологов и косметологов ; ред.-сост.: В. П. Адашкевич, А. Л. Навроцкий. Минск : Изд. А. Н. Вараксин, 2015. 197 с.
4. Исследование информированности молодежи о профилактике инфекций, передаваемых половым путем / С. П. Сивакова [и др.] // Вторая белорусско-польская конференция: дерматология без границ : сб. материалов, Гродно, 21 марта 2015 г. / Гродненский государственный медицинский университет, Белорусская общественная организация дерматовенерологов и косметологов, Гданьский медицинский университет ; под ред. Д. Ф. Хворик. Гродно, 2015. С. 168–172.
5. Андреев, С. В. Социально-гигиенические риски возникновения инфекций, передающихся преимущественно половым путем / С. В. Андреев, Н. П. Сетко, Л. Г. Воронина // Здоровье населения и среда обитания. 2015. № 1. С. 35–37.
6. Иваха, И. И. Выявляемость венерических заболеваний у лиц, проходящих профилактические осмотры / И. И. Иваха, И. А. Ковкель // Дерматовенерология и косметология Беларуси: настоящее и будущее : материалы 8-го съезда дерматовенерологов Беларуси, Брест, 9–10 июня 2016 г. Брест, 2016. С. 116–118.

7. *Спиридонов, В. Е.* Особенности организации диагностики и лечения урогенитальных инфекций в современных условиях / В. Е. Спиридонов, А. М. Майстренок // Традиции и инновации в дерматовенерологии и косметологии : материалы Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 70-летию образования каф. дерматовенерологии и косметологии БелМАПО, г. Минск, 25 марта 2016 г. / Белорусская медицинская академия последипломного образования ; редкол.: М. А. Герасименко [и др.]. Минск, 2016. С. 132–134.

8. *Кузнецов, О. Е.* Аспекты лабораторной диагностики инфекций урогенитального тракта / О. Е. Кузнецов, И. Г. Земляной // Актуальные вопросы перинатологии : сб. науч. тр. обл. юбил. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 70-летию УЗ «Гродненский областной клинический перинатальный центр», Гродно, 23 окт. 2015 г. / Гродненский областной клинический перинатальный центр, Гродненский государственный медицинский университет ; редкол.: Л. В. Гутикова [и др.]. Гродно, 2015. С. 247–252.

9. *Анфилова, М. Р.* Ценность определения сывороточных концентраций молекул межклеточной адгезии для прогнозирования течения воспалительных процессов у женщин с монобактериальными урогенитальными инфекциями, вызванными *S. trachomatis*, *U. urealyticum* и *M. genitalium*. / М. Р. Анфилова // Дерматовенерология. Косметология. 2016. № 2. С. 228–236.

10. *Панкратов, В. Г.* Заболеваемость сифилисом, ВИЧ-инфекцией и другими ИППП в Республике Беларусь: исторические, эпидемиологические и прогностические аспекты / В. Г. Панкратов, А. Л. Навроцкий, О. В. Панкратов // Бел. мед. журн. 2009. № 2. С. 2–6.

11. *Информационный бюллетень* главного внештатного специалиста по дерматовенерологии комитета по здравоохранению Мингорисполкома, главный врач учреждения здравоохранения «Городской клинический кожно-венерологический диспансер» Е. В. Коваленко [Электронный ресурс] / Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Режим доступа: <http://www.3gdp.by>. Дата доступа: 25.01.2015.

12. *Соловей, Н. В.* Обзор современных рекомендаций по лечению инфекций, передающихся половым путем / Н. В. Соловей, Т. С. Протасевич // Медицинские новости. 2015. № 8. С. 25–29.

13. *Взгляд* клинического фармаколога на лечение урогенитальных инфекций / Л. Н. Ветошкина [и др.] // Русский медицинский журнал. 2015. № 19. С. 1137–1141.

14. *Федеральные* клинические рекомендации по ведению больных урогенитальными заболеваниями, вызванными *Mycoplasma genitalium* / Российское общество дерматовенерологов и косметологов, Российское общество акушеров-гинекологов ; редкол.: М. Р. Рахматулина [и др.] // Акушерство и гинекология. 2016. Прил. к № 4. С. 64–69.

15. *Профилактика* болезней, передаваемых половым путем : пособие для классных руководителей, социальных педагогов, психологов общеобразовательных школ / А. Л. Навроцкий [и др.]. Минск: Университетское, 2011. 152 с.

16. *Кулага, О. К.* Ассоциированные урогенитальные инфекции в акушерстве и гинекологии: современный взгляд на проблему / О. К. Кулага, С. А. Костюк. Минск : Змицер Колас, 2008. 544 с.

17. *Tully, J. G.* A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract / J. G. Tully // Lancet. 1981. Vol. 1. P. 1288–1291.

18. *Немченко, О. И.* Урогенитальный микоплазмоз (обзор литературы) / О. И. Немченко, Е. В. Уварова // Consilium Medicum. 2007. № 1. С. 45–51.

19. *Jensen, S. J.* Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples / S. J. Jensen, S. A. Uldum, J. Sondergard-Andersen // J. Clin. Microbiol. 2011. Vol. 29. P. 46–50.

20. *Uuskula, A.* Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents / A. Uuskula, P. K. Kohl // Int J STD AIDS. 2012. Vol. 13, № 2. P. 79–85.

21. *Weinstein, S. A.* Recent perspectives in the diagnosis and evidence-based treatment of *Mycoplasma genitalium* / S. A. Weinstein, B. G. Stiles // *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2012. Vol. 10, № 4. P. 487–499.
22. *Clinical* laboratory assessment of *Mycoplasma genitalium* transcription-mediated amplification using primary female urogenital specimens / E. Munson [et al.] // *Clin. Microbiol.* 2016. Vol. 54, № 2. P. 432–438.
23. *Polymerase* chain reaction as a diagnostic tool for six sexually transmitted infections — preliminary results / A. I. Grad [et al.] // *Clujul. Med.* 2015. Vol. 88, № 1. P. 33–37.
24. *Лабораторная* диагностика инфекции, вызванной *Mycoplasma genitalium* : метод. рекомендации / А. М. Савичева [и др.] // Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова, Общество акушеров-гинекологов Санкт-Петербурга и Северо-Запада Российской Федерации. Санкт-Петербург : Изд-во Н-Л, 2010. 35 с.
25. *Кисина, В. И.* Характеристика клинических синдромов, ассоциированных с *M. genitalium*, у пациентов с заболеваниями урогенитальной системы / В. И. Кисина, Е. В. Ширшова, Е. Н. Ильина // *Клин. дерматол.* 2009. Т. 3. С. 33–38.
26. *Correlation* of mycoplasma with unexplained infertility / A. Gupta [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2009. № 3. P. 89–92.
27. *Taylor-Robinson, D.* Genital mycoplasma infections / D. Taylor-Robinson, P. M. Furr // *Wien Klin Wochenschr.* 2007. Vol. 109, № 14–15. P. 578–583.
28. *Mycoplasma genitalium* in chronic non-gonococcal urethritis / D. Taylor-Robinson [et al.] // *Int. J. STD AIDS.* 2008. Vol. 15. P. 21–25.
29. *Mycoplasma genitalium* should be suspected in unspecific urethritis and cervicitis. A study from Vasterbotten confirms the high prevalence of the bacteria / H. Mellenius [et al.] // *Lakartidningen.* 2015. Vol. 102, № 47. P. 340–345.
30. *Mycoplasmataceae* colonizations in women with urethral pain syndrome: a case-control study / A. Kyndel [et al.] // *J. Low. Genit. Tract. Dis.* 2016. Vol. 20, № 3. P. 272–274.
31. *Выявляемость* *Mycoplasma genitalium* у пациентов с репродуктивными нарушениями / Л. В. Рубаник [и др.] // *ARS medica. Искусство медицины.* 2011. № 15. С. 334–335.
32. *Особенности* течения беременности, на фоне инфекций урогенитального тракта, обусловленных *Mycoplasma genitalium* / В. В. Дорошевич [и др.] // *ARS medica. Искусство медицины.* 2011. № 14. С. 147–149.
33. *К вопросу* о специфичности влияния *Mycoplasma genitalium* на течение беременности / С. Ю. Юрьев [и др.] // *Гинекология.* 2009. Т. 11, № 4. С. 44–48.
34. *The role* of infection in miscarriage / S. Giakoumelou [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* 2016. Vol. 22, № 1. P. 116–133.
35. *Assessing* the relationship between preterm delivery and various microorganisms recovered from the lower genital tract / R. Edwards [et al.] // *Journal of maternal-fetal and neonatal medicine.* 2009. Vol. 19, № 6. P. 357–363.
36. *The demographic, sexual* health and behavioural correlates of *Mycoplasma genitalium* infection among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease / V. L. Short [et al.] // *Sex Transm Infect.* 2010. Vol. 6, № 1. P. 29–31.
37. *Погодин, О. К.* Хламидийная инфекция в акушерстве, гинекологии и перинатологии / О. К. Погодин. Петрозаводск, 2012. 165 с.
38. *Mycoplasma genitalium* among young, urban pregnant women / V. L. Short [et al.] // *Infect. Dis. Obstet-M Gynecol.* 2010. Vol. 9, № 8. P. 476–480.
39. *Серов, В. Н.* Особенности инфекции — заболевания в акушерстве, гинекологии и перинатологии / В. Н. Серов // *Русский медицинский журнал.* 2013. Т. 14, № 1. С. 2–5.
40. *Микоплазменные* инфекции и инфаркт миокарда / И. П. Арлеевский [и др.] // *Рос. кардиол. журн.* 2013. № 4. С. 17–23.

41. *Mycoplasma genitalium* in women with lower genital tract inflammation / H. Moi [et al.] // Sex Transm. Infect. 2009. Vol. 85. P. 10–14.
42. Патогенный потенциал микоплазм, эпидемиологически ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта / Н. И. Потатуркина-Нестерова [и др.] // Фундаментальные исследования. 2012. № 1. С. 89–92.
43. Прилепская, В. А. К вопросу о роли микоплазм в урогенитальной патологии / В. А. Прилепская, В. И. Кисина, Е. И. Соколовский // Гинекология. 2010. № 9. С. 31–38.
44. Haggerty, C. L. Evidence for a role of *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease / C. L. Haggerty // Curr. Opin. Infect. Dis. 2008. Vol. 21. P. 65–69.
45. Background review for the 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections / J. S. Jensen [et al.] // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2016. Vol. 12, № 6. P. 312–321.
46. Cazanave, C. *Mycoplasma genitalium*, an emerging sexually transmitted pathogen / C. Cazanave, L. E. Manhart, C. Bébéar // Med. Mal. Infect. 2012. Vol. 42, № 9. P. 381–392.
47. Weinstein, S. A. A review of the epidemiology, diagnosis and evidence-based management of *Mycoplasma genitalium* / S. A. Weinstein, B. G. Stiles // Sex Health. 2011. Vol. 8, № 2. P. 143–158.
48. Липова, Е. В. Инфекции мочеполовых путей, ассоциированные с микоплазмами. Клиническая дерматовенерология : руководство для врачей / Е. В. Липова, Э. В. Баткаев ; под ред. Ю. К. Скрипкина, Ю. С. Бутова. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. 560 с.
49. Раковская, И. В. Микоплазмы и микоплазмозы человека : пособие для врачей / И. В. Раковская. Москва : Наука, 2009. 35 с.
50. *Mycoplasma genitalium* как возбудитель инфекций урогенитального тракта: патогенез, клиника, диагностика и лечение / Е. В. Шипицына [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. 2008. Т. 57, № 2. С. 111–120.
51. Литвин, О. Е. Изучение роли *Mycoplasma genitalium* в развитии патологии урогенитального тракта / О. Е. Литвин // Вестник последипломного медицинского образования. 2009. № 1. С. 32–33.
52. Хрянин, А. *Mycoplasma genitalium* — новый патогенный микроорганизм, передаваемый половым путем / А. Хрянин, О. Решетников // Врач. 2011. № 13. С. 27–31.
53. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / под ред. Дж. Хулта [и др.] ; пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. Москва : Наука, 2001. 712 с.
54. Woese, C. R. Phylogenetic analysis of the *Mycoplasmas* / C. R. Woese, J. Maniloff, L. B. Zablen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77. P. 494–498.
55. Dworkin, M. The Genus *Mycoplasma* and Related Genera / M. Dworkin, S. Razin // The Prokaryotes. 2006. Vol. 4. P. 853–854.
56. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика / С. Н. Борхсениус [и др.]. Санкт-Петербург : Наука, 2002. 319 с.
57. Прозоровский, С. В. Медицинская микоплазмология / С. В. Прозоровский, И. В. Раковская, Ю. В. Вульфвич. Москва : Медицина, 1995. 386 с.
58. Identification and characterization of immunogenic proteins of *Mycoplasma genitalium* / H. F. Svenstrup [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. 2009. Vol. 13. P. 913–922.
59. Leclercq, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications / R. Leclercq // Clin. Infect. Dis. 2012. Vol. 34. P. 482–492.
60. Svenstrup, H. F. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa / H. F. Svenstrup, J. Fedder, J. Abraham-Peskir // Hum. Reprod. 2013. Vol. 18. P. 2103–2109.
61. Krause, D. C. Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae* / D. C. Krause, M. F. Balish // Mol. Microbiol. 2014. Vol. 51. P. 917–924.

62. *Адаптивные* реакции микоплазм *in vitro*: жизнеспособные, но некультивируемые формы и наноклетки *Acholeplasma laidlawii* / В. М. Чернов [и др.] // Микробиология. 2010. Т. 74, № 4. С. 498–504.
63. *Генетический* полиморфизм микоплазм: варибельность генов цитоадгезинов у клинических изолятов *Mycoplasma hominis* / О. В. Горшков [и др.] // Доклады академии наук. 2011. Т. 404 (2). С. 1–4.
64. *Костюк, С. А.* Перестройки в генах факторов патогенности микоплазм и уреоплазм при моно- и микст-инфекциях урогенитального тракта / С. А. Костюк, Т. В. Руденкова // Медицинские новости. 2009. № 4. С. 85–88.
65. *The minimal* gene complement of *Mycoplasma genitalium* / C. M. Fraser [et al.] // Science. 1995. Vol. 270. P. 397–403.
66. *Razin, S.* Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells / S. Razin // J. Bioscience Reports. 1999. Vol. 19, № 5. P. 321–332.
67. *Herrmann, R.* *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*: a comparison of two closely related bacterial species / R. Herrmann, B. Reiner // Current Opinion in Microbiology. 2008. Vol. 1. P. 572–579.
68. *Falk, L.* Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium* / L. Falk, H. Fredlund, J. S. Jensen // Sex. Transm. Infect. 2009. Vol. 79. P. 318–319.
69. *Jensen, J. S.* Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy / J. S. Jensen, J. Blom, K. Lind // Int. J. Exp. Pathol. 1994. Vol. 75 (2). P. 91–98.
70. *Bergan, T.* Methods in Microbiology. Vol. 13 / T. Bergan, J. R. Norris. Academic Press (London) Ltd. 1979. 458 p.
71. *Hardy* diagnostics. SP4 media. [Электронный ресурс] / Instructions for use. Hardy Diagnostics. Режим доступа: <https://catalog.hardydiagnostics.com>. Дата доступа: 27.01.2015.
72. *A serine/threonine* phosphatase encoded by MG\_207 of *Mycoplasma genitalium* is critical for its virulence / M. A. Martinez [et al.] // BMC Microbiology. 2013. Vol. 13. P. 44–51.
73. *Ljubin-Sternak, S.* Chlamydia trachomatis and genital mycoplasmas: pathogens with an impact on human reproductive health / S. Ljubin-Sternak, T. Meštrović // Journal of Pathogens. 2014.
74. *Hamasuna, R.* Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma genitalium* strains examined by broth dilution and quantitative PCR / R. Hamasuna, J. S. Jensen, Y. Osada // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. Vol. 53, № 11. P. 4938–4939.
75. *Persistent* *Mycoplasma genitalium* infection of human endocervical epithelial cells elicits chronic inflammatory cytokine secretion / C. L. McGowin [et al.] // Infect. Immun. 2012. Vol. 80, № 11. P. 3842–3849.
76. *Selection* of *Mycoplasma genitalium* strains harbouring macrolide resistance-associated 23S rRNA mutations by treatment with a single 1 g dose of azithromycin / S. Ito [et al.] // Sex. Transm. Infect. 2011. Vol. 87. P. 412–414.
77. *Azithromycin* failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis / C. S. Bradshaw [et al.] // Emerg. Infect. Dis. 2006. Vol. 2. P. 1149–1152.
78. *Jorgen, S.* Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance / S. Jorgen // Clinical infectious diseases. 2008. Vol. 47. P. 1546–53.
79. *Induced* macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from patients with recurrent nongonococcal urethritis / H. S. Yew [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2011. Vol. 49. P. 1695–1696.
80. *Чернова, О. А.* Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов IL-1B, IL-1RN и IL-10 у человека при персистенции микоплазм (*Mycoplasma hominis*) / О. А. Чернова, Н. Б. Баранова, Н. И. Акберова // Цитокины и воспаление. 2008. № 4. С. 11–14.
81. *Marshall, A. J.* The phagocytosis of mycoplasmas / A. J. Marshall, R. J. Miles, L. Richards // J. Med. Microbiol. 1995. Vol. 43. P. 239–250.

82. *Intracellular M. genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing / L. Chirs [et al.] // *BMC Microbiology*. 2009. Vol. 9. P. 139–143.
83. *Johansson, M.* Immunology of the human genital tract / M. Johansson, N. Y. Lycke // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003. Vol. 16, № 1. P. 43–49.
84. Симбирцев, А. С. Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // *Цитокины и воспаление*. Т. 3, № 2. P. 16–23.
85. *An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis* / C. R. Wira [et al.] // *Immunol. Rev.* 2005. Vol. 206. P. 306–335.
86. *McGowin, C. L.* *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women / C. L. McGowin, C. Anderson-Smits // *PLoS Pathog.* 2011. Vol. 7, № 100. P. 13–24.
87. *Taylor-Robinson, D.* *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly / D. Taylor-Robinson, J. S. Jensen // *Clin. Microbiol. Rev.* 2011. Vol. 24, № 498. P. 514–520.
88. *Serological investigation of Mycoplasma genitalium in infertile women* / H. F. Clausen [et al.] // *Hum. Reprod.* 2001. Vol. 16, № 9. P. 866–874.
89. *The Mycoplasma genitalium MG\_454 gene product resists killing by organic hydroperoxides* / S. Saikolappan [et al.] // *J. Bacteriol.* 2009. Vol. 191, № 21. P. 675–682.
90. *Mycoplasma genitalium lipoproteins induce human monocytic cell expression of pro-inflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor kappaB* / Y. Wu [et al.] // *Mediators Inflamm.* 2008. Vol. 19. P. 427–431.
91. *McGowin, C. L.* *Intracellular Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokines secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing / C. L. McGowin, V. L. Popov, R. B. Pyles // *BMC Microbiol.* 2009. Vol. 9. P. 139–144.
92. *Esterbauer, H.* Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products / H. Esterbauer // *Am. J. Clin. Nutr.* 1993. Vol. 57, № 5. P. 779–785.
93. *Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation.* *Environ* / M. C. Fogarty [et al.] // *Mol. Mutagen.* 2011. Vol. 52, № 1. P. 35–42.
94. Костюк, С. А. Окислительный стресс при урогенитальных инфекциях: активация перекисного окисления и истощение системы антиокислительной защиты / С. А. Костюк, Н. Д. Коломиец // *Медицинские новости*. 2010. № 16. P. 75–79.
95. *Mycoplasma genitalium P140 and P110 cytidhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development* / R. Burgos [et al.] // *J. Bacteriol.* 2006. Vol. 188, № 24. P. 8627–8637.
96. *Structure-guided mutations in the terminal organelle protein MG491 cause major motility and morphologic alterations on Mycoplasma genitalium* / L. Martinelli [et al.] // *PLoS Pathog.* 2016. Vol. 15, № 12. P. 533–542.
97. *P110 and P140 cytidherence-related proteins are negative effectors of terminal organelle duplication in Mycoplasma genitalium* / O. Q. Pich [et al.] // *PLoS One.* 2009. Vol. 14, № 10. P. 452–459.
98. *A major determinant for gliding motility in Mycoplasma genitalium: the interaction between the terminal organelle proteins MG200 and MG491* / L. Martinelli [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 16, № 3. P. 699–711.
99. *Kinetics of genetic variation of the Mycoplasma genitalium MG192 gene in experimentally infected chimpanzees* / L. Ma [et al.] // *Infect. Immun.* 2015. Vol. 28, № 3. P. 747–753.
100. *Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficient Mycoplasma genitalium shows decreased interactions with host cells* / K. Das [et al.] // *PoSOne.* 2012. Vol. 7, № 4. P. 247–258.

101. Клинико-лабораторные аспекты генетической резистентности *Chlamidia trachomatis* к тетрациклинам, макролидам и фторхинолонам / С. А. Костюк [и др.] // Репепт. 2006. № 6. С. 41–46.
102. Mills, S. D. The role of genomics in antimicrobial discovery / S. D. Mills // Journal of Antimicrobial Chemotherapy diseases. 2003. Vol. 51. P. 749–752.
103. Zgurskaya, H. I. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes / H. I. Zgurskaya, H. Nikaido // Mol. Microbiol. 2000. Vol. 37. P. 219–225.
104. Falk, L. Time to eradication of *Mycoplasma genitalium* after antibiotic treatment in men and women / L. Falk, M. Enger, J. S. Jensen // J. Antimicrob. Chemother. 2015. Vol. 70, № 11. P. 3134–3140.
105. High levels of macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium* warrant antibiotic susceptibility-guided treatment / R. H. Nijhuis [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. 2015. Vol. 70, № 9. P. 2515–2518.
106. Björnelius, E. *Mycoplasma genitalium* macrolide resistance in Stockholm, Sweden / E. Björnelius, C. Magnusson, J. S. Jensen // Sex. Transm. Infect. 2016. Vol. 8. P. 288–297.
107. Efficacy of antimicrobial therapy for *Mycoplasma genitalium* infections / L. E. Manhart [et al.] // Clin. Infect. Dis. 2015. Vol. 15, № 61. P. 785–791.
108. A Novel SimpleProbe PCR assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. / M. Gossé [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2016. Vol. 54, № 10. P. 2563–2567.
109. Multiplex assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance using PlexZyme and PlexPrime technology / S. N. Tabrizi [et al.] // PLoS One. 2016. Vol. 6, № 11. P. 540–558.
110. Multidrug-resistant *Mycoplasma genitalium* is increasing / T. Deguchi [et al.] // Clin. Infect. Dis. 2016. Vol. 62, № 3. P. 405–406.
111. Antibiotic treatment of symptomatic *Mycoplasma genitalium* infection in Scandinavia : a controlled clinical trial / E. Björnelius [et al.] // Sex Transm Infect. 2008. Vol. 84. P. 72–76.
112. A randomized comparison of azithromycin and doxycycline for the treatment of *Mycoplasma genitalium*-positive urethritis in men / L. A. Mena [et al.] // Clin. Infect. Dis. 2009. Vol. 48. P. 1649–1654.
113. Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement / O. Q. Pich [et al.] // Microbiology. 2006. Vol. 152. P. 519–527.
114. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л. С. Страчуного, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. НИИХ СГМА, 2002. 586 с.
115. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae* / T. S. Lucier [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995. Vol. 39. P. 2770–2773.
116. Vester, B. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA / B. Vester, S. Douthwaite // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001. Vol. 45(1). P. 1128–37.
117. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in France / D. Chrismet [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012. Vol. 67, № 11. P. 2598–2601.
118. Содержание общих гликозаминогликанов и их фракций, активность гиалуронидазы в сыворотке крови и цервикальной слизи при физиологическом течении беременности / В. П. Кириленко [и др.] // Сборник материалов VI съезда специалистов клинической лабораторной диагностики Республики Беларусь : VII съезда специалистов клин. лаб. диагностики Респ. Беларусь «Клиническая лабораторная диагностика в XXI веке». Минск, 2007. С. 139–141.
119. Кириленко, В. П. Изменение биохимических маркеров соединительной ткани шейки матки во время беременности в цервикальной слизи при норме и угрозе ее преры-

вания / В. П. Кириленко, С. Л. Воскресенский // Репродуктивное здоровье в Беларуси. 2011. №: 1. С. 31–39.

120. *Арутюнян, А. В.* Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А. В. Арутюнян. Санкт-Петербург : Фолиант, 2008. 124 с.

121. *Методы* клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников [и др.] ; под ред. В. С. Камышникова. Минск : Бел. наука, 2002. 775 с.

122. *Гржибовский, А. М.* Доверительные интервалы для частот и долей / А. М. Гржибовский // Экология человека. 2008. № 5. С. 57–60.

123. *Бадыгина, Н. А.* Сравнительный анализ методической и экономической эффективности ПЦР с различными способами детекции продуктов амплификации / Н. А. Бадыгина // Актуальные вопросы теоретической и практической медицины : сб. науч. ст., посвящ. 20-летию со дня Чернобыльской катастрофы, Гомель, 2006 г. : в 2 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: С. В. Жаворонок [и др.]. Гомель, 2006. Т. 1. С. 27–29.

124. *Бадыгина, Н. А.* Определение количественной мико-уреаплазменной нагрузки: методические особенности и экономическая эффективность ПЦР и бактериологических исследований / Н. А. Бадыгина, С. А. Костюк // Актуальные вопросы теоретической и практической медицины : сб. науч. ст., посвящ. 20-летию со дня Чернобыльской катастрофы, Гомель, 2006 г. : в 2 т. / Гомел. гос. мед. ун-т ; редкол.: С. В. Жаворонок [и др.]. Гомель, 2006. Т. 1. С. 30–32.

125. *Клинические* протоколы диагностики и лечения инфекций, передаваемых половым путем / И. Г. Шиманская [и др.]. Минск, 2009. 38 с.

126. *Разработка* методики определения уровней экспрессии некоторых генов семейств ABC и GST в образцах из парафин-фиксированных срезов опухолевой ткани молочной железы / С. А. Костюк [и др.] // Медицинские новости. 2014. № 12. С. 55–58.

127. *Теоретические* и прикладные вопросы применения методов анализа нуклеиновых кислот / С. А. Костюк [и др.]. Минск : БелМАПО, 2014. 257 с.

128. *Руденкова, Т. В.* Локальный гуморальный иммунный статус и состояние микроценоза репродуктивного тракта у женщин при моноинфицировании / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Г. И. Иванчик // Медицинские новости. 2011. № 6. С. 60–64.

129. *Микробиологические* свойства и генетические особенности микоплазм / Т. В. Руденкова [и др.] // Медицинские новости. 2011. № 8. С. 13–16.

130. *Руденкова, Т. В.* Методика ПЦР-исследований в режиме реального времени для количественного анализа ДНК *Mycoplasma genitalium* и оценки риска перинатального инфицирования / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, О. К. Кулага // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2012. № 1. С. 81–87.

131. *Выявление* генетических маркеров устойчивости к антибактериальным препаратам в клинических изолятах *Mycoplasma genitalium* / С. А. Костюк [и др.] // Медицинский журнал. 2013. № 4. С. 76–79.

132. *Изучение* устойчивости-чувствительности *Mycoplasma genitalium* к антибактериальным препаратам / Т. В. Руденкова [и др.] // Медицинский журнал. 2013. № 4. С. 92–95.

133. *Руденкова, Т. В.* *Mycoplasma genitalium*: биологические особенности и возможности диагностики инфекций / Т. В. Руденкова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2016. № 1. С. 53–64.

134. *Руденкова, Т. В.* Уровень содержания цитокинов в слизи урогенитального тракта беременных женщин при моно- и сочетанной микоплазменной инфекции / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2016. № 2. С. 226–235.

135. *Руденкова, Т. В.* Культуральный метод выявления *Mycoplasma genitalium*: апробация и валидация / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Л. В. Рубаник // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2016. № 3. С. 319–327.

136. *Руденкова, Т. В.* Лабораторные показатели, отражающие метаболические изменения в слизи урогенитального тракта беременных пациенток, инфицированных

*Mycoplasma genitalium* при различных вариантах реорганизации генома возбудителя / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Т. М. Юрага // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2016. № 4. С. 374–382.

137. *Определение антибиотикорезистентности клинических изолятов Mycoplasma genitalium методом генетического анализа* / Т. В. Руденкова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под ред. Л. П. Титова [и др.]. Минск, 2013. Вып. 6. С. 245–249.

138. *Сравнительный анализ выявления Mycoplasma genitalium в различных видах биологического материала* / Т. В. Руденкова [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под ред. Л. П. Титова [и др.]. Минск, 2014. Вып. 7. С. 232–235.

139. *Руденкова, Т. В. Результаты использования разработанной среды для культивирования и выявления Mycoplasma genitalium* / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Л. В. Рубаник // 90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси : сб. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. Л. П. Титова. Минск, 2015. С. 93–96.

140. *Руденкова, Т. В. Разработка методики секвенирующей ПЦР для выявления перестроек в генах цитoadгезии Mycoplasma genitalium* / Т. В. Руденкова // Научные исследования в медицине: от теории к практике : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. гос. акад. последипломного образования ; под ред. М. А. Герасименко [и др.]. Минск, 2016. С. 724–729.

141. *Руденкова, Т. В. Анализ нуклеотидных замен в генах, кодирующих белки цитoadгезии Mycoplasma genitalium* / Т. В. Руденкова // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. 2012. № 5. С. 185–188.

142. *Изучение морфологических и ультраструктурных характеристик выделенного штамма Mycoplasma genitalium* / Н. Н. Полещук [и др.] // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. 2012. № 5. С. 179–182.

143. *Сравнительная оценка молекулярно-биологического и культурного методов выявления Mycoplasma genitalium* / С. А. Костюк [и др.] // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. 2012. № 5. С. 339–342.

144. *Метод диагностики инфекций, обусловленных Mycoplasma genitalium* : инструкция по применению № 216–1215 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 23.12.2015 / сост. И. Г. Шиманская [и др.]. Минск, 2015. 7 с.

145. *Руденкова, Т. В. Способ получения питательной среды для культивирования и выявления Mycoplasma genitalium* / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Л. В. Рубаник ; заявители: Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Л. В. Рубаник. Уведомление о регистрации изобретения в Государственном реестре изобретений № 20730 от 10.10.2016 по заявке № а 20131298.

146. *Руденкова, Т. В. Лабораторный регламент на производство питательной среды для выявления и культивирования Mycoplasma genitalium* : утв. ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» 29.11.2016 / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Л. В. Рубаник. Минск : БелМАПО, 2016. 33 с.

147. *Руденкова, Т. В. Способ одновременного определения устойчивости микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов и макролидов* : рационализаторское предложение № 96/23 : утв. ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» 15.11.2016 / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк.

148. *Диагностика и лечение инфекций уrogenитального тракта, обусловленных Mycoplasma genitalium, с учетом молекулярно-биологических особенностей возбудителя* : учеб.-метод. пособие / И. Г. Шиманская [и др.]. Минск : БелМАПО, 2013. 39 с.

149. *Микробиологическая диагностика инфекций уrogenитального тракта, обусловленных Mycoplasma genitalium* : учеб.-метод. пособие / С. А. Костюк [и др.]. Минск : БелМАПО, 2014. 64 с.

## РАЗДЕЛ 2

### MYCOPLASMA PNEUMONIAE

#### ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БА — бронхиальная астма  
БАЛ — бронхоальвеолярный лаваж  
ГЗФ оксидаза — глицерол-3-фосфат оксидаза  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
Ед — единица  
ИЛ-4 — интерлейкин 4  
ИЛ-6 — интерлейкин 6  
ИЛ-33 — интерлейкин 33  
ИФА — иммуноферментный анализ  
М — концентрация раствора моль на литр  
НК — нуклеиновая кислота  
ОЭГ — относительная экспрессия гена  
ПЦР — полимеразная цепная реакция  
pCARDS-токсин — рекомбинантный CARDS-токсин  
ПКО — положительный контрольный образец  
ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
Тх2 — Т-хелперы 2  
ФАД — флавинадениндинуклеотид  
ФНО- $\alpha$  — фактор некроза опухоли альфа  
ЦТАБ — бромистый цетилтриметиламмоний  
АТСС — American Type Culture Collection (Американская Коллекция типовых культур)  
BLAST — Basic Local Alignment Search Tool (программа, проводящая поиск гомологов белков или генов путем сравнения с известной последовательностью)  
CARDS-токсин — Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin (токсин, ассоциированный с респираторным дистресс-синдромом)  
*C. pneumoniae* — *Chlamydia pneumoniae*  
*C. trachomatis* — *Chlamydia trachomatis*  
FBS — Fetal bovine serum (эмбриональная бычья сыворотка)  
*H. influenzae* — *Haemophilus influenzae*  
IgE — иммуноглобулин E  
IgM — иммуноглобулин M  
IgG — иммуноглобулин G  
*M. hominis* — *Mycoplasma hominis*

*M. pneumoniae* — *Mycoplasma pneumoniae*  
*M. tuberculosis* — *Mycobacteria tuberculosis*  
MEM — Eagle's minimal essential medium (минимальная поддерживающая среда Игла)  
RANTES — Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted (хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации)  
SDS — Sodium Dodecyl Sulfate (натрия додецилсульфат)  
SP-A — Surfactant protein A (протеин А сурфактанта)  
*Staph. aureus* — *Staphylococcus aureus*  
*Str. pneumoniae* — *Streptococcus pneumoniae*  
TLR — Toll like receptors (Толл-подобные рецепторы)  
VEGF — Vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

## ВВЕДЕНИЕ

*M. pneumoniae* — микроорганизм, относящийся к классу *Mollicutes*, роду *Mycoplasma*, среди особенностей которого малый геном, отсутствие клеточной стенки и ограниченные метаболические возможности (К. В. Waites et al., 2004). *M. pneumoniae* инфицирует респираторный тракт человека и является этиологическим фактором различных нозологических форм респираторной патологии: синусит, фарингит, ларингит, бронхит, пневмония (N. Principi et al., 2001; С. В. Зайцева и соавт., 2017; О. Ф. Романовская и соавт., 2019). Частота выявления *M. pneumoniae* достигает 40 % при бронхите и внебольничной пневмонии у детей (N. Principi et al., 2001; О. Ф. Романовская и соавт., 2019), *M. pneumoniae* также связана с развитием бронхиальной астмы (M. Ali, 2008). В наибольшей степени инфицирование *M. pneumoniae* распространено среди детей старше 7 лет с бронхитами и пневмониями (N. Principi et al., 2001). Возбудитель инфицирует исключительно организм человека и передается от человека к человеку воздушно-капельным путем (E. Kuźma-Mroczkowska et al., 2016).

Механизм патогенного действия данного микроорганизма основан на его способности вызывать деструкцию клеток респираторного эпителия (J. He et al., 2016). Несмотря на то, что геном *M. pneumoniae* содержит минимально необходимое для поддержания жизнедеятельности количество генов (К. В. Waites et al., 2004), микроорганизм характеризуется множественностью факторов патогенности, среди которых основными являются Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin (токсин, ассоциированный с респираторным дистресс-синдромом, CARDS-

токсин) и пероксид водорода, которые оказывают цитопатическое действие на клетки-мишени (G. L. Parrott et al., 2016). CARDS-токсин взаимодействует с протеином А сурфактанта (SP-A) легких и через систему рецепторных молекул инициирует морфологические и биохимические изменения в клетках хозяина (T.R. Kannan et al., 2005). Пероксид водорода выделяется *M. pneumoniae* в ходе метаболических процессов при участии фермента глицерол-3-фосфат (ГЗФ) оксидазы (M. F. Balish et al., 2016). Для инфекционного процесса, обусловленного *M. pneumoniae*, характерны варианты течения от легких до тяжелых форм (T. Saraya et al., 2014), что может быть связано с молекулярно-генетическими особенностями патогена, установлению которых посвящено одно из направлений настоящего исследования.

Особый научный интерес представляет изучение взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия человека, что будет способствовать дальнейшему пониманию механизмов участия *M. pneumoniae* в формировании и развитии воспалительных процессов дыхательных путей. Изучение *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия человека в присутствии SP-A сможет внести ясность в противоречия в реализации патогенного действия *M. pneumoniae*: с одной стороны, *M. pneumoniae* взаимодействует с SP-A (T. R. Kannan et al., 2005), что может способствовать проникновению патогена в клетку человека, с другой стороны, SP-A связывает свободные молекулы CARDS-токсина и тем самым может обуславливать снижение количества активной формы одного из главных факторов патогенности *M. pneumoniae*.

Изучение патогенных свойств *M. pneumoniae* традиционно проводится на лабораторных животных (T. R. Kannan et al., 2010). Однако в силу генетических различий человека и животных моделирование инфекции, обусловленной *M. pneumoniae*, на лабораторных животных не лишено методологических и этических сложностей (A. R. Joffe et al., 2015), преодолеть которые возможно с помощью разработки и применения биологических моделей с использованием перевиваемых культур клеток человека. Создание таких моделей является экономически и этически оправданным и будет способствовать получению новых научных знаний о свойствах возбудителя.

При взаимодействии *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия происходит их активация, сопровождающаяся выработкой провоспалительных цитокинов (T. Shimizu et al., 2014; P. M. Meyer Sauter et al., 2016). Как прямое цитопатическое действие *M. pneumoniae* на клетки, так и локальная продукция провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия играют существенную роль в реализации патогенного действия возбудителя. Представляет интерес сравнение

продукции провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия в параллельных экспериментах с *M. pneumoniae* и CARDS-токсином для получения новой научной информации о роли каждого компонента в системе клетка–патоген–токсин в стимулировании воспалительного ответа. Решение данной задачи осуществлялось в ходе исследования.

С появлением и внедрением в практику метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) возрастает интерес к возможностям его применения для исследования мокроты с целью выявления *M. pneumoniae*. Исследование мокроты помогает установить характер патологического процесса в органах дыхания, а в ряде случаев определить его этиологию (R. Ratu et al., 2005). Основная задача преаналитического этапа микробиологической диагностики респираторных заболеваний методом ПЦР — выделение из биологического материала стабильной нуклеиновой кислоты (НК), свободной от ингибиторов амплификации, для последующего выявления генетических маркеров инфицирования патогенными микроорганизмами (С. А. Костюк и соавт., 2014). Особенности физико-химических свойств мокроты оказывают существенное влияние на эффективность выделения ДНК.

ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью в выявлении патогенетически значимых микроорганизмов при условии разработки и применения оптимальной системы выделения ДНК. Известны различные способы выделения ДНК из биологического материала, такие как метод сорбционной экстракции, который наиболее часто используется в лабораторной практике, экстракция смесью фенол-хлороформ, применяемая в качестве референс-метода при оптимизации выделения ДНК (С. А. Костюк и соавт., 2014).

Однако данные методы не учитывают спектр ингибиторов, которые присутствуют в мокроте, и поэтому их применение может привести к ложноотрицательным результатам амплификации. Представляет интерес оптимизация методики выделения ДНК из мокроты с учетом спектра ингибиторов, присутствующих в данном биологическом материале, основными из которых являются полисахариды (M. Ieven et al., 1997).

Проведение исследований в указанных направлениях позволит существенно расширить существующие представления о механизмах реализации патогенного действия *M. pneumoniae*, а также повысить эффективность диагностики инфекций респираторного тракта, обусловленной данным микроорганизмом.

# ГЛАВА 1

## ОЦЕНКА ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА *Mycoplasma pneumoniae* НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ

### 1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА *Mycoplasma pneumoniae*

В структуре первичной заболеваемости взрослых и детей патология респираторного тракта является наиболее частой [1, 2]. *M. pneumoniae* связана с развитием заболеваний верхних и нижних дыхательных путей наряду с такими пневмотропными возбудителями бактериальной природы как *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *H. influenzae* [3–6]. Получены данные о распространенности инфицирования патогеном при БА [7].

*M. pneumoniae* — микроорганизм, относящийся к классу *Mollicutes*, роду *Mycoplasma*. Размер генома возбудителя составляет порядка 800 000 пар оснований, содержит порядка 700 описанных протеин кодирующих генов, а также дополнительно гены некодирующих РНК [8, 9].

*M. pneumoniae* является преимущественно внеклеточным, не содержащим клеточной стенки, патогеном, требующим непосредственного контакта с клеткой хозяина для поддержания метаболической активности, поскольку редуцированный геном *M. pneumoniae* делает данный микроорганизм неспособным к синтезу аминокислот, нуклеотидов и ряда других важных для жизнедеятельности молекул *de novo* [10].

*M. pneumoniae* чувствительна к действию тепла, имеет период полужизни менее 2 мин при 50 °С и теряет жизнеспособность в течение 1 недели при комнатной температуре, но может выживать в течение нескольких лет при –20 °С, в то время как оптимальным условием для длительного хранения является температура –70 °С. Микроорганизм также чувствителен к действию ультрафиолетовых лучей (УФ-лучей), рентгеновским лучам, дезинфицирующим и моющим средствам, солям золота и антибиотикам, не угнетающим синтез клеточной стенки, погибает при повторном замораживании [2].

*M. pneumoniae* является высоковирулентным возбудителем, инфицирует исключительно организм человека и передается от человека к человеку воздушно-капельным путем [11]. Механизм патогенного действия данного микроорганизма основан на его способности вызывать деструкцию клеток респираторного эпителия [12].

У пациентов до 2 лет на фоне инфицирования *M. pneumoniae* чаще всего развиваются заболевания верхних дыхательных путей (фарингит, синусит, ларингит, тонзиллит), тогда как у детей старше 6 лет, подростков, взрослых при инфицировании данным микроорганизмом происходит развитие бронхита и/или пневмонии [13]. При инфицировании

*M. pneumoniae* патология нижних отделов респираторного тракта возникает в 21,3 % случаев у детей 2–4 лет; в 41,3 % случаев — у детей 5–7 лет; в 60 % случаев — у детей старше 7 лет и подростков [14].

Инфекционный процесс, обусловленный *M. pneumoniae*, может протекать в легкой форме, когда элиминирование микроорганизма иммунной системой происходит при отсутствии специфической противомикробной терапии. В то же время данный возбудитель может стать причиной развития рефрактерной пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома, некротизирующего пневмонита и фульминантной пневмонии, при которых формируются патологические состояния, представляющие угрозу для жизни пациента [13, 15].

Представляет интерес изучение молекулярно-биологических особенностей *M. pneumoniae*, связанных с патогенностью микроорганизма, для получения новых научных знаний о его провоспалительном действии.

## **1.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИЕ УЧАСТИЕ *Mycoplasma pneumoniae* В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА**

### **1.2.1. Адгезия к клеткам респираторного эпителия**

Участие *M. pneumoniae* в патогенезе заболеваний респираторного тракта становится возможным вследствие феномена множественности факторов патогенности данного микроорганизма, к которым относятся адгезины, эффекторные молекулы, токсичные метаболиты. Воздействие этих факторов на клетки респираторного тракта приводит к формированию и активации биологических механизмов, которые и определяют реализацию патогенного действия *M. pneumoniae*.

Адгезия — первый и ключевой процесс инфицирования. Начальный этап патогенеза инфекции, обусловленной *M. pneumoniae*, включает адгезию микроорганизма к реснитчатому эпителию респираторного тракта, которая происходит спустя 24 часа после инфицирования. Адгезия *M. pneumoniae* к сиалогликопротеинам и сульфированным гликолипидам респираторного эпителия обеспечивается специальной органеллой прикрепления, присутствующей на одном из концов вытянутого тела микроорганизма. Патоген прикрепляется к реснитчатому эпителию респираторного тракта у основания ресничек, что защищает его от мукоцилиарного клиренса и локальных цитотоксических эффектов [2, 16, 17].

Предположительно, органелла прикрепления обеспечивает также микроорганизму проникновение через слизистый слой к клетке организма хозяина [18]. Взаимодействие микроорганизма с клеткой хозяина

осуществляется при согласованном действии адгезинов и кластеров вспомогательных протеинов на вершущке органеллы прикрепления.

К факторам патогенности *M. pneumoniae*, обуславливающим адгезию, относят P1 адгезин (главный адгезин), P30 и другие белковые структуры (P90, P65, белки группы протеинов с высоким молекулярным весом: HMW1, HMW2, HMW4, HMW5). Данные белки уникальны для микоплазм и не обнаруживаются у других бактерий [13].

Спектр клеток, которые способны инфицировать *M. pneumoniae*, включает эпителиальные клетки респираторного тракта, альвеолярные макрофаги [13]. Ингибирование в эксперименте процесса цитоадгезии *M. pneumoniae* к макрофагам приводило к отсутствию индукции ИЛ-1 $\beta$ , что препятствовало развитию воспалительных реакций [19].

### 1.2.2. Цитопатическое действие CARDS-токсина микроорганизма

*M. pneumoniae* способна связываться с SP-A, что облегчает колонизацию поверхности клеток респираторного тракта и затрудняет элиминацию микроорганизма. *M. pneumoniae* также способна проникать внутрь клеток и существовать внутриклеточно [20, 21]. В 2005 г. был идентифицирован белок *M. pneumoniae*, который принимает участие в данном процессе, он получил название CARDS-токсина [21]. CARDS-токсин кодируется геном *mpn372* и рассматривается как один из основных факторов патогенности *M. pneumoniae* [21, 22, 23].

У пациентов с подтвержденной инфекцией, обусловленной *M. pneumoniae*, выявляют высокие титры антител к CARDS-токсину, поскольку часть пула молекул CARDS-токсина локализуется на поверхности клеток возбудителя [21, 22]. Увеличение концентрации мРНК CARDS-токсина описано также при инфицировании клеточных культур *M. pneumoniae in vitro* [23].

Патогенное действие микроорганизма основано на его способности устанавливать тесный контакт с клетками респираторного эпителия и выделять токсичные для клеток вещества. Одно из таких веществ — CARDS-токсин, который оказывает прямое цитопатическое действие [22].

CARDS-токсин обладает двумя видами активности в отношении клеток-мишеней: моно-АДФ рибозилирующей и вакуолизирующей [24].

Рибозилирующая активность CARDS-токсина позволяет микроорганизму трансформировать структуру белков-мишеней, включая ферменты метаболических путей клеток человека, что ведет к повреждению клеток (цитотоксический эффект). Цитопатический эффект проявляется в процессе вакуолизации цитоплазмы клеток, округлении, искажении их формы. В опытах *in vitro* в культуре клеток было показано, что CARDS-токсин вызывает потерю мерцательной функции респираторного эпите-

лия, интенсивную цитоплазматическую вакуолизацию, кариопикноз, нарушает стратификацию эпителиальной ткани [17].

Также биологическими эффектами CARDS-токсина является способность индуцировать воспалительные реакции в респираторном тракте и через создание соответствующего цитокинового окружения вызывать гиперреактивность дыхательных путей [25]. В экспериментах *in vivo* показано, что CARDS-токсин стимулирует выработку ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ФНО- $\alpha$  и интерферона (ИФ)- $\gamma$ , RANTES и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора [13].

Механизм действия CARDS-токсина основан на его связывании с SP-A и аннексином A2 на поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей и его попадании внутрь клетки, что приводит к активации иммунных реакций.

CARDS-токсин может проникать и внутрь макрофагов, что происходит при участии клатрин опосредованного пути. CARDS-токсин через АДФ рибозилирование рецепторного белка NLRP3 активирует инфламасому — регулятор иммунного ответа, итогом чего становится переход про-ИЛ-1 $\beta$  в активную форму. ИЛ-1 $\beta$  определяет тяжесть воспалительных реакций, ассоциированных с инфекцией. Постоянная активность этих процессов при инфицировании *M. pneumoniae* приводит к трансформации легочной ткани и развитию хронических легочных болезней, таких как БА и хроническая обструктивная болезнь легких [26, 27].

### **1.2.3. Активация синтеза провоспалительных цитокинов при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae***

Активация *M. pneumoniae* воспалительного каскада через Toll like ресепторы (Толл-подобные рецепторы, TLR) ведет к цитокин опосредованному повреждению клеток респираторного тракта и, таким образом, играет существенную роль в процессе развития микоплазменной инфекции. Инфицированные *M. pneumoniae* альвеолярные макрофаги способны секретировать провоспалительные цитокины ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , а также ИЛ-18, макрофагальный белок воспаления-1 $\alpha$ , хемокины RANTES и моноцитарный хемотаксический белок-1, ИЛ-12, ИЛ-23, которые ассоциированы с нейтрофильной инфильтрацией [13].

Клетки респираторного эпителия относятся к первому уровню защиты при внедрении в организм *M. pneumoniae*. Вырабатываемые ими цитокины инициируют, поддерживают и регулируют реакции видового иммунитета, направленные на элиминирование патогена, а также участвуют во включении в иммунную защиту факторов специфического иммунитета [28].

На начальных этапах воспалительного ответа в респираторном тракте происходит экспрессия генов и продукция клетками респираторного эпителия цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6, которые модулируют дальнейшие реакции видового и специфического иммунитета. ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6 участвуют в патогенезе пневмонии, ассоциированной с инфицированием *M. pneumoniae*, что подтверждается обнаружением значимо высоких концентраций данных цитокинов в секретах респираторного тракта и сыворотке крови детей с микоплазменной пневмонией, при этом концентрации ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6 имеют прямую корреляцию с тяжестью заболевания [29, 30].

Результаты исследований *in vitro*, *in vivo* и клинические данные свидетельствуют о том, что существенную роль в патогенезе заболеваний, ассоциированных с инфицированием *M. pneumoniae*, принимают такие цитокины, как ИЛ-33 и RANTES, которые также ассоциированы с развитием аллергических заболеваний и БА [31–35].

Локальная продукция данных цитокинов клетками респираторного эпителия играет существенную роль в патогенности и исходе микоплазменной инфекции, поэтому представляет интерес исследование их продукции клетками респираторного эпителия при активирующем действии *M. pneumoniae* и CARDS-токсина.

*M. pneumoniae* как преимущественно внеклеточный патоген взаимодействует с SP-A легких. SP-A участвует в модуляции иммунных реакций в легких: он способствует поступлению патогенов в фагоциты, стимулирует внутриклеточный лизис, ограничивает активацию дендритных клеток и Т-клеток, эффекты SP-A в отношении продукции провоспалительных цитокинов могут быть как ингибирующие, так и стимулирующие. В исследованиях *in vitro* показано, что SP-A способен связывать *M. pneumoniae* и оказывать бактериостатический эффект [36, 37]. Однако мало известно о провоспалительном действии возбудителя и CARDS-токсина *in vitro* в присутствии SP-A.

#### **1.2.4. Оксидативный стресс, инициируемый возбудителем**

*M. pneumoniae* повышает продукцию активных форм кислорода (АФК) в месте локализации инфекционного процесса [38]. При инфекционном процессе, индуцированном *M. pneumoniae*, появление повышенного количества АФК происходит в ходе реакций метаболизма, необходимых для поддержания жизнедеятельности патогена, а именно при метаболизме глицерола и продуктов деградации фосфолипидов сурфактанта, являющихся основными источниками строительного материала и энергии для *M. pneumoniae* [39].

Повышение продукции АФК приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), интенсификации адгезии и агрегации тромбоцитов, формированию эндотелиальной дисфункции. В совокупности данные процессы следует рассматривать как проявления оксидативного стресса, в результате которого происходит повреждение клеток респираторного эпителия [38, 39].

Пероксид водорода — универсальный патогенетический маркер, который выделяется *M. pneumoniae* в ходе реакции превращения глицерола в дигидроксиацетонфосфат. Данная реакция катализируется ферментом ГЗФ оксидазой, кодовый номер по классификации ферментов (ЕС) 1.1.3.21 [40]. Наличие ГЗФ оксидазы — отличительное свойство *M. pneumoniae*, поскольку у большинства микроорганизмов действует ГЗФ дегидрогеназа (ЕС 1.1.1.8), в реакции с которой электроны уходят к никотинамидадениндинуклеотиду (НАД) и пероксид водорода не образуется. ГЗФ оксидаза *M. pneumoniae* восстанавливает молекулярный кислород в пероксид водорода. Этот процесс является важным фактором, обуславливающим цитотоксичные свойства возбудителя [41].

Таким образом, в ходе метаболических процессов *M. pneumoniae* повышается уровень пероксида водорода в биотопе воспаления, что вносит существенный вклад в патогенное действие микроорганизма.

В настоящее время ГЗФ оксидаза *M. pneumoniae* рассматривается как возможная мишень для терапевтического воздействия [40], поэтому представляет интерес изучение гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae*, что позволит выявить возможные генетические варианты возбудителя по фрагменту гена ГЗФ оксидазы и изучить их патогенные свойства.

### **1.3. УЧАСТИЕ *Mycoplasma pneumoniae* В ПАТОГЕНЕЗЕ ВОСПАЛЕНИЯ, АССОЦИИРОВАННОГО С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

#### **1.3.1. Распространенность возбудителя при бронхиальной астме**

Симптомы БА, такие как затруднение дыхания в виде одышки и хрипы, наблюдались у 10 % детей, у которых была выявлена инфекция, обусловленная *M. pneumoniae* [42]. Также описаны случаи возникновения БА после перенесенной микоплазменной инфекции [43].

Масштабные когортные исследования по изучению распространенности *M. pneumoniae* среди детей были проведены с использованием 6986 образцов сыворотки крови, которые протестированы на наличие специфических противомикоплазменных антител класса IgM и присутствие провоспалительных цитокинов. В ходе исследования установлено, что микоплазменная инфекция характеризуется цикличностью и при этом серологические маркеры выявлялись среди детей 6–7 лет [44].

У детей с патологией нижних отделов респираторного тракта, ассоциированной с инфицированием *M. pneumoniae*, сывороточные уровни общего IgE и провоспалительных цитокинов были значительно выше в сравнении с пациентами с воспалительными процессами верхних отделов респираторного тракта. Таким образом, инфицирование детей *M. pneumoniae* ассоциировано с большим риском поляризации иммунного ответа по Т-хелперы 2 (Тх2) типу с продукцией провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе аллергического воспаления [44].

Распространенность *M. pneumoniae* у взрослых и детей с БА варьирует от 3 % до 64 % в зависимости от характера популяции, метода и времени исследования (пик эпидемии *M. pneumoniae* или спад) [45–51]. При использовании комплекса методов микробиологической диагностики, таких как ПЦР и иммуноферментный анализ (ИФА), показано, что *M. pneumoniae* выявляется наиболее часто у детей старше 5 лет в период обострения БА [52], среди пациентов младше 5 лет распространенность *M. pneumoniae* наименьшая [53].

Для *M. pneumoniae* характерно длительное персистирование на эпителии респираторного тракта, что приводит к обострению ранее существующей БА у детей. Полученные данные свидетельствуют о том, что риск рецидивирующего течения БА повышается, если период обострения заболевания сочетается с инфицированием *M. pneumoniae*, что особенно характерно для детей в возрасте 2–15 лет с атопией в анамнезе [54, 55].

Микоплазменная инфекция может протекать латентно, при этом клинические симптомы минимальны. При хронической инфекции количество патогена в образцах биологического материала, полученных из респираторного тракта, включая бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), низкое, поэтому применение культурального метода исследования может привести к получению отрицательного результата. Применение метода ПЦР позволяет повысить чувствительность детекции *M. pneumoniae*. Выявление ДНК патогена методом ПЦР у взрослых пациентов с хронической БА обнаружило его высокую распространенность инфицирования (до 42 %) [56].

### **1.3.2. Участие микроорганизма и его CARDS-токсина в патогенезе аллергического воспаления в респираторном тракте**

В экспериментах показано, что rCARDS-токсин *M. pneumoniae* способен индуцировать аллергическое воспаление у BALB/c мышей после однократного введения. Критериями аллергического воспаления при этом являлись гиперсекреция слизи, повышенный Тх2 ответ с продукцией ИЛ-4, ИЛ-13, эозинофилия и гиперреактивность дыхательных пу-

тей [57]. По данным литературных источников, CARDS-токсин *M. pneumoniae* способен индуцировать иммунный ответ, ассоциированный с продукцией иммуноглобулина (Ig)E, и потенциально может самостоятельно функционировать как классический аллерген. В эксперименте показано, что CARDS-токсин обостряет уже существующее аллергическое воспаление у животных.

*M. pneumoniae* обусловленная инфекция характеризуется повышенным содержанием общего IgE в сыворотке крови. Синтез IgE клетками иммунной системы происходит при поступлении сигнала от ИЛ-4, выработка которого инициируется при активации STAT6 белка. Он в свою очередь активируется CARDS-токсином микроорганизма.

В экспериментальных исследованиях сенсibilизированные CARDS-токсином животные продуцировали аллерген-специфический IgE, который связывался с высокоаффинными IgE-рецепторами на циркулирующих базофилах, а также на тучных клетках кожи и слизистой. В результате возникала дегрануляция и выход эффекторных молекул, включая протеазы, биогенные амины, цитокины, лейкотриены [57].

В ходе аллергического воспаления может снижаться экспрессия TLR2 и выделение провоспалительных цитокинов, что приводит к нарушению элиминирования патогена из респираторного тракта [58].

*M. pneumoniae* способна инициировать гиперреактивность дыхательных путей, усиливая T<sub>H</sub>2 иммунный ответ и продукцию IgE. Выделяющийся IgE активирует тучные клетки, которые участвуют в аллергическом воспалении. У детей с респираторным микоплазмозом наблюдалось повышенное содержание ИЛ-4 в сыворотке крови, тогда как содержание ИФ- $\gamma$ , который модулирует клеточный иммунный ответ, было снижено [59].

ИЛ-4 — основной цитокин, который стимулирует T<sub>H</sub>2 иммунный ответ, являющийся ключевым в патогенезе аллергического воспаления и БА. T<sub>H</sub>2 также вырабатывают ИЛ-5 и ИЛ-10, которые инициируют продукцию IgE и активацию эозинофилов [60]. В сыворотке крови детей с БА и респираторным микоплазмозом выявлялись высокие титры специфических антител класса IgE к антигенам *M. pneumoniae*. Если при инфекции, обусловленной *M. pneumoniae*, происходит поляризация иммунного ответа в направлении T<sub>H</sub>2 иммунного ответа, то риск формирования аллергического иммунного ответа и БА значительно увеличивается [53].

Цитологические исследования биопсийного материала пациентов с БА и диагностированной *M. pneumoniae* инфекцией выявили значительную инфильтрацию тучными клетками, которые, как и T<sub>H</sub>2, способны вырабатывать ИЛ-4 и таким образом участвуют в поддержании аллергического воспаления [56, 61].

Антигены *M. pneumoniae* взаимодействуют с рецепторами на тучных клетках, что приводит к их стимулированию и сопровождается выработкой различных цитокинов и хемокинов, которые поддерживают и усиливают воспаление при БА [37].

*M. pneumoniae* способна инфицировать различные клетки респираторного тракта, которые участвуют в патогенезе БА, включая эпителиальные клетки, макрофаги и тучные клетки. Микроорганизм оказывает прямое повреждающее действие на клетки, нарушая процессы мукоцилиарного клиренса и стимулируя синтез провоспалительных медиаторов, участвуя в иницировании и обострении БА [53, 62].

Длительно протекающее воспаление в респираторном тракте приводит к ремоделированию дыхательных путей. В этом процессе участвуют лейкоциты и протеины плазмы крови, которые перемещаются из кровеносного русла в ткани и становятся участниками воспалительных реакций в респираторном тракте [48]. Повышение проницаемости сосудистой стенки обеспечивается Vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов, VEGF) [63].

При БА VEGF выделяется из активированных эндотелиальных клеток и стимулирует васкуляризацию и повышение проницаемости сосудов, что усиливает аллергическое воспаление. Высокие уровни VEGF в респираторном тракте могут активировать Т-клетки и приводить к их сенсибилизации к аллергенам. В то же время VEGF активирует дендритные клетки, которые продуцируют костимулирующие молекулы. Показано, что уровни VEGF повышены в сыворотке крови пациентов с инфицированием *M. pneumoniae* и признаками аллергического воспаления [63].

Дыхательные пути покрыты слоем слизи, которая связывает инородные частицы и микроорганизмы, а также облегчает их выведение путем мукоцилиарного транспорта. В состав слизи входят муциновые гликопротеины, вода, ионы, продуктов распада клеток. MUC5AC и MUC5B — главные макромолекулярные компоненты слизи, ответственные за ее вязкопластические, реологические, очистительные свойства. Дефицит в продукции компонентов слизистого барьера делает легкие уязвимыми к повреждению. В то же время, повышенное слизеобразование со скоплением слизи в дыхательных путях является звеном патогенеза заболеваний респираторного тракта, таких как БА, хроническая обструктивная болезнь легких, муковисцидоз [64].

*M. pneumoniae* оказывает влияние на регуляторные факторы секреции муцина, что приводит к мукозной гиперсекреции. На культурах клеток бронхиального эпителия показано, что *M. pneumoniae* индуцирует экспрессию муцинов MUC5AC и MUC5B, активируя STAT6-STAT3 сигнальные пути и сигнальный путь, связанный с рецептором эпи-

дермального фактора роста (EGFR), что приводит в свою очередь к подавлению активности белка FOXA2, который является транскрипционным репрессором биосинтеза муцина. STAT6-STAT3 и EGFR активируются при действии цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-13, продукция которых возрастает при инфицировании *M. pneumoniae* [64].

#### 1.4. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Изучение патогенетически значимых свойств микроорганизмов осуществляется с применением экспериментальных биологических моделей различных типов. Традиционным является проведение инфицирования лабораторных животных (эксперименты *in vivo*). Также патогенные свойства микроорганизмов оцениваются *in vitro* в экспериментах с использованием культур клеток. Для изучения патогенетических особенностей инфекции человека, обусловленной *M. pneumoniae*, применяются как экспериментальные модели *in vivo*, так и *in vitro* [23].

Модели микоплазменной инфекции *in vivo*, основанные на использовании лабораторных животных, не способны воспроизводить аналог микоплазменной инфекции ввиду структурно-функциональных отличий иммунных систем человека и животных [65, 66]. Поскольку единственным естественным хозяином *M. pneumoniae* является человек [11], данный возбудитель не является патогенным для животных во внелабораторных, внеэкспериментальных условиях, поэтому для индукции ответа организма животного на *M. pneumoniae* как один из способов используют введение патогена в высоких дозах ( $10^6$ – $10^7$ ) [23], на 2–3 порядка превышающих количество микроорганизма, определяемое в биологическом материале, полученном из респираторного тракта пациентов с респираторным микоплазмозом [67]. В совокупности это приводит к значительной неопределенности результатов, полученных на моделях *in vivo* с участием лабораторных животных, что является аксиомой в научном мире.

Альтернативой экспериментам на животных при изучении действия различных веществ и патогенных микроорганизмов на клетки, ткани и органы человека является проведение исследований на культурах клеток. Выбор релевантной клеточной модели для изучения патогенных свойств микроорганизмов позволяет достоверно перенести результаты, полученные в исследованиях *in vitro*, на человека [68].

Эксперименты с применением клеточных культур легче стандартизировать, поэтому результаты характеризуются лучшей воспроизводимостью в сравнении с экспериментами с участием лабораторных жи-

вотных. Применение клеточных технологий повышает транслируемость результатов биомедицинских исследований при переносе на человеческий организм, то есть обеспечивается достижение их достоверности, воспроизводимости и сопоставимости с результатами клинических наблюдений [69].

Моделирование взаимодействия патогенного микроорганизма и его метаболитов с клетками организма человека позволяет более детально, на клеточном уровне изучить инфекционный процесс.

Отличительной чертой инфекционного процесса в организме человека, обусловленного *M. pneumoniae*, является взаимодействие микроорганизма с клетками респираторного эпителия, при этом происходит их активация, сопровождающаяся выработкой провоспалительных цитокинов. Также *M. pneumoniae* выделяет токсичные для клеток вещества, которые оказывают прямое цитопатическое действие на клетки респираторного эпителия. Продукция провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия при их активации *M. pneumoniae* и прямое цитотоксическое действие микроорганизма на клетки являются значимыми в формировании патологического процесса при инфицировании *M. pneumoniae*.

Патогенность различных штаммов *M. pneumoniae* исследуют в условиях *in vitro* в различных культурах клеток. Критериями патогенности штаммов при использовании культур клеток являются адгезивные свойства штаммов, способность вызывать цитопатическое действие, размножаться и персистировать в клетках [70 с. 129].

С применением биологических моделей на основе клеток человека выявлены особенности экспрессии основного фактора патогенности *M. pneumoniae* — CARDS-токсина. Показано, что при инкубировании *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия человека экспрессия гена CARDS-токсина и продукция белка *M. pneumoniae* значительно увеличиваются, тогда как при росте микроорганизма в жидкой питательной среде в отсутствие контакта с клетками респираторного эпителия CARDS-токсин экспрессируется только на одной из фаз роста культуры *M. pneumoniae*, при этом молекулы CARDS-токсина не обнаруживаются в среде культивирования в течение всего периода роста культуры микроорганизма [23]. Цитопатическое действие CARDS-токсина *M. pneumoniae* на клетки респираторного эпителия установлено в эксперименте *in vitro* [22].

В соответствии с общими этическими принципами научно-исследовательской деятельности эксперимент на животном не должен быть проведен, если практически доступен другой научно обоснованный метод получения искомого результата, не требующий использования жи-

вотного [71]. Выбор подходящей модели для изучения инфекционного заболевания *in vitro* важен для адекватной экстраполяции полученных данных на процессы, протекающие в живом организме [68].

Экспериментальное изучение патогенных свойств *M. pneumoniae* на культурах клеток позволило установить, что данный макроорганизм обладает значительным провоспалительным действием, которое выражается в продукции широкого спектра цитокинов различными клетками при его контакте с ними [17, 25, 72]. При этом полученные в экспериментах *in vitro* результаты были подтверждены клиническими наблюдениями [25].

Известные способы изучения патогенного действия *M. pneumoniae in vitro* характеризуются тем, что проводится только инфицирование культур клеток *M. pneumoniae*. Дополнительный анализ воздействия CARDS-токсина *M. pneumoniae* на клетки респираторного эпителия позволит получить новую научную информацию о патогенных свойствах возбудителя.

Поскольку CARDS-токсин *M. pneumoniae* взаимодействует со специфическими рецепторами на поверхности клеток респираторного эпителия, способен попадать внутрь клеток и оказывать цитопатическое действие, то изучение его роли в инициации синтеза провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия будет способствовать выявлению факторов, которые являются ведущими в реализации провоспалительного действия *M. pneumoniae*.

Данная задача решалась в ходе исследования путем создания биологических моделей взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия человека *in vitro*, характеризующихся использованием rCARDS-токсина для активации клеток респираторного эпителия в отдельном эксперименте. Полученные модели были применены для изучения патогенного действия *M. pneumoniae* на клетки респираторного эпителия.

## **1.5. ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ РЕСПИРАТОРНОГО МИКОПЛАЗМОЗА**

Культуральные исследования, являясь золотым стандартом выявления ряда микроорганизмов не атипичной природы, не нашли своего применения для обнаружения *M. pneumoniae* в клинической практике. Получение культур данного патогена — чрезвычайно трудоемкий и длительный процесс: микроорганизм растет медленно, в среднем 7–14 суток [6, 15, 73].

Для *M. pneumoniae* как преимущественно внеклеточного патогена в силу специфичности питательных потребностей требуются для роста специальные среды, такие как SP4, содержащая эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота с обязательным добавлением антибиотика, препятствующего росту сопутствующих микроорганизмов, среда PPLO, дополненная дрожжевым экстрактом, глюкозой и пенициллином [64].

Этиологическая микробиологическая диагностика инфекционного процесса респираторного тракта, вызванного *M. pneumoniae*, основана на некультуральных методах, а именно иммунологических и молекулярно-генетических исследованиях [6, 73].

В целях наиболее точного определения этиологической принадлежности *M. pneumoniae* к развитию респираторной патологии целесообразно применять в комплексе несколько методов клинической лабораторной диагностики, какими могут быть серологические исследования и метод ПЦР [6, 16, 73, 74].

Метод ПЦР относится к методам амплификации НК (МАНК). В качестве мишени для амплификации используются гены P1 адгезина, АТФ-азного оперона, CARDS-токсина, 16S рРНК *M. pneumoniae* и другие [75]. К разновидностям ПЦР, применяемым в диагностике микоплазменной инфекции, относятся [75]:

- «гнездовая» ПЦР, при которой используется несколько пар праймеров, что повышает чувствительность метода;

- ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), преимуществами метода являются объединение этапов амплификации и детекции результатов, высокая чувствительность и специфичность, высокая производительность метода, возможность количественной оценки исходной ДНК матрицы;

- мультиплексная ПЦР, которая обеспечивает одновременное определение в исследуемом образце НК нескольких микроорганизмов;

- изотермическая амплификация НК (NASBA), позволяющая выявлять жизнеспособные микроорганизмы.

ПЦР диагностика приобретает все большее значение для установления этиологической принадлежности *M. pneumoniae*, а также для контроля эффективности проводимой терапии, наибольшее распространение получила технология ПЦР-РВ [76 с. 322, 77 с. 86].

Биологический материал, подходящий для детекции ДНК *M. pneumoniae*, включает соскобы эпителиальных клеток из полости носа, ротоглотки, мокроту, трахеальный аспират, БАЛ [78].

Одновременная циркуляция *M. pneumoniae* и других возбудителей респираторных инфекций, воздушно-капельный путь передачи, а также высокая восприимчивость к респираторным инфекциям создают благо-

приятные условия для возникновения смешанных вариантов инфекции [70 с. 223]. Согласно полученным данным, до 60 % случаев респираторного микоплазмоза является микст-инфекциями, обусловленными одновременным присутствием *M. pneumoniae* и вирусов или ассоциацией *M. pneumoniae* и типичных бактерий (*Str. pneumoniae*, *Staph. aureus*, *H. influenza*) [70 с. 223, 79, 80]. В свою очередь вопрос об одновременном инфицировании *M. pneumoniae* и другими возбудителями атипичной природы к настоящему времени мало изучен.

#### **1.6. ПРОБЛЕМА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА И ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *Mycoplasma pneumoniae***

Качество и чистота выделенных НК относятся к наиболее важным факторам ПЦР анализа. Для того чтобы получить высокоочищенные НК, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения. К возможным примесям, которые могут ингибировать проведение анализа с использованием ПЦР, относятся: SDS, фенол, этанол, изопропанол, ацетат натрия, хлористый натрий, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), гемоглобин, гепарин, мочевины [81].

Исследование мокроты представляет собой одно из ведущих направлений микробиологической диагностики заболеваний дыхательной системы, включая инфекции, вызванные атипичными микроорганизмами, к которым относится *M. pneumoniae* [3, 67, 82, 83 с.135].

Мокрота относится к биологическому материалу с высоким содержанием ингибиторов амплификации, таких как муколитические агенты, компоненты крови, полисахариды. Полисахариды в составе муцинов мокроты определяют вязкую консистенцию мокроты и являются основными ингибиторами амплификации, поскольку присутствуют в ней постоянно в значительной концентрации. Ингибирующее действие полисахаридов связано со способностью затруднять работу ДНК полимеразы. Присутствие в мокроте субстанций, ингибирующих ПЦР, может приводить к получению ложноотрицательных результатов [84–86].

Описаны различные методы экстракции ДНК *M. pneumoniae* из биологического материала [78]: **1)** разбавление образца 0,9 % хлоридом натрия с последующим добавлением SDS, экстракция фенол-хлороформом и осаждение ацетатом аммония и этанолом; **2)** предварительная обработка протеиназой К с последующей экстракцией фенол-хлороформом или фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом и осаждением этанолом; **3)** экстракция по Boom (сорбционная экстракция) обработанных проте-

азой или не обработанных образцов; 4) инкубация с Chelex и азидом натрия; 5) обработка ультразвуком или кипячением; 6) экстракция фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом с последующей экстракцией эфиром; 7) экстракция фенол-хлороформом и осаждение ацетатом натрия или хлоридом натрия.

При выборе метода выделения ДНК из мокроты необходимо принимать во внимание спектр ингибиторов данного биологического материала. Методы выделения НК, которые адекватны для одного биологического материала, могут совершенно не подходить для выделения НК из мокроты или приводить к получению продукта с низкой концентрацией ДНК, присутствием ингибиторов ПЦР, следствием чего могут стать ложноотрицательные результаты выявления ДНК *M. pneumoniae*.

### **Выводы**

1. *M. pneumoniae* характеризуется генетически детерминированной множественностью факторов патогенности (молекулы адгезинов, CARDS-токсин, пероксид водорода, провоспалительные цитокины, вырабатываемые в ответ на инфицирование *M. pneumoniae*). Особенности проявления патогенных свойств возбудителя могут быть связаны с внутривидовой генетической вариабельностью в факторах патогенности.

2. Экспериментальные модели инфекции, обусловленной *M. pneumoniae*, основанные на использовании экспериментальных животных, не способны полностью охватить особенности микоплазменной инфекции у человека. Представляет интерес изучение на биологических моделях взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия человека *in vitro* биохимических и генетических особенностей возбудителя, связанных с его патогенностью.

3. Использование высокочувствительного и высокоспецифичного молекулярно-генетического метода ПЦР-РВ может решить значимую для практики задачу выявления *M. pneumoniae* при условиях подбора оптимальной методики пробоподготовки.

4. Из всех видов биологического материала респираторного тракта, которые применяются для выявления ДНК *M. pneumoniae* методом ПЦР, мокрота рассматривается как наиболее информативный. Однако полисахариды мокроты являются ингибиторами ПЦР, поэтому при выборе методики выделения ДНК из мокроты следует ориентироваться на те методики, которые обеспечивают наиболее полное удаление полисахаридов.

## ГЛАВА 2

### СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ *Mycoplasma pneumoniae*

#### 2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ ИНФИЦИРОВАНИЯ A549 КЛЕТОК *Mycoplasma pneumoniae*

*In vitro* моделью стала клеточная линия карциномы легких человека A549 (ATCC, certified cell line-185). Клетки выращивали во флаконах с поверхностью для роста 75 см<sup>2</sup> в Eagle's minimal essential medium (минимальной поддерживающей среде Игла, MEM, Sigma, США) с добавлением 10 % fetal bovine serum (эмбриональной бычьей сыворотки, FBS, Sigma, США) и 1 % раствора антибиотиков пенициллин-стрептомицин с 10 000 единицами пенициллина и 10 мг стрептомицина на 1 мл 0,9 % NaCl (Sigma, США) при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Когда клетки достигали 80–90 % конfluence, их отделяли с поверхности роста путем обработки 0,25 % трипсином и субкультивировали. Морфологию A549 клеток изучали под световым инвертированным микроскопом Olympus CK2 (Olympus Optical, Middlesex, Англия), объектив ×10, оснащенный видеокамерой.

Моделирование процесса взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия проводили с использованием клеточной линии A549, которая несет все характерные признаки альвеолярных клеток 2-го типа и широко используется для оценки действия различных инфекционных агентов и биологически активных веществ на респираторный эпителий [32, 110]. Было показано, что *M. pneumoniae* способна к инфицированию A549 клеток, при этом проникновение патогена внутрь A549 клеток наблюдается при температуре не ниже 37 °С и достигает максимального уровня спустя 24 часа после инкубирования. Микроорганизм сохраняет свою жизнеспособность внутри A549 клеток в течение продолжительного времени, при этом его количество постоянно в течение 48 часов после инфицирования и незначительно снижается через 72 часа после замены среды с *M. pneumoniae* на среду, не содержащую микроорганизм [111].

При создании биологических клеточных моделей взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия учитывали особенности физиологии микроорганизма. *M. pneumoniae* не способна к синтезу *de novo* многих питательных веществ и является зависимой от их поступления из внешней среды [10]. Состав ростовой среды оказывает существенное влияние на рост и жизнеспособность патогена.

В ходе исследования определяли оптимальную среду для инфицирования A549 *M. pneumoniae*. Для этого оценивали концентрацию *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 при культивировании в течение 72 часов в среде для роста микоплазм (бульон основа с добавкой для микоплазм, Thermo Scientific Oxoid), в питательной среде для роста клеток MEM-2 % FBS с антибиотиками и в смешанной питательной среде, содержащей MEM-2 % FBS с антибиотиками с добавлением среды для роста микоплазм (итоговое соотношение сред 1 : 1) (табл. 2.1). Начальная концентрация *M. pneumoniae* составила 1 Ед по шкале МакФарланда, что соответствовало  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Концентрация *M. pneumoniae*, выраженная в КОЕ/мл, определялась при культивировании микроорганизма на плотной питательной среде в течение 7 дней.

Таблица 2.1

**Концентрация *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 при культивировании в различных питательных средах, Ме (мин...макс)**

Время, часы	<i>M. pneumoniae</i> , КОЕ ( $\times 10^8$ )/мл		
	Среда для роста микоплазм	MEM-2 % FBS	MEM-2 % FBS+среда для роста микоплазм (1 : 1)
0 <sup>a</sup>	5,3 (3,4...6,3)	5,4 (4,2...5,8)	5,2 (3,6...7,2)
24	7,7 (6,2...9,3)*	4,6 (3,9...5,7)	6,8 (5,3...7,4)
48	10,8 (8,8...11,7)*	2,6 (2,7...4,0)*	5,4 (4,6...6,9)
72	12,4 (10,3...13,4)*	0,6 (0,3...1,2)*	4,2 (3,9...5,7)

Примечание: <sup>a</sup> — начальная концентрация *M. pneumoniae*; \* различия значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

При культивировании *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 в стандартной среде для микоплазм, которая содержит оптимальное соотношение питательных веществ, необходимых для роста микроорганизма, наблюдалось стабильное линейное увеличение его концентрации в течение всего периода эксперимента — 72 часа культивирования. В то же время начальный рост *M. pneumoniae* в смешанной среде сопровождался только незначительным увеличением концентрации патогена через 24 часа культивирования. Через 72 часа культивирования концентрация *M. pneumoniae* снижалась, что обусловлено истощением питательных веществ, необходимых для поддержания стабильного роста микроорганизма. Концентрация *M. pneumoniae* при культивировании в среде MEM-2 % FBS, которая использовалась для роста A549 клеток, снижалась к течению всего времени культивирования, что свидетельствовало о недостатке питательных веществ при культивировании микроорганизма в данной питательной среде (табл. 2.1).

В соответствии с полученными результатами при разработке биологических моделей взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия для инфицирования A549 клеток использовались

суспензии *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 в коммерческой питательной среде для роста микоплазм, чтобы обеспечить оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизма в период инфицирования А549 клеток.

*M. pneumoniae* размножается и персистирует в респираторном тракте, взаимодействуя с клетками респираторного эпителия. При инфицировании клеток респираторного эпителия *in vitro* источником питательных веществ для микроорганизма является как ростовая среда, которая окружает клетки респираторного эпителия, так и сами клетки.

В данном исследовании роль клеток в поддержании жизнедеятельности и роста *M. pneumoniae* оценивалась путем определения концентрации *M. pneumoniae* при культивировании микроорганизма в присутствии и в отсутствии А549 клеток. Результаты представлены в табл. 2.2.

Таблица 2.2

**Количество *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 при культивировании в MEM-2 % FBS в присутствии и в отсутствии А549 клеток, Me (мин...макс)**

А549 клетки	<i>M. pneumoniae</i> , КОЕ ( $\times 10^6$ )/образец	
	начало культивирования <sup>а</sup>	72 часа культивирования
Присутствуют	3,5 (2,6...4,3)	63,4 (53,9...67,2)*
Отсутствуют	4,2 (3,8...5,7)	7,4 (6,2...8,8)*

Примечание: <sup>а</sup> — начальное количество *M. pneumoniae* составило  $5 \times 10^8$  КОЕ/образец. КОЕ/образец в начале культивирования представляет собой количество *M. pneumoniae*, оставшейся в лунке планшета после инкубирования в течение 4 часов с *M. pneumoniae* в питательной среде для микоплазм и последующей замены среды с *M. pneumoniae* на среду MEM-2 % FBS без добавления микроорганизма; \* различия значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Количество *M. pneumoniae*, которое оставалось в лунке планшета после замены среды с микроорганизмом, составило порядка 5 % от начального количества патогена, добавляемого в лунку планшета (табл. 2.2), что согласуется с ранее полученными данными о распределении возбудителя между средой культивирования и адгезионной поверхностью [112].

Как видно из табл. 2.2, количество *M. pneumoniae* (КОЕ) в начале ее культивирования (после добавления *M. pneumoniae*) и инкубирования в течение 4 часов в питательной среде для микоплазм были сопоставимы в экспериментах с присутствием и отсутствием А549 клеток, что обусловлено способностью патогена прикрепляться как к клеткам, так и к пластиковым поверхностям планшета.

Количество жизнеспособных *M. pneumoniae* спустя 72 часа культивирования возрастало более чем в 18 раз в присутствии А549 клеток в MEM-2 % FBS среде с антибиотиками и менее чем в 2 раза в отсутствии

A549 клеток. Среда культивирования в данных экспериментах заменялась только один раз: после инфицирования A549 клеток *M. pneumoniae* в течение 4 часов питательную среду для микоплазм с неприкрепленной *M. pneumoniae* удаляли и заменяли на MEM-2 % FBS среду с антибиотиками. Концентрация *M. pneumoniae* (табл. 2.2) представляет собой общее количество клеток микроорганизма на лунку планшета как прикрепленных к клеткам, а также к поверхностям лунки, так и находящихся в питательной среде.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии A549 клеток жизнеспособность *M. pneumoniae* повышается (табл. 2.2) даже в среде MEM-2 % FBS с антибиотиками, которая при отсутствии A549 клеток не обеспечивает оптимальные условия для жизнедеятельности *M. pneumoniae* (табл. 2.2).

Для оценки действия *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 A549 клетки инфицировали суспензиями микроорганизма в различных концентрациях, которые соответствовали стандартам МакФарланда от 0,1 до 2 Ед. Широкий диапазон инфицирующих концентраций *M. pneumoniae*, начиная с относительно низких значений, применялся для определения оптимальных концентраций микроорганизма и наблюдения его активирующего влияния на A549 клетки.

Продолжительность инфицирования A549 клеток *M. pneumoniae* подбирали экспериментально, учитывая данные о том, что микроорганизм обнаруживался на поверхности клеток млекопитающих, а также во внутриклеточном пространстве уже спустя 2 часа после культивирования клеток в среде, содержащей микроорганизм [113].

В настоящем исследовании A549 клетки инкубировали с суспензиями *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 в течение 2, 4, 6, 12 и 24 часов. Через 2 часа культивирования A549 клеток с суспензиями *M. pneumoniae* в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 Ед обнаружение ДНК патогена в A549 клетках не воспроизводилось в параллельных экспериментах, тогда как через 4 часа культивирования клеток с суспензиями *M. pneumoniae* в каждой из концентраций от 0,1 до 2 Ед по шкале МакФарланда ДНК микроорганизма выявлялась в A549 клетках методом ПЦР-РВ, при этом результат детекции характеризовался полной воспроизводимостью. Инфицирование A549 клеток *M. pneumoniae* подтверждали обнаружением увеличения концентрации ДНК микроорганизма методом ПЦР-РВ с течением времени.

Поэтому в дальнейших экспериментах A549 клетки инкубировали с суспензиями *M. pneumoniae* в течение 4 часов в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>, затем клеточный супернатант с *M. pneumoniae* удаляли, клетки промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и добавляли

1 мл питательной среды с антибиотиками. В лунках с контрольными клетками среда не меняли.

Стабильность инфицирования А549 клеток оценивалась через 24, 48 и 72 часа после замены среды с *M. pneumoniae* в параллельных экспериментах для каждой из концентраций патогена. Инфицирование А549 клеток *M. pneumoniae* было подтверждено обнаружением увеличения концентрации ДНК микроорганизма методом ПЦР-РВ через 24, 48 и 72 часа после замены среды, в контрольных клетках ДНК *M. pneumoniae* не была выявлена.

При инфицировании А549 клеток суспензиями *M. pneumoniae* штамм АТСС 15531, соответствующими стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед, показатель жизнеспособности клеток составил 80 % и выше через 24 и 48 часов (табл. 2.3), что указывало на то, что клетки сохраняют свою жизнеспособность при данных условиях эксперимента [114].

Таблица 2.3

Значения показателя жизнеспособности (%) А549 клеток и относительная экспрессия гена RANTES в экспериментах с *M. pneumoniae* штамм АТСС 15531, Ме (мин...макс)

Условия	24 часа		48 часов		72 часа	
	%	ОЭГ	%	ОЭГ	%	ОЭГ
Контроль <sup>а</sup>	93,2 (92,6...93,4)	1	94,0 (93,6...94,8)	1	89,6 (89,0...89,9)	1
Мр 0,1 Ед	93,9 (90,6...97,5)	1,5 (1,3...2,8)	86,9 (82,4...91,3)	2,7 (2,2...4,5)	85,5 (81,6...89,2)	2,1 (1,8...3,3)
Мр 0,25 Ед	92,3 (89,2...97,6)	2,2 (1,8...3,6)	85,2 (79,5...87,4)	3,2 (2,5...3,8)	78,4 (72,4...83,2)	6,8 (3,9...8,0)
Мр 0,5 Ед	88,4 (82,4...93,8)	10,3 (9,4...11,7)	82,3 (79,5...86,7)	5,2 (5,0...7,4)	75,4 (72,6...81,4)	5,4 (4,3...8,9)

Примечание: <sup>а</sup> — А549 клетки, Мр — *M. pneumoniae*.

Морфологическое исследование монослоев А549 клеток после их инфицирования возбудителем в концентрациях 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед не выявило отличий от контрольных культур клеток (рис. 2.1).

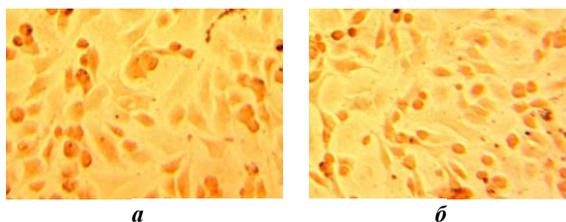


Рис. 2.1. А549 клетки в контроле (а) и при инфицировании *M. pneumoniae* штамм АТСС 15531 в концентрации 0,5 Ед (б) через 24 часа наблюдения

При инфицировании A549 клеток суспензией *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531, соответствующей стандарту МакФарланда 2 Ед, показатель жизнеспособности клеток через 24 часа не превышал 63 %, что позволяет сделать вывод о преимущественно цитотоксическом действии патогена в данной концентрации. В ходе морфологического исследования инфицированных возбудителем монослоев A549 клеток обнаружено, что количество клеток, прикрепленных к поверхности культивирования, меньше, чем в контрольных культурах, что также указывало на цитотоксическое действие (рис. 2.2). Поэтому суспензии *M. pneumoniae* в концентрациях, соответствующих стандартам МакФарланда 2 Ед и выше, не использовались для оценки активирующего действия патогена на A549 клетки.

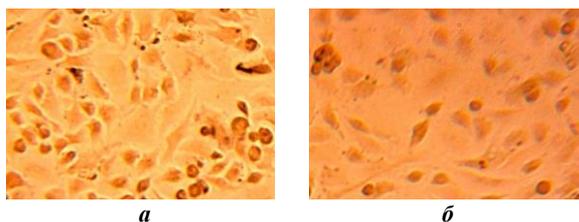


Рис. 2.2. A549 клетки в контроле (а) и при инфицировании *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 в концентрации 2 Ед (б) через 24 часа наблюдения

Следует отметить, что при инфицировании A549 клеток суспензиями *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 в концентрациях свыше 2 Ед по шкале МакФарланда микроорганизм проявлял цитотоксические свойства по отношению к клеткам, однако их жизнеспособность значительно не менялась. В таком случае полученные результаты оценки жизнеспособности A549 клеток при инфицировании *M. pneumoniae* в концентрации 2 Ед по шкале МакФарланда (табл. 2.3) могут рассматриваться как предел цитотоксичности микроорганизма в данном эксперименте. Возможно, добавление питательной среды, состав которой в большей степени, чем состав MEM-2 % FBS обеспечивает питательные потребности *M. pneumoniae*, способно усилить цитотоксичность микроорганизма. В свою очередь уровень метаболизма клеток при инфицировании *in vitro* также оказывает влияние на проявление цитотоксических свойств *M. pneumoniae* [112].

Биологическая модель взаимодействия *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 в концентрациях 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед с A549 клетками использовалась для дальнейшего изучения провоспалительного действия микроорганизма на клетки респираторного эпителия. В качестве

маркера активации A549 клеток при действии *M. pneumoniae* оценивалась экспрессия гена хемокина RANTES, который вырабатывается различными клетками, включая и клетки респираторного эпителия, в ответ на действие патогенных микроорганизмов [115]. Было показано, что хемокин RANTES вырабатывается первичными клетками нормального респираторного эпителия человека *in vitro* при инфицировании *M. pneumoniae* [116]. Экспрессия гена RANTES (табл. 3.3) повышалась (ОЭГ > 1) при действии патогена в суспензиях, соответствующих стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед.

Оценка действия клинических изолятов *M. pneumoniae* на A549 клетки при заданных условиях эксперимента показала сопоставимость результатов с применением стандартного штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531.

Таким образом, была получена модель активации A549 клеток при действии суспензий *M. pneumoniae*, соответствующих стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед, которая использовалась в дальнейшем для изучения провоспалительного действия микроорганизма на клетки респираторного эпителия человека [151].

## 2.2. ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИЙ rCARDS-ТОКСИНА ДЛЯ АКТИВАЦИИ A549 КЛЕТОК

CARDS-токсин *M. pneumoniae* относится к семейству АДФ-рибозилирующих токсинов и характеризуется уникальным сочетанием свойств, таких как способность связываться с поверхностью клеток и катализировать изменение структуры белков клеток [27].

В ходе исследования разработаны биологические модели взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия человека *in vitro*, характеризующиеся использованием rCARDS-токсина для активации клеток респираторного эпителия в отдельном эксперименте и применены для изучения провоспалительного действия *M. pneumoniae*.

Согласно ранее проведенным зарубежным исследованиям rCARDS-токсин в концентрациях от 10 до 50 мкг/мл оказывает цитотоксическое действие на клетки млекопитающих: HeLa, HEp2 и CHO [22].

При моделировании взаимодействия *M. pneumoniae* и rCARDS-токсина с клетками респираторного эпителия A549 клетки пассажей 9–10 переносили в 24-луночные культуральные планшеты в количестве  $5 \times 10^5$  клеток на лунку площадью  $1,9 \text{ см}^2$  в питательной ростовой среде, содержащей среду MEM-2 % FBS, 1 % раствора антибиотиков пенициллин-стрептомицин, и культивировали в условиях увлажненной атмосферы с 5 %  $\text{CO}_2$  при температуре  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  до достижения 100 % конfluence.

Для инфицирования A549 клеток использовались суспензии *M. pneumoniae* в питательной среде для роста микоплазм, соответствующие стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед; 0,5 Ед и 2 Ед. Продолжительность инфицирования клеток составила 4 часа, затем среду с *M. pneumoniae* заменяли на среду MEM-2 % FBS с антибиотиками без микроорганизма и инкубировали A549 клетки в течение 24, 48 и 72 часов в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при температуре 37 °С.

Инфицирование A549 клеток *M. pneumoniae* подтверждали обнаружением увеличения концентрации ДНК микроорганизма в клетках через 24, 48 и 72 часа, о чем судили по снижению порогового цикла амплификации (Ct) при выявлении ДНК *M. pneumoniae* методом ПЦР-РВ через 24, 48 и 72 часа после инфицирования A549 клеток возбудителем.

CARDS-токсин оказывает активирующее и цитопатическое действие на клетки респираторного эпителия [144]. Оценивали действие pCARDS-токсина (MyBioSource, США) в концентрациях от 0,05 мкг до 50 мкг на 1 мл среды в лунке планшета с клетками. После достижения A549 клетками 100 % конфлюэнтности в планшетах культуральную среду без pCARDS-токсина заменяли на среду с pCARDS-токсином и инкубировали A549 клетки в течение 24, 48 и 72 часов в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при температуре 37 °С.

Согласно сертификату анализа (MyBioSource, США) pCARDS-токсин применялся со следующими характеристиками:

– аминокислотная последовательность pCARDS-токсина:

MPNPVRFVYRVDLRSPPEIFENHGFSTLGDVRNFFEHILSTNFGRSYFIS  
TSETPTAAIRFFGSWLREYVPEHPRRAYLYEIRADQHFYNARATGENL  
LDLMRQRQVVFDSGDREMAQMGIRALRTSFAYQREWFTDGPAAAAAN  
VRSALVDAVPVEPGHANHPAGRVVETTRINEPEMHNPHYQELQQTQ  
ANDQPWLPTPGIA;

– концентрация 0,6 мг/мл (метод Брэдфорд);

– чистота pCARDS-токсина составила 85 %; чистоту определяли путем денситометрического анализа изображения окрашенной раствором Кумасси бриллиантового синего фракции в полиакриламидного геля (ПААГ) после электрофореза в присутствии SDS;

– молекулярная масса 34 kDa;

– уровень эндотоксина < 1,0 ЕЭ (единицы эндотоксина) на 1 мг протеина при оценке методом определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ-тест).

Через 24, 48 и 72 часа после инфицирования A549 клеток *M. pneumoniae* или инкубирования с pCARDS-токсином супернатанты клеточных культур собирали для оценки синтеза провоспалительных цитокинов методом ИФА. RLT лизирующий буфер (Qiagen, Германия) добавляли

в каждую лунку 24-луночных планшетов для лизиса клеток, последующей экстракции РНК и проведения молекулярно-генетического анализа экспрессии генов провоспалительных цитокинов.

Цитотоксичность при действии *M. pneumoniae* и pCARDS-токсина на А549 клетки оценивалась после окрашивания трипановым синим [107] как относительное количество нежизнеспособных клеток. Для этого А549 клетки отделяли с поверхности роста путем обработки 0,25 % трипсином, 20 мкл клеточной суспензии смешивали с 20 мкл 0,4 % раствора трипанового синего, в камере Горяева производили подсчет светлых клеток (не содержащих трипановый синий, жизнеспособных) и темных клеток (содержащих включения трипанового синего, нежизнеспособных). Расчет показателя цитотоксичности (%) проводили по формуле: [количество темных клеток / (количество темных клеток + количество светлых)]. Показатель жизнеспособности (%) рассчитывался как (100 % – показатель цитотоксичности).

В качестве положительного контроля цитотоксичности применяли 3 % формальдегид, в качестве отрицательного контроля цитотоксичности выступали сами А549 клетки.

Тест на цитотоксичность выполняли в 3 параллельных экспериментах в 1–4 повторах в каждом.

Для создания модели активации А549 клеток pCARDS-токсином было оценено действие pCARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5; 20 и 50 мкг/мл. При действии pCARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл жизнеспособность А549 клеток составила 80 % и выше, экспрессия гена RANTES была повышена (ОЭГ > 1) (табл. 2.4), что в совокупности свидетельствовало об активации А549 клеток при действии pCARDS-токсина в концентрациях от 0,05 до 20 мкг/мл.

Таблица 2.4

**Значения показателя жизнеспособности (%) А549 клеток и относительная экспрессия гена RANTES в экспериментах с pCARDS-токсином, Me (мин...макс)**

Условия	24 часа		48 часов		72 часа	
	%	ОЭГ	%	ОЭГ	%	ОЭГ
Контроль <sup>а</sup>	93,2 (92,6...93,4)	1	94,0 (93,6...94,8)	1	89,6 (89,0...89,9)	1
pCARDS 0,05	96,3 (95,7...96,7)	6,4 (4,5...7,7)	87,9 (86,5...88,4)	1,4 (1,2...4,2)	85,6 (85,0...86,1)	2,2 (1,8...2,6)
pCARDS 0,5	95,8 (95,1...96,7)	8,5 (6,6...10,5)	91,1 (90,7...91,8)	3,7 (2,9...6,2)	86,5 (85,8...87,0)	4,9 (3,8...5,1)
pCARDS 5	93,8 (93,3...94,6)	22,5 (19,0...24,3)	87,3 (86,9...88,4)	10,7 (9,8...12,2)	86,6 (85,7...87,4)	7,7 (6,8...8,7)
pCARDS 20	89,4 (88,8...89,8)	53,7 (49,3...56,4)	84,9 (81,4...83,4)	32,6 (30,9...37,0)	79,9 (79,4...81,2)	16,8 (15,6...20,2)

Примечание: <sup>а</sup> — А549 клетки.

Показатель жизнеспособности A549 клеток при действии rCARDS-токсина в концентрации 50 мкг на 1 мл среды через 24 часа не превышал 71 %. Полученный результат позволяют сделать вывод о преимущественно цитотоксическом действии rCARDS-токсина в данной концентрации в отношении A549 клеток. Поэтому в дальнейших исследованиях по оценке провоспалительного действия rCARDS-токсина на A549 клетки данный токсин в концентрации 50 мкг на 1 мл среды и выше не использовался.

Полученная модель активации A549 клеток при действии rCARDS-токсина, в которой rCARDS-токсин добавляли в концентрациях от 0,05 до 20 мкг/мл, была использована для изучения патогенных свойств *M. pneumoniae*, проявляющихся в продукции провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия при действии токсина [151].

### **2.3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *Mycoplasma pneumoniae* И rCARDS-ТОКСИНА С КЛЕТКАМИ РЕСПИРАТОРНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ПРИСУТСТВИИ ПРОТЕИНА А СУРФАКТАНТА ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА**

SP-A является известным модулятором иммунных реакций в легких. SP-A человека был любезно предоставлен доктором Аластером Уотсоном, Саутгемптонский университет, Англия. SP-A выделен из БАЛ пациентов с альвеолярным протеинозом методом экстракции с бутанолом [117, 118]. В БАЛ человека SP-A формирует октадекамер размером 650 kDa, состоящий из 6 тримеров, каждый тример сформирован продуктами генов *Sftpa1* и *Sftpa2* (две SP-A1 молекулы и одна SP-A2 молекула) [119].

Чтобы учесть фактор влияния SP-A на A549 клетки монослои клеток преинкубировали с 7 мкг белка на 1 мл среды в течение 30 минут при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. При выборе экспериментального количества SP-A учитывали, что SP-A присутствует в БАЛ здоровых взрослых в концентрациях от 5,8–36,0 мкг/мл [120, 121].

SP-A принимает участие в обеспечении противомикробной защиты и поддержании целостности ткани легкого. В данном исследовании показано, что SP-A активирует A549 клетки, что проявляется в незначительном повышении экспрессии гена RANTES, при этом клетки сохраняли высокую жизнеспособность (табл. 2.5).

*M. pneumoniae* как преимущественно внеклеточный патоген и выделяемый ею CARDS-токсин взаимодействуют с SP-A [21, 36, 37].

На поверхности грибов, вирусов и бактерий обнаружены различные молекулы, которые являются рецепторами SP-A [119]. К таким молекулам относятся липиды наружной поверхности клеточной мембраны *M. pneumoniae*. В результате взаимодействия SP-A с липопротеинами

*M. pneumoniae* в культуре замедляется рост популяции микроорганизма (бактериостатический эффект) [36].

Таблица 2.5

Значения показателя жизнеспособности (%) А549 клеток и относительная экспрессия гена RANTES в экспериментах с SP-A, Me (мин...макс)

Условия	24 часа		48 часов		72 часа	
	%	ОЭГ	%	ОЭГ	%	ОЭГ
Контроль	97,3 (96,9...98,3)	1	95,6 (94,7...96,6)	1	96,4 (95,8...97,2)	1
SP-A	96,8 (96,0...98,1)	1,9 (1,2...1,6)	98,4 (97,2...99,0)	1,3 (1,2...1,4)	94,5 (94,0...95,7)	1,1 (1,1...1,3)

При моделировании взаимодействия *M. pneumoniae* и pCARDS-токсина с клетками респираторного эпителия после инкубации А549 клеток с SP-A параллельно проводили два эксперимента: инфицирование А549 клеток суспензиями *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531, соответствующими стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед и действие на А549 клетки pCARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл.

В целом критерии активации А549 клеток соответствовали таковым в первой биологической модели: клетки сохраняли высокую жизнеспособность и наблюдалось увеличение экспрессии гена RANTES (табл. 2.6, 2.7).

Таблица 2.6

Значения показателя жизнеспособности (%) А549 клеток и относительная экспрессия гена RANTES в экспериментах с *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 в присутствии SP-A, Me (мин...макс)

Условия	24 часа		48 часов		72 часа	
	%	ОЭГ	%	ОЭГ	%	ОЭГ
Контроль <sup>а</sup>	94,4 (93,8...95,1)	1	92,6 (90,7...95,5)	1	91,8 (85,6...93,3)	1
Мр 0,1 Ед	94,8 (93,5...96,4)	0,2 (0,1...0,3)	87,3 (79,2...90,8)	2,8 (2,4...3,0)	88,4 (82,7...90,4)	1,8 (1,5...2,1)
Мр 0,25 Ед	91,9 (89,8...95,2)	0,4 (0,3...0,5)	86,5 (80,6...89,6)	5,7 (3,8...6,7)	80,6 (76,5...84,8)	3,3 (2,8...3,8)
Мр 0,5 Ед	85,6 (83,3...90,7)	0,3 (0,2...0,4)	81,7 (78,3...87,1)	3,9 (3,4...6,2)	78,9 (76,5...82,6)	6,3 (4,5...6,6)

Примечание: <sup>а</sup> — SP-A+А549 клетки, Мр — *M. pneumoniae*.

Как видно из табл. 2.6, если в первые 24 часа А549 клетки отвечают повышением экспрессии гена RANTES преимущественно в ответ на внесение SP-A (ОЭГ < 1), то уже через 48 часов как при инфицировании *M. pneumoniae*, так и при действии pCARDS-токсина ОЭГ > 1 (табл. 2.6, 2.7), что подтверждает активацию А549 клеток патогеном и pCARDS-токсином.

В присутствии SP-A *M. pneumoniae* в концентрации 2 Ед по шкале МакФарланда и pCARDS-токсин в концентрации 50 мкг/мл вызывали снижение жизнеспособности А549 клеток через 24 часа до 67 % и 74 % соответственно, что свидетельствовало о преимущественно цитотоксическом действии возбудителя и pCARDS-токсина в данных концентрациях. Как и в первой разработанной биологической модели *in vitro* патоген и токсин в данных концентрациях не применялись для оценки провоспалительного действия на А549 клетки.

Таблица 2.7

**Значения показателя жизнеспособности (%) А549 клеток и относительная экспрессия гена RANTES в экспериментах с pCARDS-токсином в присутствии SP-A, Me (мин...макс)**

Условия	24 часа		48 часов		72 часа	
	%	ОЭГ	%	ОЭГ	%	ОЭГ
Контроль <sup>а</sup>	97,7 (93,0...94,6)	1	95,2 (90,5...98,1)	1	88,6 (85,2...92,3)	1
pCARDS 0,05	95,3 (94,9...97,2)	15,3 (12,9...18,9)	86,5 (83,0...92,5)	1,4 (1,2...4,2)	86,6 (82,4...88,4)	3,5 (2,9...4,7)
pCARDS 0,5	92,0 (95,1...96,7)	35,4 (29,9...38,8)	92,7 (87,4...96,0)	3,7 (2,9...6,2)	85,5 (81,6...89,9)	6,4 (5,9...12,9)
pCARDS 5	93,8 (90,3...96,7)	68,4 (62,6...71,9)	88,2 (82,5...92,1)	10,7 (9,8...12,2)	88,6 (84,2...90,4)	25,2 (23,9...33,4)
pCARDS 20	83,0 (79,4...91,5)	164,8 (149,2...185,6)	85,4 (80,6...89,3)	32,6 (30,9...37,0)	78,9 (76,3...84,1)	57,2 (49,3...86,3)

Примечание: <sup>а</sup> — SP-A+А549 клетки.

Вторая биологическая модель применена для изучения провоспалительного действия патогена и токсина в условиях, приближенным к условиям *in vivo*, т.е. физиологическим.

Использование в обоих разработанных биологических моделях *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531, являющегося референсным штаммом микроорганизма, позволило стандартизировать условия для изучения провоспалительного действия патогена *in vitro*, последующее исследование действия клинических изолятов *M. pneumoniae* на А549 клетки в разработанных моделях показало сопоставимость результатов с применением стандартного штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531.

### Выводы

1. *M. pneumoniae* и pCARDS-токсин оказывают активирующее и цитотоксическое действие в отношении А549 клеток. Проявление активирующего и цитотоксического действия *M. pneumoniae* и pCARDS-токсина зависит от концентраций патогена и токсина.

2. Разработаны модели взаимодействия *M. pneumoniae* и pCARDS-токсина с А549 клетками путем определения концентраций возбудителя

и рCARDS-токсина, оптимальных для изучения провоспалительного действия микроорганизма и его токсина на клетки респираторного эпителия *in vitro*.

3. Разработанные модели взаимодействия *M. pneumoniae* и рCARDS-токсина с клетками респираторного эпителия человека *in vitro* включают инфицирование А549 клеток суспензиями *M. pneumoniae*, соответствующими стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед, и воздействие рCARDS-токсина в концентрациях от 0,05 до 20 мкг/мл в отдельных экспериментах, а также модель, в которой А549 клетки инкубировали с SP-A и затем параллельно проводили два эксперимента: инфицирование А549 клеток суспензиями *M. pneumoniae* и действие на А549 клетки рCARDS-токсина для изучения провоспалительного действия возбудителя в условиях, близким к условиям *in vivo*, т. е. физиологическим.

4. Жизнеспособность А549 клеток при инфицировании суспензиями *M. pneumoniae*, соответствующими стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед, и действию рCARDS-токсина в концентрациях от 0,05 до 20 мкг/мл, оцененная в тесте с трипановым синим, составила 80 % и более, активирующее действие *M. pneumoniae* и рCARDS-токсина на А549 клетки было оценено по экспрессии гена хемокина RANTES.

5. Проведенный расчет экономической эффективности использования разработанных биологических моделей взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия *in vitro* позволяет сделать вывод о снижении затрат при ее использовании на 30 % в сравнении с проведением экспериментов на животных, при этом не маловажным является возможность использования разработанных биологических моделей взаимодействия *M. pneumoniae* и рCARDS-токсина с клетками респираторного эпителия как альтернативы экспериментам на животных.

### ГЛАВА 3

## **ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ IN VITRO ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* НА КЛЕТКИ РЕСПИРАТОРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА**

### **3.1. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, RANTES И ПРОДУКЦИИ ИЛ-33 А549 КЛЕТКАМИ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *M.PNEUMONIAE* И ДЕЙСТВИИ рCARDS-ТОКСИНА**

В экспериментах было показано, что помимо прямого цитопатического действия, *M. pneumoniae* способна инициировать массивный воспалительный ответ в легких, сопровождающийся активацией клеток иммунной системы и выработкой широкого спектра цитокинов. Равно-

весие между эффективным воспалительным ответом и поддержанием целостности ткани легких, обеспечиваемое факторами видовой иммунологической защиты легких, в значительной степени чувствительно к действию инфекционных агентов. При инфицировании *M. pneumoniae* запускаются иммунологические реакции, сопровождающиеся процессами деструкции легочной ткани [45].

При действии *M. pneumoniae* и CARDS-токсина клетки респираторного эпителия вырабатывают цитокины, которые регулируют развитие местных противомикробных защитных реакций в респираторном тракте.

Локальная продукция провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия играет существенную роль в патогенности и исходе микоплазменной инфекции, поэтому исследование их продукции при активном действии *M. pneumoniae* и CARDS-токсина может внести существенный вклад в понимание особенностей формирования воспалительных реакций, ассоциированных с инфицированием *M. pneumoniae* [28].

Разработанные биологические модели взаимодействия *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 и pCARDS-токсина с A549 клетками респираторного эпителия человека применены для проведения оценки влияния *M. pneumoniae* и pCARDS-токсина на экспрессию генов провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, RANTES и продукцию ИЛ-33 клетками респираторного эпителия *in vitro*.

Ключевыми цитокинами в инициации воспаления и бактерицидных реакций являются цитокины ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6, которые вырабатываются различными типами клеток (моноциты, макрофаги, лимфоциты), в том числе и эпителиальными клетками респираторного тракта [124, 125].

Суммарную РНК экстрагировали из A549 клеток с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Количество и качество выделенной РНК оценивали путем измерения оптической плотности растворов РНК на длинах волн 260 нм и 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, США), рассчитывали отношение абсорбций 260 нм/280 нм.

Равные количества РНК (330 нг) подвергались обратной транскрипции с использованием набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Аликвоты полученных растворов одноцепочечных кДНК в объеме 1 мкл (16,5 нг) использовали для проведения ПЦР-ПВ с применением набора TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США) на приборе StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США), итоговый объем ПЦР-реакции составил 10 мкл. Программа амплификации: 50 °C 2 минуты, 95 °C 10 минут, 45 циклов при 95 °C в течение 15 секунд и 60 °C — в течение 15 секунд.

ПЦР-РВ проводили с использованием специфических праймеров и зондов для каждого гена: ФНО- $\alpha$  Hs01113624\_g1, RANTES Hs00982282\_m1, ИЛ-6 Hs00985639\_m1, GAPDHs02786624\_g1 (Life Technologies, США).

Наличие экспрессии генов ФНО- $\alpha$ , RANTES, ИЛ-6 и GAPDH определяли по каналу FAM, при этом значения порогового цикла находились от 26 до 35 для генов ФНО- $\alpha$ , RANTES и ИЛ-6, и от 17 до 20 для гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). Отсутствие экспрессии генов ФНО- $\alpha$ , RANTES и ИЛ-6 определяли по каналу FAM — значение порогового цикла не определяется или больше 35.

Относительную экспрессию генов (ОЭГ) цитокинов ФНО- $\alpha$ , RANTES и ИЛ-6 (таргетных генов, Т) оценивали методом сравнения  $C_T$  ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) [108] с использованием гена GAPDH в качестве референсного гена (Р). ОЭГ оценивали в A549 клетках, подвергавшихся инфицированию *M. pneumoniae* или воздействию рCARDS-токсина (таргетных клетках, Т) по отношению к контрольным A549 клеткам (К), которые не испытывали действия возбудителя или рCARDS-токсина и культивировались в монослоях в тех же экспериментах, что и таргетные A549 клетки.

$$\text{ОЭГ} = 2^{-\Delta\Delta C_T},$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_{TТ} - C_{TР}) - (C_{КТ} - C_{КР}),$$

где  $C_{TТ}$  — пороговый цикл амплификации таргетного гена в таргетных A549 клетках;  $C_{TР}$  — пороговый цикл амплификации референсного гена в таргетных A549 клетках;  $C_{КТ}$  — пороговый цикл амплификации таргетного гена в контрольных A549 клетках;  $C_{КР}$  — пороговый цикл амплификации референсного гена в контрольных A549 клетках.

Значения ОЭГ  $> 1$  свидетельствовали об увеличении уровня экспрессии гена, значения ОЭГ от 0 до 1 характеризовали ее снижение. ОЭГ в контрольных A549 клетках принимали равным 1.

Было показано, что инфицирование A549 клеток суспензиями *M. pneumoniae*, соответствующими стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед, и действие рCARDS-токсина в концентрациях 0,05 и 0,5 мкг/мл не сопровождалось экспрессией генов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6. В свою очередь стимулирование A549 клеток рCARDS-токсином в концентрациях 5 и 20 мкг/мл приводило к увеличению экспрессии гена ФНО- $\alpha$  (с максимумом через 24 часа) и гена ИЛ-6 (с максимумом через 48 часов) во всех временных промежутках после активации клеток рCARDS-токсином (табл. 3.1) [147]. Относительная экспрессия генов оценивалась по отношению к контрольным A549 клеткам, которые не испытывали действия *M. pneumoniae* или рCARDS-токсина и культивировались в монослоях в тех же экспериментах, что и таргетные A549 клетки, подвергавшиеся воздействию возбудителя или рCARDS-токсина.

Относительная экспрессия генов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6 A549 клетками при действии рCARDS-токсина, Me (мин...макс)

Условия эксперимента	24 часа	48 часов	72 часа
ФНО- $\alpha$			
CARDS 5	2,5 (2,4...2,8)	2,2 (1,9...2,5)	1,4 (1,3...1,6)
SP-A+CARDS 5	<b>5,8 (5,6...6,6)*</b>	<b>4,8 (4,7...5,0)*</b>	<b>4,8 (4,2...5,0)*</b>
CARDS 20	6,6 (6,0...6,9)	4,7 (4,1...5,0)	3,9 (3,0...4,2)
SP-A+CARDS 20	<b>41,5 (39,6...42,0)*</b>	<b>31,6 (27,4...32,9)*</b>	<b>29,8 (27,1...30,0)*</b>
ИЛ-6			
CARDS 5	2,3 (2,0...2,9)	5,3 (5,1...5,9)	2,2 (1,9...2,6)
SP-A+CARDS 5	<b>5,2 (4,7...5,8)*</b>	<b>9,1 (8,9...9,6)*</b>	<b>6,6 (6,6...7,3)*</b>
CARDS 20	6,1 (5,9...6,3)	10,1 (9,9...10,9)	6,3 (5,9...6,9)
SP-A+CARDS 20	<b>16,5 (14,5...17,1)*</b>	<b>35,0 (33,3...37,8)*</b>	<b>10,3 (9,6...11,2)*</b>

Примечание: \* различия значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

*M. pneumoniae* обладает способностью влиять на активность NF- $\kappa$ B, который регулирует внутриклеточные процессы, связанные с воспалением, повышая экспрессию генов эффекторных и регуляторных молекул воспалительных реакций в различных клетках [19]. После прикрепления *M. pneumoniae* сначала к эпителиальным клеткам респираторного тракта, затем к альвеолярным макрофагам, происходит активация клеток путем передачи сигнала от TLR, с которым взаимодействуют липопротеины *M. pneumoniae*. Поскольку у микоплазм отсутствует клеточная стенка, они не содержат молекул (липополисахарид, пептидогликаны, липотейхоевые кислоты), которые традиционно выступают в роли антигенов у других микроорганизмов. Липопротеины *M. pneumoniae* являются основными молекулами-активаторами факторов видовой иммунитета [19]. Описаны гены более 30 различных липопротеинов *M. pneumoniae*. Показано, что липопротеины N-ALP1/N-ALP2 и F<sub>0</sub>F<sub>142</sub>ТФаза *M. pneumoniae* активируют NF- $\kappa$ B через TLR-1, TLR-2 или TLR-1, TLR-2, TLR-6 сигнальные пути. Стимулы от данных TLRs связаны с продукцией цитокинов, которые обеспечивают миграцию лимфоцитов и нейтрофилов и инициируют воспаление в легких.

ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6 взаимодействуют с различными типами клеток в дыхательной системе, включая клетки респираторного эпителия, моноциты и макрофаги, а также клетки сосудистого эндотелия, что приводит к активации трех сигнальных путей: митоген-активируемого протеинкиназного каскада (МАРК), сигнального пути NF- $\kappa$ B и сигнального пути JAK-STAT. При этом инициируется экспрессия ряда цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-8, RANTES и др.), обладающих, как и ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6, провоспалительным действием [126, 127]. Формирование каскада цитоки-

нов усиливает воспалительный ответ в респираторном тракте при микоплазменной инфекции.

Поскольку *M. pneumoniae* ассоциирована с развитием БА [7], а действие CARDS-токсина рассматривается как действие классического аллергена [57], то представляет интерес изучение продукции цитокина ИЛ-33, который вырабатывается клетками респираторного эпителия и ассоциирован с развитием аллергических заболеваний и БА [35, 128].

ИЛ-33 — провоспалительный цитокин семейства ИЛ-1, который конститутивно синтезируется эпителиальными клетками и локализуется в ядре, однако при повреждении барьерных тканей (механическим, действием токсинов бактерий) ИЛ-33 выделяется во внеклеточное пространство для активации факторов врожденного иммунитета.

Показано, что клетки респираторного эпителия являются основным источником ИЛ-33 при формировании аллергического варианта иммунного ответа в респираторном тракте [34]. В ответ на действие ИЛ-33 вырабатываются цитокины, стимулирующие Th2 иммунный ответ, которому отводится ключевая роль в возникновении и поддержании аллергического воспаления [35, 128].

Концентрацию ИЛ-33 определяли методом ИФА (R&D Systems, США) в соответствии с инструкцией к набору производителя. Чувствительность анализа составила 1,51 пг/мл.

Основные изменения в продукции ИЛ-33 наблюдались через 48 часов после инфицирования *M. pneumoniae* и действия rCARDS-токсина. Выход ИЛ-33 в клеточные супернатанты составил: 10,5 (9,8...13,8), 24,4 (22,2...30,0) и 60,0 (56,8...61,4) пг/мл при инфицировании *M. pneumoniae* в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 Ед МакФарланда, 18,5 (15,5...21,0), 34,6 (31,3...40,1), 68,0 (60,0...76,5) и 105,4 (90,5...129,7) пг/мл при действии rCARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл соответственно. Концентрации ИЛ-33 положительно коррелировали с концентрациями *M. pneumoniae* и rCARDS-токсина ( $R = 0,949-0,963$ ;  $p < 0,05$ ) [147].

Полученные результаты выделения ИЛ-33 в клеточные супернатанты при инфицировании A549 клеток *M. pneumoniae* и действии rCARDS токсина *in vitro* соответствуют клиническим наблюдениям, в которых исследовалось содержание ИЛ-33 в сыворотке крови и БАЛ пациентов с микоплазменной пневмонией. Было показано, что ИЛ-33 присутствовал как в сыворотке крови, так и в БАЛ пациентов с пневмонией, ассоциированной с инфицированием *M. pneumoniae* [32].

Роль ИЛ-33 в реакциях видового иммунитета заключается в их усилении. Однако помимо обеспечения эффективности видового иммунитета в ходе защиты против чужеродных агентов, к которым относятся патогенные микроорганизмы, ИЛ-33 участвует в формировании аллер-

гического патологического процесса [35, 128]. Внутриклеточный каскад реакций, который обеспечивает выделение ИЛ-33, включает активацию ряда внутриклеточных сигнальных молекул, таких как STAT, АКТ и р38 [35, 128]. Обнаружение *M. pneumoniae* у пациентов с бронхиальной астмой [45–51] и способность CARDS-токсина микроорганизма индуцировать аллергический воспалительный ответ в экспериментах *in vivo* [57] указывают на то, что патогенные свойства *M. pneumoniae* связаны с участием в формировании аллергических реакций.

При разработке биологических моделей взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия *in vitro* было показано, что *M. pneumoniae* и рCARDS приводят к усилению экспрессии гена хемокина RANTES, который, как и ИЛ-33, является медиатором видового иммунитета и ассоциирован с аллергическим воспалением.

Хемокин RANTES координирует иммунные реакции. Он не только индуцирует хемотаксис иммунных клеток, но и способен вызывать их активацию, сопровождающуюся синтезом молекул адгезии, повышенной продукцией активных форм кислорода и дегрануляцией. RANTES вовлечен в формирование воспалительных реакций, ассоциированных с БА, через активацию эозинофилов и базофилов [34].

Таким образом, наблюдаемые в данном исследовании усиление экспрессии гена RANTES и увеличение продукции ИЛ-33 клетками респираторного эпителия при действии *M. pneumoniae in vitro* свидетельствуют о такой характеристике патогенного действия *M. pneumoniae*, как способность индуцировать выделение клетками респираторного эпителия цитокинов, участвующих в формировании аллергического воспаления.

### **3.2. ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ И рCARDS-ТОКСИНА В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК РЕСПИРАТОРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ SP-A**

Взаимодействие *M. pneumoniae* и CARDS-токсина с SP-A может влиять на экспрессию и продукцию провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия *in vitro* при инфицировании *M. pneumoniae* [21, 36, 37].

В легких SP-A секретируется альвеолярными клетками II типа и клетками Клара [36]. SP-A относится к семейству коллектинов. Одной из основных биологических функций коллектинов является способность к опсонизации патогенных микроорганизмов, что усиливает фагоцитоз и обеспечивает эффективное их элиминирование из организма. SP-A стимулирует хемотаксис макрофагов, влияет на пролиферацию иммунных клеток и продукцию провоспалительных цитокинов клетками респираторного эпителия [119].

Влияние SP-A на проявление патогенных свойств *M. pneumoniae* может быть опосредовано через рецепторные молекулы клеток. В процессе адгезии к клеткам респираторного тракта *M. pneumoniae* связывается с поверхностными рецепторными молекулами TLR2 и TLR4, что приводит к активации синтеза провоспалительных цитокинов. Нарушение процесса связывания *M. pneumoniae* с TLR2 и TLR4 приводит к тому, что возбудитель теряет способность индуцировать экспрессию провоспалительных цитокинов. SP-A также взаимодействует с TLR2 и TLR4, поэтому может модулировать активирующее влияние *M. pneumoniae* на клетки респираторного тракта через данные молекулы [129].

Роль SP-A в регулировании противомикробного иммунитета не является однозначной: в зависимости от объекта действия SP-A и микроокружения SP-A может стимулировать как про- так и противовоспалительный иммунный ответ.

В данном исследовании изучено провоспалительное действие *M. pneumoniae* и pCARDS-токсина на клетки респираторного эпителия с использованием разработанной модели, включающей этап инкубирования A549 клеток с SP-A. Относительная экспрессия генов оценивалась по отношению к контрольным A549 клеткам, которые не испытывали действия *M. pneumoniae* или pCARDS-токсина и культивировались в монослоях в тех же экспериментах, что и таргетные A549 клетки, подвергавшиеся воздействию возбудителя или pCARDS-токсина. Контрольные A549 клетки, как и таргетные, преинкубировали с SP-A.

При стимулировании клеток pCARDS-токсином в концентрациях 5 и 20 мкг/мл SP-A не оказывал протективного эффекта, выражающегося в снижении экспрессии генов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6. Напротив, экспрессия генов данных цитокинов в условиях предварительной инкубации клеток с SP-A с последующим добавлением токсина была значимо выше, чем при отсутствии белка (см. табл. 3.1). Можно сделать вывод, что SP-A, который способен взаимодействовать с CARDS-токсином, потенцирует его активирующее действие на клетки респираторного эпителия, что сопровождается повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6 [147].

Наиболее чувствительным маркером инфицирования *M. pneumoniae* и действия pCARDS-токсина на респираторные клетки стал хемокин RANTES. Респираторный тракт является важным источником RANTES, поскольку данный хемокин выделяется различными клетками дыхательной системы и помимо участия в защитных реакциях видового иммунитета ассоциирован с аллергическим воспалением через активацию эффекторных клеток аллергии [39, 116]. Экспрессия гена RANTES регулируется множеством транскрипционных факторов, среди которых

основными являются NF-κB и регуляторный фактор транскрипции интерферонов 3 (IRF3). Важную роль в стимулировании экспрессии гена RANTES играет сигнал от ФНО-α, который активирует NF-κB [130].

С применением разработанной модели взаимодействия *M. pneumoniae* и рCARDS-токсина с А549 клетками показано, что экспрессия гена RANTES повышалась при действии патогена и его токсина (табл. 3.1, рис. 3.1).

Оценка провоспалительного действия микроорганизма и рCARDS-токсина в разработанной в ходе исследования модели с внесением SP-A выявило особенности экспрессии гена RANTES А549 клетками. Она снижалась через 24 часа после инфицирования *M. pneumoniae*, однако при более продолжительном культивировании инфицированных патогеном клеток (48 и 72 часа) экспрессия гена RANTES повышалась. Действие рCARDS-токсина сопровождалось увеличением экспрессии гена RANTES в каждом временном периоде — через 24, 48 и 72 часа (табл. 3.2). Показатель ОЭГ RANTES положительно коррелировал с дозами токсина во временном промежутке 24 часа ( $R = 0,963$ ;  $p < 0,05$ ).

Результаты экспериментов *in vivo* показали существенную роль SP-A в ограничении аллергического воспаления при инфицировании *M. pneumoniae*. У генетически модифицированных SP-A<sup>-/-</sup> нокаут мышей, у которых отсутствовал ген SP-A, наблюдалась повышенная гиперреактивность дыхательных путей и продукция слизи при инфицировании *M. pneumoniae* в сравнении с диким видом [37].

Таблица 3.2

Относительная экспрессия гена RANTES А549 клетками в экспериментах с *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 и рCARDS токсином, Me (мин...макс)

Условия эксперимента	24 часа	48 часов	72 часа
Mr 0,1 Ед	1,5 (1,3...2,8)	2,7 (2,2...4,5)	2,1 (1,8...3,3)
SP-A+Mr 0,1 Ед	<b>0,2 (0,2...0,3)*</b>	2,8 (2,4...3,0)	1,8 (1,5...2,1)
Mr 0,25 Ед	2,2 (1,8...3,6)	3,2 (2,5...3,8)	6,8 (3,9...8,0)
SP-A+Mr 0,25 Ед	<b>0,4 (0,4...0,5)*</b>	5,7 (3,8...6,7)	3,3 (2,8...3,8)
Mr 0,5 Ед	10,3 (9,4...11,7)	5,2 (5,0...7,4)	5,4 (4,3...8,9)
SP-A+Mr 0,5 Ед	<b>0,3 (0,3...0,4)*</b>	3,9 (3,4...6,2)	6,3 (4,5...6,6)
CARDS 0,05	6,4 (4,5...7,7)	1,4 (1,2...4,2)	2,2 (1,8...2,6)
SP-A+CARDS 0,05	<b>15,3 (12,9...18,9)*</b>	7,3 (5,1...10,6)	3,5 (2,9...4,7)
CARDS 0,5	8,5 (6,6...10,5)	3,7 (2,9...6,2)	4,9 (3,8...5,1)
SP-A+CARDS 0,5	<b>35,4 (29,9...38,8)*</b>	17,4 (10,3...20,3)	6,4 (5,9...12,9)
CARDS 5	22,5 (19,0...24,3)	10,7 (9,8...12,2)	7,7 (6,8...8,7)
SP-A+CARDS 5	<b>68,4 (62,6...71,9)*</b>	<b>47,3 (36,0...51,7)*</b>	<b>25,2 (23,9...33,4)*</b>
CARDS 20	53,7 (49,3...56,4)	32,6 (30,9...37,0)	16,8 (15,6...20,2)
SP-A+CARDS 20	<b>164,8 (149,2...185,6)*</b>	<b>143,6 (96,6...228,9)*</b>	<b>57,2 (49,3...86,3)*</b>

Примечание: \* различия значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Block Type	96well								
2	Chemistry	TAQMAN								
3	Experiment	D:\Applied Biosystems\StepOne Software v2.1\experiments\TATSIANA\20-08-2018\PLATE8.edb								
4	Experiment	2018-08-20 15:02:21 PM CEST								
5	Instrument	steponeplus								
6	Passive Reference	ROX								
7										
8	Well	Sample Name	Target Name	Reporter	Quencher	RQ	RQ Min	RQ Max	Сt	Сt Mean
9	B1	SP K 24	RANTES	FAM	NFQ-MGB	1	0,02703	36,99548	34,71877	35,9266
10	B2	SP T 0,05 24	RANTES	FAM	NFQ-MGB	22,06251	8,785816	55,40228	30,01918	30,31277
11	B3	SP T 0,5 24	RANTES	FAM	NFQ-MGB	17,48365	5,513258	55,44416	30,71247	31,09536
12	B4	SP T 5 24	RANTES	FAM	NFQ-MGB	332,5631	159,0497	695,369	26,21038	26,32278
13	B5	SP T 20 24	RANTES	FAM	NFQ-MGB	2182,54	1145,91	4156,938	24,64268	24,71638
14	B6	SP K 48	RANTES	FAM	NFQ-MGB	0,865049	0,433015	1,728137	33,93945	34,16863
15	B7	SP T 0,05 48	RANTES	FAM	NFQ-MGB	17,1917	4,274904	69,13714	30,49212	30,89402
16	B8	SP T 0,5 48	RANTES	FAM	NFQ-MGB	21,20624	7,688937	58,48722	29,73259	30,04447
17	B9	SP T 5 48	RANTES	FAM	NFQ-MGB	74,6629	36,13197	154,283	28,40597	28,57115
18	B10	SP T 20 48	RANTES	FAM	NFQ-MGB	470,7619	218,2519	1015,417	27,73305	27,51721
19	H1	SP K 24	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	1	0,171819	5,820086	20,30725	19,72226
20	H2	SP T 0,05 24	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,679822	0,404245	1,14326	19,2749	19,12907
21	H3	SP T 0,5 24	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,789727	0,388455	1,605512	19,59106	19,35987
22	H4	SP T 5 24	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,540893	0,26035	1,123738	19,49043	19,38285
23	H5	SP T 20 24	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,382756	0,208865	0,70142	20,99276	20,98968
24	H6	SP K 48	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,415328	0,269344	0,640437	19,16378	19,02316
25	H7	SP T 0,05 48	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,593697	0,286362	1,230877	19,60544	19,54586
26	H8	SP T 0,5 48	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,43806	0,280537	0,684033	19,49996	19,43769
27	H9	SP T 5 48	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,640509	0,315998	1,29827	19,38768	19,23218
28	H10	SP T 20 48	GAPDH	FAM	NFQ-MGB	0,719455	0,36854	1,404504	20,84162	20,66709

Рис. 3.1. Фрагмент таблицы с результатами амплификации кДНК гена RANTES и референсного гена GAPDH

В данном исследовании с применением разработанных моделей показано, что после инкубации A549 клеток с SP-A и последующего стимулирующего действия *M. pneumoniae* и pCARDS-токсина выход ИЛ-33, который ассоциирован с аллергическими ответом, в среду культивирования был значимо снижен в сравнении с экспериментами без преинкубации клеток с SP-A (рис. 3.2): 4,2 (4,0...5,0), 8,6 (6,3...8,7) и 17,6 (15,9...19,9) пг/мл при инфицировании *M. pneumoniae* в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 Ед МакФарланда, 9,7 (8,2...10,3), 17,7 (16,2...22,0), 23,8 (16,2...30,9) и 56,0 (55,5...62,2) пг/мл при действии pCARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл соответственно через 48 часов [147].

Полученный результат позволяет предположить, что SP-A при взаимодействии с *M. pneumoniae* и pCARDS-токсином *in vitro* способен ограничивать патогенное действие возбудителя, связанное с участием в формировании аллергического воспаления, что проявляется в снижении продукции цитокина ИЛ-33 клетками респираторного эпителия при инфицировании *M. pneumoniae* и действии pCARDS-токсина.

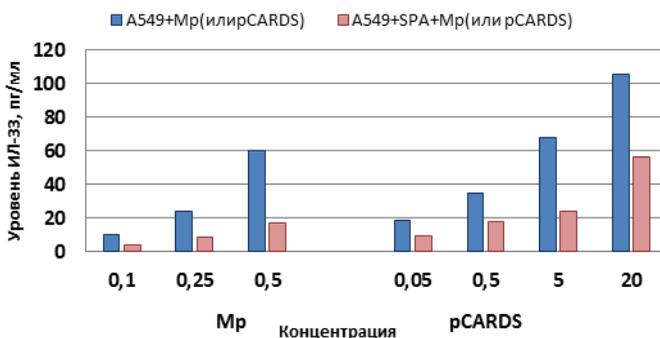


Рис. 3.2. ИЛ-33 в супернатантах А549 клеток через 48 часов после инфицирования *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 (Мр) и при действии рCARDS-токсина

Таким образом, провоспалительное действие *M. pneumoniae* и рCARDS-токсина, оцененное в разработанной модели, включающей SP-A, характеризуется экспрессией генов цитокинов RANTES, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 при активации А549 клеток рCARDS-токсином, значительно большей, чем выявлено с применением разработанной модели без SP-A, при этом *M. pneumoniae* стимулировала экспрессию гена RANTES, но не генов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6. Продукция ИЛ-33 во внеклеточную среду наблюдалась значительно меньше, чем в отсутствие белка А сурфактанта, как при инфицировании *M. pneumoniae*, так и при действии рCARDS-токсина.

### Выводы

1. Биологическая модель *in vitro*, основанная на проведении двух параллельных экспериментов: инфицирование А549 клеток суспензиями *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531, соответствующими стандартам МакФарланда 0,1 Ед; 0,25 Ед и 0,5 Ед в первом эксперименте и действие на клетки рCARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл во втором эксперименте, применена для изучения провоспалительного действия *M. pneumoniae* и рCARDS-токсина на клетки респираторного эпителия, которое оценивалось по экспрессии генов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, RANTES и продукции ИЛ-33.

2. Клетки респираторного эпителия реагируют на инфицирование *M. pneumoniae* и действие рCARDS-токсина экспрессией генов цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, RANTES и продукцией цитокина ИЛ-33, которые принимают участие в регуляции воспаления и иммунного ответа. Спектр экспрессии генов цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и RANTES в параллельных экспериментах с *M. pneumoniae* и рCARDS-токсином отличался, что может свидетельствовать о том, что для реализации патогенного

действия значимо не только присутствие жизнеспособного патогена, но и выделение в биотоп инфицирования основного фактора патогенности *M. pneumoniae* — rCARDS-токсина.

3. Действие rCARDS-токсина оказывало наиболее существенное активирующее влияние в отношении экспрессии генов провоспалительных цитокинов A549 клетками. Присутствие в среде культивирования rCARDS-токсина в концентрациях 5 и 20 мкг/мл сопровождалось увеличением экспрессии генов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, хемокина RANTES ( $p < 0,05$ ). *M. pneumoniae* в отсутствие rCARDS-токсина была не способна индуцировать экспрессию генов таких провоспалительных цитокинов, как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, при этом действие патогена сопровождалось повышенной экспрессией гена RANTES ( $p < 0,05$ ). A549 клетки продуцировали ИЛ-33 в ответ на инфицирование *M. pneumoniae* и воздействие rCARDS-токсина возбудителя.

4. Биологическая модель *in vitro* для изучения патогенного действия *M. pneumoniae*, в которой A549 клетки предварительно инкубировали с SP-A и затем параллельно проводили два эксперимента: инфицирование A549 клеток суспензиями *M. pneumoniae* штамм ATCC 15531 и внесение rCARDS-токсина, применена для изучения провоспалительного действия *M. pneumoniae* в условиях, приближенным к *in vivo*, т. е. физиологическим.

5. Сравнение результатов оценки провоспалительного действия *M. pneumoniae* и rCARDS-токсина в двух разработанных моделях *in vitro* указывает на существенную роль токсина в реализации патогенного действия *M. pneumoniae*. Действие rCARDS-токсина в условиях преинкубирования A549 клеток с SP-A сопровождалось повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов RANTES, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6, большим, чем при отсутствии белка А сурфактанта ( $p < 0,05$ ), при этом *M. pneumoniae* не стимулировала экспрессию клетками генов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6. С применение разработанных моделей *in vitro* показано, что *M. pneumoniae* и rCARDS-токсин индуцируют выход ИЛ-33 во внеклеточную среду, который в разработанной модели с внесением SP-A значимо ниже, чем при взаимодействии патогена и rCARDS-токсина с A549 клетками без участия белка А сурфактанта ( $p < 0,05$ ). Эффект SP-A в отношении ограничения продукции ИЛ-33 при микоплазменной инфекции может быть существенным в снижении риска формирования аллергического ответа при инфицировании *M. pneumoniae*.

## ГЛАВА 4

### ИЗУЧЕНИЕ ВАРИАбельНОСТИ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТ ОКСИДАЗЫ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ *Mycoplasma pneumoniae*

#### 4.1. ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГЕНЕ ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТ ОКСИДАЗЫ МИКРООРГАНИЗМА

Один из основных факторов патогенности *M. pneumoniae*, пероксид водорода, выделяется в ходе ферментативной реакции, катализируемой ГЗФ оксидазой [40]. Однако мало известно о структурных особенностях гена фермента у *M. pneumoniae*, выявляемой в биологическом материале пациентов с респираторной патологией.

ГЗФ оксидаза *M. pneumoniae* включает ФАД связывающий и субстрат связывающий домены (рис. 4.1), при этом ФАД связывающий домен принимает участие в переносе протона с образованием пероксида водорода [106].

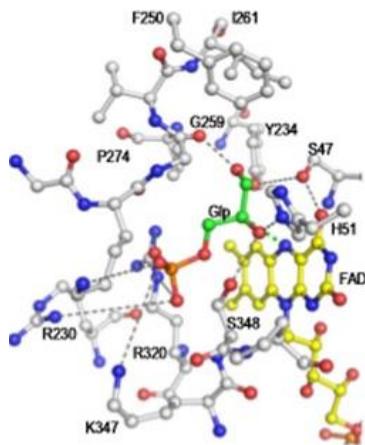


Рис. 4.1. Стереомодель ГЗФ оксидазы (С. К. Elkhali et al., 2015)

В данном исследовании изучались структурные особенности ФАД связывающего домена гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae* методом сиквенс-анализа, для этого были подобраны олигонуклеотидные праймеры и оптимизированы условия амплификации ДНК *M. pneumoniae*.

Праймеры подбирались на основе структуры гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae* штамм M129 (*MPN051*, номер в GeneBank NC\_000912.1, регион 63494...64648).

Конструирование праймеров проводили вручную с учетом всех требований к конструкции праймеров. Олигонуклеотидные последовательности проверяли на специфичность с использованием Basic Local Alignment Search Tool (программы, проводящей поиск гомологов белков или генов путем сравнения с изветной последовательностью, BLAST).

Полученные праймеры:

MPN051-f-5'-40-ATAGGCTGTGCCACTGCTTA-59-3' (прямой праймер)

MPN051-r-5'-700-ACTGACCTCGACGGGTTGT-682-3' (обратный праймер)

позволяют детектировать фрагмент длиной 660 п.о. гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae* [148, 150, 11-A, 2150].

Для оптимизации условий ПЦР в ходе исследования установлен оптимальный вариант проведения ПЦР с подобранными праймерами: подобраны температура отжига праймеров, время денатурации и концентрация ионов магния.

В качестве матрицы для оптимизации условий амплификации использовалась ДНК, выделенная из штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531.

Амплификация осуществлялась в объеме 50 мкл. Первичная оценка праймеров осуществлялась в следующих условиях:

5 мкл образца ДНК,

25 мкл ПЦР буфера (200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (dНТФ), 2,0 U AmpliTaq ДНК полимеразы, 10 мМ Трис-НСl, 50 мМ КСl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>),

4 пмоль каждого праймера (5 мкл, общий объем 5 × 2 = 10 мкл),

16 мкл бидистиллированной воды.

Программа амплификации:

Денатурация: +95 °С... 10 мин.

Циклирование (45 циклов): +95 °С... 15 сек.

+55 °С... 30 сек.

+72 °С... 15 сек.

Для каждого из образцов было характерно наличие на электрофореграмме полосы в 660 п.н.

Далее проводили оптимизацию концентрации ионов магния в ПЦР-смеси. Концентрация соли магния (Mg<sup>2+</sup>) в реакционной смеси может влиять на качество и количество образующегося ПЦР продукта. При проведении ПЦР рекомендуется использовать концентрацию ионов Mg в интервале от 2 до 6 мМ. В данном исследовании изучали влияние концентрации хлорида магния, начиная с 0,5 мМ, и постепенно повышали концентрацию до предельного значения 6 мМ. Наилучшей концентрацией хлорида магния считается та, при использовании которой

наблюдается наиболее четкая и яркая полоса на электрофореграмме. В соответствии с условиями амплификации оптимальной концентрацией  $Mg^{2+}$  стало значение 3,5 мМ.

На следующем этапе проводилась оптимизация температуры отжига праймеров (от 55 °С до 60 °С) и времени денатурации (от 10 до 15 минут). Результаты электрофоретического анализа показали, что оптимальным является использование температуры отжига, равной 60 °С, и денатурации в течение 15 минут.

Таким образом, был подобран оптимальный режим для амплификации фрагмента гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae*:

5 мкл образца ДНК,

25 мкл ПЦР буфера (200 мкМ каждого dНТФ, 2,0 U AmpliTaq ДНК полимеразы, 10 мМ Трис-НСl, 50 мМ КСl, 3,5 мМ  $MgCl_2$ ),

4 пмоль каждого праймера (5 мкл, общий объем  $5 \times 2 = 10$  мкл),

16 мкл бидистиллированной воды.

Программа амплификации:

Денатурация: +95 °С... 15 мин.

Циклирование: (45 циклов): +95 °С... 15 сек.

+60 °С... 30 сек.

+72 °С... 15 сек.

Перед проведением секвенирующей ПЦР осуществлялась очистка амплифицированных фрагментов ДНК с использованием набора QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия).

Секвенирующую ПЦР осуществляли в прямом и обратном направлениях с использованием в прямой реакции праймера MPN051-f и в обратной реакции праймера MPN051-r.

Общая реакционная смесь включала:

8,0 мкл BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems, США),

2 мкл образца ДНК,

4 мкл соответствующего праймера (3,2 пмоль),

6,0 мкл деионизированной воды.

Конечный объем смеси составил 20 мкл.

В качестве контроля проведения секвенирующей ПЦР осуществлялся сиквенса-анализ рGEM® двухцепочечной ДНК матрицы (Applied Biosystems, США). Амплификацию проводили по программе:

Денатурация: +96 °С... 1 мин.

Циклирование (25 циклов): +96 °С... 10 сек.

+50 °С... 5 сек.

+60 °С... 4 мин.

После проведения секвенирующей ПЦР проводили очистку амплифицированных фрагментов с использованием набора BigDye® X Terminator™ Purification kit (Applied Biosystems, США).

Полученные фрагменты разделялись методом капиллярного электрофореза в полиакриламидном геле на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США).

Данные о нуклеотидной последовательности образцов рассматривались с использованием нуклеотид-нуклеотид BLAST поисковой системы (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) для идентификации соответствия последовательности референсному гену. Нуклеотидная последовательность референсного гена была получена из GenBank базы данных и представлена *M. pneumoniae* штамм M129 ген MPN051 (NC\_000912.1, регион 63494...64648). Соответствие с референсным геном у штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531 составило 100 %.

Клинические изоляты *M. pneumoniae* получены при исследовании атипичной патогенной флоры пациентов основной группы и группы сравнения.

В основной группе ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* была выявлена у 72 (74 %) и 29 (30 %) пациентов соответственно, при этом специфические противомикоплазменные и противохламидийные антитела были обнаружены соответственно у 62 и 17 пациентов из числа пациентов с положительным результатом ПЦР-РВ.

Исходя из результатов ПЦР анализа, установлено, что в группе сравнения у 10 % пациентов с диагнозом бронхит (n = 10) и у 28 % пациентов с диагнозом пневмония (n = 48) выявлено хламидийно-микоплазменное инфицирование. ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* была выявлена в клиническом материале 35 (13 %) и 21 (8 %) пациента с респираторной патологией. Положительные результаты выявления ДНК *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *M. hominis* и *M. pneumoniae*, полученные с использованием ПЦР-РВ, были подтверждены ИФА в 63 %, 78 %, 54 % и 71 % соответственно.

В ходе исследования определено, что в возрасте до 2 лет у детей с респираторной патологией (n = 120) с наибольшей частотой были выявлены *C. trachomatis* и *M. hominis* (10 %). Причиной их обнаружения в биологическом материале респираторного тракта детей первых лет жизни является высокий риск перинатального заражения при естественном родоразрешении от матерей, инфицированных данными возбудителями [131]. У детей в возрасте до 2 лет частота инфицирования *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* составила 4 %.

В группе детей старше 2 лет с бронхитами и пневмониями (n = 152) только в 2 случаях была выявлена ДНК *M. hominis* в биологическом мате-

риале из респираторного тракта, ДНК *S. trachomatis* не была обнаружена. Частота выявления ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* у детей группы сравнения старше 5 лет составила 29 % и 15 % соответственно [149].

Из биологического материала пациентов основной группы и группы сравнения выделено 54 изолята *M. pneumoniae*.

Проведен генетический анализ структуры фрагмента гена ГЗФ оксидазы, соответствующего ФАД связывающему домену 54 клинических изолятов *M. pneumoniae* и референсного штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531. Впервые выявлены синонимичные и несинонимичные нуклеотидные замены (табл. 4.1, рис. 4.2).

Таблица 4.1

Генетический анализ последовательности гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae*

Количество изолятов Мр	Позиция в гене MPN051, (NC_000912.1, регион 63494...64648)						Изменение в полипеп- тидной цепи	Продукция пероксида водорода, Ме, мг/л
	99	152	163	181	391	432		
1	–	A→T	–	–	T→C	–	His51Leu	5
1	A→G	–	–	–	–	A→G	–	10
2	–	A→T	–	–	–	–	His51Leu	5
3	–	–	G→C	–	–	–	Asp55His	25
1	A→G	–	–	–	–	–	–	10
1	–	–	–	T→G	–	–	Leu61Val	10
1	A→G	–	G→C	–	–	–	Asp55His	25
44	–	–	–	–	–	–	–	10
Мр ATCC 15531	–	–	–	–	–	–	–	10

Примечание: Мр — *M. pneumoniae*.

U.S. National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » Global Alignment » results for RID-356M5W0G11N

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) ▼

Job Title **NC\_000912.1:c64648-63494 Mycoplasma pneumoniae...**

RID [356M5W0G11N](#) Search expires on 01-31 15:57 pm [Download All](#) ▼

Program Needleman-Wunsch alignment of two sequences [Citation](#) ▼

Query ID lcl|Query\_49027 (dna)

Query Descr NC\_000912.1:c64648-63494 Mycoplasma pneumoniae M129 | ...

Query Length 661

Subject ID lcl|Query\_49029 (dna)

Subject Descr None

Subject Length 661

```

Query 40 ATAGGCTGTGCCACTGCT
          |||
Sbjct 1  ATAGGCTGTGCCACTGCT

Query 100 AAGCACCATTATTTGGCA
          |||
Sbjct 61 AAGCACCATTATTTGGCA

Query 160 ATTGATCCCAATCCACAC
          |||
Sbjct 121 ATTGATCCCAATCCACAC

Query 220 TTAATAACCTACTTTAAA
          |||
Sbjct 181 TTAATAACCTACTTTAAA

Query 280 GCTTTCAATGAAATGGAG
          |||
Sbjct 241 GCTTTCAATGAAATGGAG
  
```

Рис. 4.2. Обнаружение нуклеотидной замены G163C во фрагменте гена ГЗФ оксидазы, соответствующего ФАД связывающему домену, изолята *M. pneumoniae*

Полученные данные соответствовали результатам прямого секвенирования ДНК патогена при выделении непосредственно из биологического материала, минуя стадию культивирования *in vitro*, что позволяет исключить влияние процесса культивирования на вероятность образования выявленных нуклеотидных замен в гене ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae*.

#### 4.2. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПАТОГЕНА IN VITRO

Метаболизм глицерола *M. pneumoniae* приводит к продукции пероксида водорода — одного из основных факторов патогенности микроорганизма, оказывающего цитотоксический эффект в отношении клеток респираторного эпителия. Пероксид водорода является основным фактором патогенности *M. pneumoniae*, который обуславливает цитотоксичность патогена *in vitro* [132].

Начальной гипотезой при исследовании цитотоксичности возбудителя *in vitro* стало предположение о том, что полученные результаты определения уровня продукции пероксида водорода референсным штаммом *M. pneumoniae* ATCC 15531 и 54 клиническими изолятами не будут отличаться от представленных в литературе: 9,5–10 мг/л для стандартного штамма *M. pneumoniae* M129 [41, 132].

В ходе исследования гипотеза была подтверждена в отношении референсного штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531, уровень продукции пероксида водорода для которого составил 10 мг/л. В свою очередь клинические изоляты *M. pneumoniae* продуцировали пероксид водорода в диапазоне концентраций от 5 до 25 мг/л (табл. 5.1).

Для оценки показателя цитотоксичности *M. pneumoniae* проводили инфицирование A549 клеток суспензиями культур возбудителя, соответствующими стандарту МакФарланда 2 Ед.

При оценке цитотоксичности *M. pneumoniae* ATCC 15531 ( $n = 10$ , референсный штамм исследован в 10 образцах) и 54 изолятов возбудителя ( $n = 162$ , каждый изолят исследован в 3 образцах) диапазон значений показателя цитотоксичности (мин...макс) % составил: через 24 часа для референсного штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531 — (30...39) %, для 54 клинических изолятов — (16...57) %.

Для сравнения параметра рассеяния выборок применен критерий Фишера [133], значение  $p = 0,005$ .

Таким образом различие между выборками по параметру рассеяния статистически значимо, что может иметь место, если выборки получены из различных генеральных совокупностей.

При исследовании структуры фрагмента гена ГЗФ оксидазы, соответствующего ФАД связывающему домену, среди изолятов *M. pneumoniae* с наибольшей частотой были обнаружены нуклеотидные замены А152Т и G163С (табл. 5.1), то есть выборка в 54 изолята является неоднородной по критерию наличия данных нуклеотидных замен.

Изоляты *M.pneumoniae* (n = 54) включают изоляты от пациентов группы сравнения (*группа изолятов 1*, n = 19) и изоляты от пациентов основной группы (*группа изолятов 2*, n = 35), при этом:

– изоляты, несущие нуклеотидную замену А152Т (3 из 54, частота 0,06), выявлены как в *группе изолятов 1* (1 из 19, частота 0,05), так и в *группе изолятов 2* (2 из 35, частота 0,06);

– изоляты, несущие нуклеотидную замену G163С (4 из 54, частота 0,07), выявлены как в *группе изолятов 1* (1 из 19, частота 0,05), так и в *группе изолятов 2* (3 из 35, частота 0,09).

Таким образом, изоляты *M. pneumoniae*, несущие нуклеотидные замены А152Т и G163С, выявлены в двух независимых выборках пациентов, на основании чего мы предполагаем о неслучайности их обнаружения.

Суммируя результаты оценки уровня продукции пероксида водорода, показателя цитотоксичности и структуры фрагмента гена ГЗФ оксидазы, считаем возможным применить кластерный анализ для разделения выборки 54 изолятов *M. pneumoniae* для дальнейшего исследования статистическими методами.

Входными данными для проведения кластерного анализа методом k-средних стали (рис. 4.3):

– переменная 1: уровень продукции пероксида водорода (стандартизирован по максимальному значению);

	1 H2O2	2 63C/A152	3 ПЦП24
1	1	1	0,842105
2	1	1	0,912281
3	1	1	0,947368
4	1	1	1
5	0,2	-1	0,315789
6	0,2	-1	0,368421
7	0,2	-1	0,45614
8	0,4	0	0,596491
9	0,4	0	0,614035
10	0,4	0	0,77193
11	0,4	0	0,824561
12	0,4	0	0,596491
13	0,4	0	0,614035
14	0,4	0	0,77193
15	0,4	0	0,824561

Рис. 4.3. Фрагмент таблицы со стандартизированными переменными

– переменная 2: наличие/отсутствие нуклеотидных замен G163C и A152T во фрагменте гена ГЗФ оксидазы, соответствующем ФАД связывающему домену (индекс –1 соответствовал вариантам с наличием нуклеотидной замены G163C; индекс 1 соответствовал вариантам с наличием нуклеотидной замены A152T; индекс 0 соответствовал вариантам с отсутствием нуклеотидных замен);

– переменная 3: показатель цитотоксичности через 24 часа (стандартизирован по максимальному значению),

Количество задаваемых кластеров: 3.

С применением кластеризации методом k-средних 54 изолята *M. pneumoniae* разделены на 3 группы (кластера) (рис. 4.4, 4.5).

Members of Cluster Number 3 (Spreadsheet1.sta) and Distances from Respective Cluster Center Cluster contains 3 cases			
Case No.	Case No.	Case No.	
C 5	C 6	C 7	
Distance	0,0371391	0,006753	0,043892

Группа 1

Members of Cluster Number 1 (Spreadsheet1.sta) and Distances from Respective Cluster Center Cluster contains 4 cases			
Case No.	Case No.	Case No.	Case No.
C 1	C 2	C 3	C 4
Distance	0,045580	0,005064	0,005064
			0,045580

Группа 2

Members of Cluster Number 2 (Spreadsheet1.sta) and Distances from Respective Cluster Center Cluster contains 47 cases						
Case No.	Case No.	Case No.	Case No.	Case No.	Case No.	Ca
C 8	C 9	C 10	C 11	C 12	C 13	Ca
Distance	0,085342	0,075213	0,015948	0,046335	0,085342	0,

Группа 3

Рис. 4.4. Распределение 54 изолятов *M. pneumoniae* по 3 кластерам

Группа 1 (n = 3): изоляты *M. pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода с уровнем 10 мг/л, характеризующиеся показателем цитотоксичности (мин...макс) % через 24 часа — (16; 26) %, несущие нуклеотидную замену A152T.

Группа 2 (n = 4): изоляты *M. pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода с уровнем 25 мг/л, характеризующиеся показателем цитотоксичности (мин...макс) % через 24 часа — (46; 57) %, несущие нуклеотидную замену G163C.

Группа 3 (n = 47): изоляты *M. pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода с уровнем 10 мг/л, характеризующиеся показателем цитотоксичности (мин...макс) % через 24 часа — (32; 50) %, отсутствие нуклеотидных замен A152T или G163C.

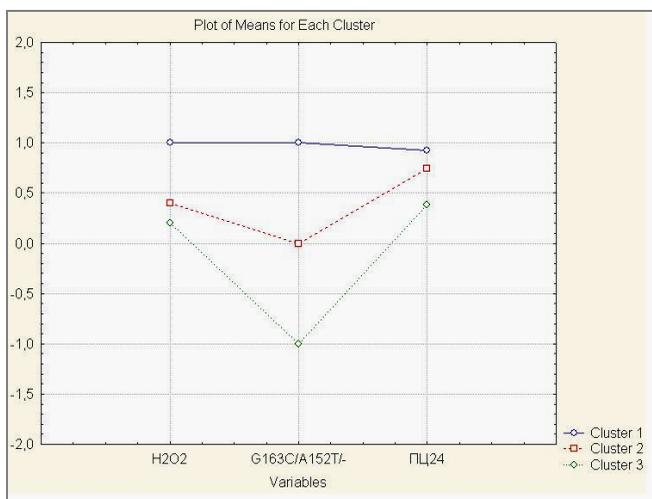


Рис. 4.5. График средних для переменных в каждом кластере

Значимость различий между полученными кластерами определялась в ходе дисперсионного анализа, получены значения  $p < 0,05$ , что свидетельствовало о достоверном различии (рис. 4.6).

Variable	Analysis of Variance (Spreadsheet1.sta)					
	Between SS	df	Within SS	df	F	signif. p
H2O2	1,500000	2	0,000000	51		
G163C/A152T-	6,981482	2	0,000000	51		
ПЦ24	0,520106	2	0,444800	51	29,81723	0,000000

Рис. 4.6. Результаты дисперсионного анализа

Группа 1 и группа 2 относятся с точки зрения применения статистических методов к малым группам, поэтому при описании переменной «показатель цитотоксичности» в качестве параметров положения

применяли медиану, минимальное и максимальное; при сравнении параметров положений выборок (медиан) изолятов *M. pneumoniae* групп 1–3 между собой и с референсным штаммом возбудителя применяли непараметрический метод — критерий Манна–Уитни.

Поскольку пероксид водорода определяли полуколичественным методом, то переменную «уровень пероксида водорода» рассматривали как качественную, возможные значения которой составляют: 10 мг/л — уровень продукции пероксида водорода, соответствующий референсному штамму *M. pneumoniae* ATCC 15531, 5 мг/л — низкий уровень продукции пероксида водорода и 25 мг/л — высокий уровень

продукции пероксида водорода. При сравнении уровня продукции пероксида водорода применяли точный критерий Фишера (анализ таблиц сопряженности).

Согласно полученным результатам (табл. 5.1) для изолятов *M. pneumoniae* с синонимичными нуклеотидными заменами A99G, T391C и A432G и несинонимичной нуклеотидной заменой T181G уровень продукции пероксида водорода составил 10 мг/л и соответствовал значению данного показателя для изолятов микроорганизма, у которых не были выявлены нуклеотидные замены в исследуемом фрагменте гена ГЗФ оксидазы, также как и для референсного штамма патогена.

В свою очередь генетические варианты возбудителя, несущие две несинонимичные замены: A152T (His51Leu) и G163C (Asp55His), выявленные в гене ГЗФ оксидазы, характеризовались низким (5 мг/л) и высоким (25 мг/л) уровнями продукции пероксида водорода соответственно в сравнении с референсным штаммом возбудителя (точный критерий Фишера,  $p < 0,05$ ).

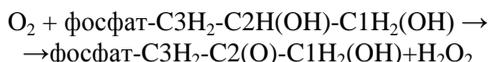
*Первую таблицу сопряженности* (А) строили из переменных отсутствие/наличие нуклеотидной замены A152T (переменная столбцов) и референсный (10 мг/л) /низкий (5 мг/л) уровень продукции пероксида водорода (переменная рядов); *вторую таблицу сопряженности* (Б) строили из переменных отсутствие/наличие нуклеотидной замены G163C (переменная столбцов) и референсный (10 мг/л) /высокий (25 мг/л) уровень продукции пероксида водорода (переменная рядов). В таблицы сопряженности включены данные для 54 изолятов и референсного штамма *M. pneumoniae* ATCC 15531 (рис. 4.7).

Аминокислотные замены His51Leu и Asp55His могут быть значимыми для реализации патогенного действия изолятов *M. pneumoniae*, связанного с продукцией пероксида водорода.

	2 x 2 Table (Spreadsheet1.sta)				2 x 2 Table (Spreadsheet1.sta)		
	Column 1	Column 2	Row Totals		Column 1	Column 2	Row Totals
Frequencies, row 1	52	0	52	Frequencies, row 1	51	0	51
Percent of total	94,545%	0,000%	94,545%	Percent of total	92,727%	0,000%	92,727%
Frequencies, row 2	0	3	3	Frequencies, row 2	0	4	4
Percent of total	0,000%	5,455%	5,455%	Percent of total	0,000%	7,273%	7,273%
Column totals	52	3	55	Column totals	51	4	55
Percent of total	94,545%	5,455%		Percent of total	92,727%	7,273%	
Chi-square (df=1)	55,00	p= ,0000		Chi-square (df=1)	55,00	p= ,0000	
V-square (df=1)	54,00	p= ,0000		V-square (df=1)	54,00	p= ,0000	
Yates corrected Chi-square	37,32	p= ,0000		Yates corrected Chi-square	41,17	p= ,0000	
Phi-square	1,00000			Phi-square	1,00000		
Fisher exact p, one-tailed		p= ,0000		Fisher exact p, one-tailed		p= ,0000	
two-tailed		p= ,0000		two-tailed		p= ,0000	
McNemar Chi-square (A/D)	41,89	p= ,0000		McNemar Chi-square (A/D)	38,47	p= ,0000	
Chi-square (B/C)	----	----		Chi-square (B/C)	----	----	

Рис. 4.7. Таблицы сопряженности и их статистический анализ

Пероксид водорода образуется в результате реакции, катализируемой ГЗФ оксидазой:



His в позиции 51 полипептидной цепи ГЗФ оксидазы является существенным для образования пероксида водорода: атом протона от С2 атома субстрата (глицерол-3-фосфата) переносится на атом азота имидазольного кольца гистидина, далее на N5 атом ФАД и затем на конечный акцептор — молекулярный кислород, в результате чего образуется пероксид водорода [106].

Замена His51Leu может замедлить или даже прервать реакцию образования пероксида водорода, поскольку Leu не содержит атома азота, способного принять протон. Клинические изоляты *M. pneumoniae* с нуклеотидной заменой A152T, приводящей к замене His51Leu, характеризовались снижением патогенных свойств, что выражалось в снижении продукции пероксида водорода: 5 мг/л в сравнении с результатами определения продукции пероксида водорода изолятами *M. pneumoniae* без нуклеотидных замен (10 мг/л).

Высокий уровень продукции пероксида водорода (25 мг/л), выявленный у 4 изолятов *M. pneumoniae* с заменой G163C (Asp55His), может быть обусловлен тем, что появившийся в результате замены His55 вблизи His51 принимает на себя функцию дополнительного переносчика протона для образования молекулы пероксида водорода. Повышенная продукция пероксида водорода изолятами *M. pneumoniae* с заменой G163C (Asp55His) может рассматриваться как усиление патогенных свойств микроорганизма в результате появления нуклеотидной замены [148, 150].

Для микоплазменной инфекции характерен различный характер течения инфекционного процесса от легких форм до тяжелых патологий [13, 15]. Гетерогенность гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae* может стать причиной различного уровня продукции пероксида водорода и как следствие, будут формироваться клинические варианты течения микоплазменной инфекции.

Клинические изоляты *M. pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода наравне с референсным штаммом *M. pneumoniae* (10 мг/л), проявляли цитотоксичность, не имеющую достоверных отличий с цитотоксичностью референсного штамма возбудителя ( $p < 0,05$ ) (табл. 4.2).

Таблица 4.2

**Значения показателя цитотоксичности (%) для изолятов *M. pneumoniae* с определенным уровнем продукции пероксида водорода по отношению к культурам клеток А549, Ме (мин...макс)**

Время инкубации	Показатель цитотоксичности (%)			
	Группа 1: изоляты Мр, продуцирующие пероксид водорода 5 мг/л (n = 3)	Группа 2: изоляты Мр, продуцирующие пероксид водорода 25 мг/л (n = 4)	Группа 3: изоляты Мр, продуцирующие пероксид водорода 10 мг/л (n = 47)	Референсный штамм Мр, продуцирующий пероксид водорода 10 мг/л
24 часа	20 (16...26)*#	51 (46...57)*#	39 (32...50)	35 (30...39)

Примечание: Мр — *M. pneumoniae*; \* различия значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$  в сравнении с референсным штаммом возбудителя; # — различия между группами 1 и 2 значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна–Уитни).

Изоляты *M. pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода в концентрации 5 мг/л, характеризовались значимо сниженной цитотоксичностью (см. табл. 4.2) в сравнении с изолятами, продуцирующими пероксида водорода в концентрации 10 мг/л, что выражалось в присутствии большего количества жизнеспособных клеток во временном периоде 24 часа. Все изоляты *M. pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода в концентрации 5 мг/л, являлись носителями нуклеотидной замены А152Т, в результате которой значимый для активности фермента ГЗФ оксидазы His51 заменялся на Leu. Изоляты *M. pneumoniae* с данной нуклеотидной заменой продуцировали меньше пероксида водорода, чем изоляты *M. pneumoniae*, в гене ГЗФ оксидазы которых отсутствовала нуклеотидная замена А152Т, и проявляли сниженную цитотоксичность по отношению к клеткам респираторного эпителия. Изоляты *M. pneumoniae*, продуцирующие пероксид водорода в концентрации 25 мг/л и несущие замену G163C (Asp55His), проявляли самую высокую цитотоксичность: показатель цитотоксичности увеличивался на 31 % в сравнении с изолятами возбудителя, продуцирующими пероксид водорода наравне с референсным штаммом *M. pneumoniae* ATCC 15531 (10 мг/л) [148, 150].

## **Выводы**

1. Цитотоксические свойства *M. pneumoniae in vitro* обусловлены продукцией пероксида водорода, который выделяется в ходе реакции, катализируемой ГЗФ оксидазой *M. pneumoniae*, и оказывает разрушающее действие на клетки респираторного эпителия.

2. С применением оптимизированной методики секвенирующей ПЦР для изучения структурных особенностей фрагмента гена ГЗФ оксидазы *M. pneumoniae*, соответствующего ФАД связывающему домену, выявлены генетические варианты возбудителя, несущие нуклеотидные замены и характеризующиеся различным уровнем продукции пероксида водорода и показателем цитотоксичности.

3. Изоляты *M. pneumoniae*, несущие замену A152T, продуцировали пероксид водорода в концентрации 5 мг/л, что было значимо ниже уровня продукции референсным штаммом возбудителя (10 мг/л) и проявляли достоверно низкую цитотоксичность по отношению к A549 клеткам в сравнении с референсным штаммом *M. pneumoniae* (критерии Манна–Уитни и точный критерий Фишера,  $p < 0,05$ ). Тогда как изоляты *M. pneumoniae*, несущие замену G163C, характеризовались усиленными патогенными свойствами, что проявлялось в повышенной продукции пероксида водорода (25 мг/л) и более выраженной цитотоксичности по отношению к клеткам в сравнении с референсным штаммом патогена (критерии Манна–Уитни и точный критерий Фишера,  $p < 0,05$ ).

## **ГЛАВА 5 ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ *Mycoplasma pneumoniae* В МОКРОТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

### **5.1. РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ПРИМЕНЕНИЯ БРОМИСТОГО ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ МОКРОТЫ**

Существенное влияние на диагностическую чувствительность ПЦР оказывает этап пробоподготовки, который включает выделение ДНК из образца биологического материала и устранение ингибиторов ПЦР. Достичь этого можно несколькими способами.

Первый способ включает лизис клеток (разрушение физическим или механическим воздействием), ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизацию клеточного лизата с помощью фенола и хлороформа, центрифугирование для удаления денатуриро-

ванных белков и фрагментов клеточных органелл. Затем ДНК осаждают из раствора этанолом и после центрифугирования растворяют осадок в буферном растворе [77 с.36].

Другим способом является сорбция ДНК из клеточного лизата на гранулах силикагеля в присутствии хаотропных веществ, центрифугирование и последующая элюция ДНК с гранул в раствор (сорбционная экстракция). Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент SDS или хаотропный агент гуанидинизотиоцианат. Некоторые производители продают наборы реактивов для выделения ДНК с использованием магнитных частиц, покрытых силикой SiO<sub>2</sub> [77 с.40].

Отдельные коммерческие наборы предусматривают адсорбцию примесей, ингибирующих ПЦР, с помощью ионообменных смол (например, Chelex) [77 с.42].

Исследования, в которых сравниваются различные методы экстракции ДНК *M. pneumoniae*, немногочисленные. В одном из них сравнивали 2 способа экстракции ДНК *M. pneumoniae*: лизис клеток с использованием протеиназы К без последующей очистки НК и ДНК экстракция после лизиса фенол-хлороформом с последующим осаждением этанолом. Применение фенол-хлороформной экстракции требовало на один час больше времени и приводило к десятикратному снижению чувствительности [92].

Проводилась оценка присутствия ингибиторов ПЦР, основными из которых для биологического материала из респираторного тракта являются гемоглобин, полисахариды, в 75 образцах БАЛ при обработке 3 методами. Ингибиторы ПЦР присутствовали в 31 % образцов при экстракции на основе температурного лизиса, в 12 % образцов при использовании протеиназы К.

Наиболее эффективно ингибиторы удалялись при использовании метода выделения с использованием ЦТАБ. Этот метод удобен для удаления полисахаридов, которых много в мокроте и которые отрицательно влияют на чистоту ДНК и, следовательно, на ее качество [93].

В 1980 г. Мюррай и Томпсон впервые предложили использовать для разделения ДНК и полисахаридов ЦТАБ — катионный детергент, который очищает препараты от примесей полисахаридов и эффективно связывает ДНК [94]. ЦТАБ широко применяется в молекулярной генетике растений. Геномная ДНК обычно экстрагируется с использованием ЦТАБ-буфера для экстракции, очищается смесью фенола и хлороформа и преципитируется изопропанолом или этанолом [95–97].

В зависимости от концентрации соли в ЦТАБ-буфере комплексы ЦТАБ-полисахариды и ЦТАБ-ДНК имеют разную растворимость, поэтому они могут быть разделены в процессе выделения. ЦТАБ взаимо-

действует как с полисахаридами, так и с НК. Это обусловлено действием электростатических сил, возникающих благодаря тому, что ЦТАБ как катионный детергент несет положительный заряд, а сиало- и сульфомуцины мокроты, а также НК заряжены отрицательно [81].

Метод экстракции НК на основе применения ЦТАБ стал использоваться и для выделения ДНК из секретов респираторного тракта, а также культур микроорганизмов, патогенетически значимых в развитии респираторной патологии, таких как *M. tuberculosis* [98, 99], однако отсутствуют данные об использовании ЦТАБ для выявления ДНК *M. pneumoniae* в мокроте.

В данном исследовании использовали 3 варианта экстракции ДНК.

Вариант экстракции 1 — обработка протеиназой К и фенол-хлороформная экстракция. 400 мкл раствора лизоцима (10 г/л, Sigma, США) добавляли к суспензии клеточных элементов мокроты и инкубировали 1 час при 37°C. Далее к смеси добавляли 20 мкл ЭДТА (50 мМ) и 400 мкл раствора протеиназы К (10 г/л, Sigma, США), инкубировали при 60 °С в течение 1 часа. Раствор оставляли на ночь при -20 °С. После лизиса клеток и инактивации нуклеаз ДНК отделяли от клеточных экстрактов с помощью комбинации растворителей фенола и хлороформа. Для этого размороженную смесь разделяли на 2 части, к каждой из которых добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали 15 минут при 10000 g. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. ДНК находится в верхней (водной) фазе, а денатурированные белки — в нижней (органической) фазе. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, не затрагивая нижнюю фазу и интерфазу, добавляли 0,6 объема изопропанола и 1/10 объема ацетата натрия, тщательно перемешивали, выдерживали 30 минут при -20°C. ДНК осаждали центрифугированием 15 мин при 10 000 g. Осадок дважды промывали 500 мкл 70 % этилового спирта, сушили до полного испарения спирта и растворяли в 30 мкл ТЕ. (Для приготовления 100 мл ТЕ к 1 мл 1М трис(оксиметил)аминометана (Трис) добавляли 200 мкл 0,5М ЭДТА и доводили объем раствора до 100 мл дистиллированной водой) [146].

Вариант экстракции 2 — сорбционная экстракция на магнитных частицах. В соответствии с инструкцией к набору «РеалБест ДНК-экстракция 100» фирмы-изготовителя АО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Российская Федерация) в пробирки емкостью 1,5 мл с суспензией клеточных элементов мокроты вносили по 300 мкл лизирующего раствора с сорбентом и тщательно перемешивали на вортексе. Прогревали пробирки 10 мин при 65°C. НК хорошо сорбируется на поверхности силики в присутствии хаотропных солей, таких как гуанидингидрохлорид, гуа-

нидинтиоцианат. Ингибиторы и другие компоненты клинического материала остаются в растворе. В каждую пробирку с анализируемыми образцами вносили по 400 мкл осадителя ДНК, выдерживали при температуре (18–25) °С 3–5 минут, сорбент осаждали центрифугированием при 12 000 g 5 минут. Удаляли супернатант с ингибиторами ПЦР и к осадку добавляли 500 мкл раствора для отмывки № 1, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 2 мин и отбирали супернатант. К осадку добавляли 300 мкл раствора для отмывки № 2, перемешивали на вортексе, осаждали центрифугированием при 12 000 g в течение 2 мин и отбирали супернатант. Осадок высушивали при температуре (18–25) °С 1–2 минуты. Добавляли 600 мкл элюирующего раствора, тщательно ресуспендировали и помещали в термостат при 65 °С на 5 мин. Суспензию осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 1 мин. Супернатант содержал очищенную ДНК [146].

Вариант экстракции 3 — ЦТАБ метод. Суспензию клеточных элементов мокроты инкубировали при 65 °С в течение 10 минут со 100 мкл ЦТАБ/NaCl буфера, состоящего из ЦТАБ, 100 г/л и NaCl, 41 г/л (Sigma, США). После инкубирования экстракты очищались равным объемом смеси 92 % хлороформ/8 % изоамиловый спирт в соотношении 24 : 1 общим объемом 700 мкл, центрифугировали 5 минут при максимальной скорости 14243 g. Водную фазу, не задевая среднюю и нижнюю фазу, переносили в новую пробирку, ДНК осаждалась холодным изопропанолом (0,6 объема водной фазы), выдерживали 30 минут при –20 °С для образования агрегатов ДНК, центрифугировали 15 минут при максимальной скорости 14243 g.

Осадок НК дважды промывался холодным (–20 °С) 70 % этиловым спиртом по 5 мин, высушивался и растворялся в 30 мкл ТЕ буфера [146].

Выделение ДНК из биологического материала пациентов (соскоб, трахеальный аспират), культуральной жидкости при идентификации культур клинических изолятов *M. pneumoniae* проводили в соответствии с вариантом экстракции 2.

Осадок клеточных элементов мокроты использовали для выделения ДНК в соответствии с процедурой вариантов экстракции 1, 2 и усовершенствованного в ходе исследования варианта экстракции 3. Контроль качества и количества очищенной ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

При проведении исследования были разработаны условия применения ЦТАБ для выделения ДНК из мокроты, позволяющие получить нуклеиновую кислоту с чистотой, соответствующей критериям эффективного удаления полисахаридов и белков.

Образцы мокроты были получены от 38 детей с бронхитами и пневмониями возможной атипичной этиологии.

Осадок клеточных элементов мокроты использовали для выделения ДНК в соответствии с процедурой каждого из трех примененных вариантов экстракции: № 1 — обработка протеиназой К и фенол-хлороформная экстракция, № 2 — сорбционная экстракция на магнитных частицах и усовершенствованным в ходе исследования вариантом экстракции № 3 — ЦТАБ-методом.

Для *M. pneumoniae* свойственно образовывать биопленку, которая представляет собой неподвижные сообщества микроорганизмов, заключенные в оболочку из полисахаридов, белков и липидов, защищающих микроорганизмы от прямого взаимодействия с окружающей средой, включая факторы иммунной защиты организма хозяина, антибиотики [134]. Поэтому процедура экстракции НК из мокроты для обнаружения ДНК *M. pneumoniae* должна быть достаточно жесткой, чтобы обеспечить разрушение клеточных наружных оболочек и внутриклеточных компартментов, и при этом достаточно деликатной, чтобы оставить в неприкосновенности целевые нуклеиновые кислоты.

ЦТАБ относится к так называемым «мягким» детергентам, которые не оказывают глубокого дестабилизирующего действия на липидно-белковые комплексы мембран, белки могут оставаться интактными, функциональными [135].

Для улучшения доступа ЦТАБ к ДНК и повышения эффективности депротеинизации ЦТАБ использовался в комбинации с протеиназой К и детергентом SDS, что позволило получить наибольший выход ДНК из мокроты (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Показатели количества и качества ДНК, выделенной из мокроты ЦТАБ методом, Мг (мин...макс)

Компоненты, дестабилизирующие белково-липидные комплексы и разрушающие белки	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280	A260/235
ЦТАБ	24,6 (12,5...46,6)	1,71 (1,66...1,76)	1,67 (1,60...1,78)
протеиназа К + ЦТАБ	35,3 (17,9...55,3)	1,74 (1,72...1,82)	1,75 (1,68...1,80)
протеиназа К + SDS + ЦТАБ	58,4 (33,4...67,2)*	1,86 (1,81...1,91)*	2,22 (2,16...2,28)*

Примечание: \* различия значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Таким образом, в усовершенствованном ЦТАБ методе (вариант экстракции 3) осадок клеточных элементов мокроты ресуспендировали

в 565 мкл ТЕ буфера и инкубировали 1 час при 37 °С с 30 мкл 10 % SDS (Sigma, США) и 5 мкл протеиназы К (10 г/л) [146].

Детергент SDS в буферном растворе дезорганизует липидные образования мембран, разрушает нековалентные связи и солюбилизируют (переводят в растворимое состояние) белки, тем самым разрушаются липидно-белковые комплексы мембран, в том числе ядерных, при этом ДНК экстрагируется в буфер, т.е. переходит в растворимое состояние. Применение SDS способствует тому, что комплексы ДНК с белком становятся доступными для протеолитического фермента протеиназы К [95, 135].

После действия протеиназы К в раствор добавляли ЦТАБ-буфер. Если протеиназа К приводит к деградации протеинов и полипептидов, но не элиминирует ингибирующие амплификацию полисахариды, то дополнительное введение ЦТАБ приводит к преципитации протеинов и полисахаридов при высокой концентрации соли в буфере, ДНК может быть выделена из водной фазы.

Для оценки чистоты ДНК, выделенной из мокроты, проводили измерение оптической плотности растворов ДНК в ТЕ буфере при длинах волн 260, 280 и 235 нм, соответствующих максимумам поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов соответственно. Значение  $A_{260}/280$  для чистой ДНК составляет 1,8–1,9, значение  $A_{260}/235$  — 2,2–2,3 [97].

Данным критериям согласно табл. 6.1 соответствовали ДНК, полученные из мокроты в условиях применения ЦТАБ в комбинации с протеиназой К и детергентом SDS.

## 5.2. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ МОКРОТЫ

Усовершенствованный ЦТАБ метод выделения ДНК из мокроты сравнивали с методом сорбционной экстракции (вариант экстракции 2), который широко используется в лабораторной практике, и методом экстракции смесью фенол-хлороформ (вариант экстракции 1), применяемым в качестве референс-метода при оптимизации выделения ДНК.

Значения концентрации ДНК, экстрагированной из мокроты, в соответствии с вариантами 1, 2 и 3, составили от 5,6 до 73,9 нг/мкл. Результаты выделения геномной ДНК из 10 выборочных образцов мокроты представлены на рисунке 5.1. За количество ДНК принимались средние значения результатов трех параллельных выделений НК каждым вариантом экстракции.

Наибольший выход ДНК демонстрировали вариант на основе протеиназы К и фенол-хлороформной экстракции и усовершенствованный ЦТАБ метод. Присутствие РНК в продуктах экстракции не оказывает существенного влияния на значения концентраций продуктов экстракции,

поскольку мокрота содержит большое количество собственных РНКаз, что приводит к низкому содержанию РНК в данном биологическом материале, РНК разрушается также в ходе процессов экстракции [136].

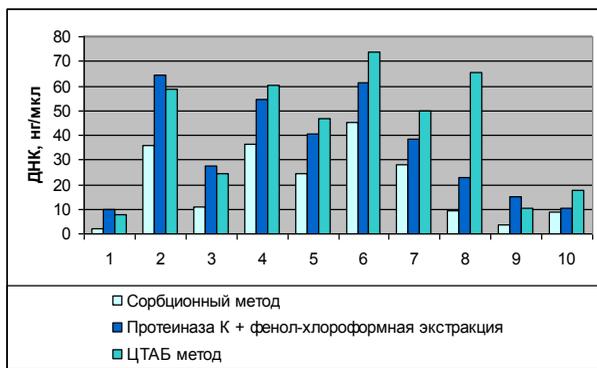


Рис. 5.1. Концентрация ДНК, выделенной из образцов мокроты различными методами

Количественный анализ ДНК, выделенной из мокроты тремя изучаемыми методами, показал, что выход ДНК при использовании метода на основе ЦТАБ наибольший в 98 % экстракций в сравнении с вариантом 1 и в 68 % экстракций в сравнении с вариантом 2. В случае сорбционной экстракции (вариант 2) примеси полисахаридов в образцах зачастую прочно скрепляли собранные вместе магнитным полем сорбирующие частицы в труднодиспергируемый осадок, поэтому при выделении НК из мокроты по варианту 2 выход ДНК был наименьшим.

Полученные соотношения оптической плотности для выделенных из мокроты образцов ДНК приведены в табл. 5.2.

Таблица 5.2

**Отношения абсорбций образцов ДНК, полученных при экстракции из мокроты различными методами, Me (мин...макс)**

Вариант выделения нуклеиновых кислот	A260/280	A260/235
Протеиназа К и фенол-хлороформная экстракция (вариант 1)	1,78 (1,72...1,83)	1,85 (1,78...1,92)
Сорбционная экстракция на магнитных частицах (вариант 2)	1,72 (1,66...1,78)	1,62 (1,68...1,80)
Усовершенствованный ЦТАБ метод	1,86 (1,81...1,91)*	2,22 (2,16...2,28)*

Примечание: \* различия значимы с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Значения A260/280 для усовершенствованного ЦТАБ метода и метода варианта 1 находились в пределах интервала 1,8–1,9, поэтому препараты ДНК, выделенные данными методами, рассматривались как свободные от примесей белка. При сопоставлении усовершенствованного ЦТАБ метода с методом сорбционной экстракции (вариант экстракции 2) показано, что отличие средних A260/280 для ЦТАБ метода и метода сорбционной экстракции статистически значимо (критерий Вилкоксона,  $p = 0,03$ ), при этом показатель A260/280 для метода сорбционной экстракции меньше 1,8, что свидетельствует о неполном удалении белка в ходе экстракции НК из мокроты сорбционным методом. Среднее значение A260/235, характеризующее степень очистки препарата ДНК от полисахаридов, находилось в интервале 2,2–2,3 для ЦТАБ метода, тогда как при выделении НК в соответствии с вариантами экстракции 1 и 2 средние значения A260/235 меньше 2,0. Таким образом, применение метода экстракции на основе ЦТАБ реагента позволило удалять белки и полисахариды мокроты эффективно, тогда как растворы ДНК, полученные путем экстракции в соответствии с вариантами 1 и 2, могли содержать примеси белков и полисахаридов [146].

### 5.3. ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ МОКРОТЫ ДНК ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *Mycoplasma pneumoniae* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

ПЦР-РВ проводили с одинаковыми объемами образцов ДНК (5 мкл ДНК с концентрацией 30–50 нг/мкл), экстрагированными из мокроты в соответствии с вариантами экстракции 1, 2 и усовершенствованным 3. Исследовались продукты трех параллельных экстракций НК каждым методом. Все три метода экстракции демонстрировали 100 % воспроизводимость по результатам ПЦР исследований параллельных проб. Результаты амплификации представлены в табл. 5.3.

Таблица 5.3

Выявление ДНК *M. pneumoniae* в мокроте методом ПЦР-РВ

Вариант экстракции	ДНК <i>M. pneumoniae</i>	
	Число случаев	Сt <sup>a</sup> , медиана (мин...макс)
1	12	32,8 (31,1...33,6)
2	9	33,8 (33,2...34,9)
3	16	30,6 (29,3...32,9)

Примечание: Сt<sup>a</sup> — пороговый цикл амплификации, после которого начинается экспоненциальный рост количества продуктов ПЦР.

В соответствии с данными табл. 5.3 выявляемость ДНК *M. pneumoniae* при использовании усовершенствованного варианта экстракции 3 (усовершенствованный ЦТАБ метод) наибольшая, все результаты ПЦР-РВ были подтверждены в ходе электрофореза продуктов амплификации.

Основная часть (98 %) отрицательных результатов в выявлении ДНК *M. pneumoniae* в мокроте после применения вариантов экстракции 1 и 2, при положительных результатах ПЦР-РВ после экстракции НК из мокроты ЦТАБ методом имели место, когда материалом для исследования являлась мокрота вязкой консистенции. Результаты исследования мокроты умеренно вязкой и жидкой консистенции в отношении обнаружения ДНК *M. pneumoniae* при использовании всех трех вариантов экстракции соответствовали друг другу.

Мокрота вязкой консистенции, в которой много слизи, может присутствовать гной, содержит больше ингибиторов амплификации — полисахаридов и белков, которые не полностью удаляются в процессе экстракции НК с помощью вариантов 1 и 2, что приводит к получению ложноотрицательных результатов в выявлении ДНК *M. pneumoniae*.

В нашем исследовании разбавлением в 4 раза растворов ДНК, которые дали при ПЦР исследовании ложноотрицательный результат выявления ДНК *M. pneumoniae*, удалось получить положительный результат в 30 % случаев. Полученные данные свидетельствует о том, что в случае применения вариантов 1 и 2 для экстракции НК из мокроты ингибиторы амплификации удаляются не полностью и приводят к снижению чувствительности ПЦР [146, 142].

Основа усовершенствованного варианта экстракции 3 — комбинированное использование ЦТАБ детергента, который эффективно удаляет полисахариды, протеиназы К, SDS и смеси хлороформ-изоамиловый спирт, что обеспечивает очистку препарата НК от белков, липидов, поэтому эффективность выявления ДНК *M. pneumoniae* в мокроте повышается за счет снижения количества ингибиторов амплификации [146].

Снижение концентрации ингибиторов амплификации приводит к увеличению эффективности ПЦР-РВ, при этом значение  $C_t$  уменьшается. Также чем выше концентрация специфической ДНК в исследуемом образце, тем раньше наступает пороговый цикл амплификации [78].

В случае ЦТАБ экстракции значения медиан  $C_t$  для ДНК *M. pneumoniae* были наименьшими в сравнении с методами вариантов 1 и 2 (критерий Вилкоксона,  $p = 0,01$  и  $p = 0,007$ ). Визуальная оценка результатов электрофореза продуктов амплификации показала наибольшее свечение для проб, экстрагированных ЦТАБ методом (рис. 5.2).



Рис. 5.2. Электрофореграмма амплифицированного специфического фрагмента ДНК *M. pneumoniae* в агарозном геле

Примечание: экстракция ДНК проводилась методами протеиназа К-фенол-хлороформная экстракция (1), сорбционной экстракции (2) и оптимизированного ЦТАБ метода (3).

#### **5.4. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ *Mycoplasma pneumoniae* в ассоциации с *Chlamydia pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции**

В ходе исследования показано, что у пациентов основной группы с высокой частотой выявлялась ДНК *M. pneumoniae* (74 %), а также ДНК *C. pneumoniae* (30 %), что согласуется с результатами изучения этиологической роли данных атипичных микроорганизмов при бронхитах и пневмониях у детей [2, 3, 14, 73, 88].

Инфицирование респираторного тракта *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* может протекать в виде смешанной инфекции. Так, в основной группе (n = 97) среди 86 случаев инфицирования *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* ассоциация данных микроорганизмов выявлялась в 15 случаях. У детей старше 2 лет группы сравнения (n = 152) сочетанная хламидийно-микоплазменная инфекция респираторного тракта была представлена ассоциацией *C. pneumoniae* + *M. pneumoniae* в количестве 9 случаев из 48 случаев хламидийно-микоплазменного инфицирования в данной возрастной группе [149]. Также выявлены ассоциации *M. pneumoniae* с возбудителями не хламидийно-микоплазменной природы (*Str. pneumoniae*, *Staph. aureus*, *Str. pyogenes* и *H. Influenzae*) [149].

Применение современного специфичного и высокочувствительного метода молекулярно-генетической диагностики ПЦР-РВ представляет собой перспективный способ выявления *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* в целях ранней этиологической диагностики, в том числе в условиях смешанного инфицирования [74, 79].

В ходе исследования усовершенствована методика для выявления ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* методом ПЦР-РВ в мультиплексном формате с применением TaqMan олигонуклеотидных зондов.

Метод основывается на применении нескольких пар праймеров, специфичных к нуклеотидным последовательностям выявляемых микроорганизмов, и гибридизационных зондов, меченых различными флуо-

ресцентными красителями на 5'-конце и тушителями флуоресценции на 3'-конце (TaqMan олигонуклеотидные зонды). TaqMan-зонды связываются комплементарно с ДНК-матрицей и располагаются между праймерами. В комплексе с ДНК флуоресцентный сигнал TaqMan-зондов гасится тушителем флуоресценции. Во время амплификации Taq-полимеразы проявляет 5'-3' экзонуклеазную активность и, дойдя до 5'-конца TaqMan-зонда, начинает расщеплять его, высвобождая флуоресцентный краситель и гаситель флуоресценции. Пространственное разделение флуоресцентного красителя и тушителя флуоресценции приводит к росту флуоресцентного сигнала. Увеличение флуоресценции положительно коррелирует с количеством синтезированного ПЦР-продукта. Скорость изменения флуоресцентного сигнала во времени зависит от начальной концентрации специфичной ДНК-матрицы, что позволяет проводить количественное определение ДНК в пробе биологического материала [137].

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится 2 реакции — амплификация участков ДНК *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae*. Результаты амплификации ДНК *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae* регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции.

Для дизайна праймеров выбраны видоспецифичные последовательности в геномах *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*, ответственные за синтез факторов патогенности возбудителей.

Праймеры для детекции ДНК *M. pneumoniae* и последовательность олигонуклеотидного меченого зонда были выбраны на основе генетической последовательности P-1 гена, продуктом которого является протеин цитоадгезии, необходимый возбудителю для колонизации респираторного тракта (*MPN141*, номер в GeneBank NC\_000912.1, регион 180858...185741) [142, 1150, 2145, 2147]:

P1-f- CCAACCAACAACAACGGTCA (прямой праймер)

P1-r- ACCTTGACTGGAGGCCGTTA (обратный праймер)

P1-p- TCAATCCGAATAACGGTGACTTCTTACCACTG (TaqMan-зонд)

ожидаемый размер ампликона 76 п.н.

Праймеры для детекции ДНК *S. pneumoniae* и последовательность олигонуклеотидного меченого зонда были выбраны на основе генетической последовательности PstI фрагмента, кодирующего иммунореактивный протеин семейства hsp70 [138, 139, 2146]:

PstI-f- CATGGTGCATTCGCCAAGG (прямой праймер)

PstI-r- CGTGTGCTCCAGCCATTTTA (обратный праймер)

PstI-p- TCTACGTTGCCTCTAAGAGAAAАСТTCAAGTTGGA (TaqMan-зонд)

ожидаемый размер ампликона 82 п.н.

Конструирование праймеров проводили вручную с учетом основных требований к конструкции праймеров для мультиплексной ПЦР [140, 141]:

1. Каждый праймер должен содержать от 9 до 11 нуклеотидов G или C.

2. Участки праймеров (в обратной последовательности) размером 5 нуклеотидов и более не должны быть комплементарны 3' внутренним участкам других праймеров и самого праймера.

3. Праймеры не должны содержать повторы на подобие ААААА, GAGAGA и др., что является существенным, поскольку наличие протяженных повторов нуклеотидов в структуре праймеров, подобранных для амплификации фрагментов генома прокариот, может значительно увеличить вероятность их взаимодействия с генетическими фрагментами клеток эукариот человека, в геноме которых много нуклеотидных повторов.

4. Оптимальная температура плавления праймеров ( $T_m$ ) (58–60) °С,  $T_m$  всех праймеров должны быть сходными, что позволяет оптимизировать температуру отжига для мультиплексной ПЦР-РВ.

5.  $T_m$  TaqMan-зонда должна быть на 10 °С выше, чем  $T_m$  праймеров.

6. Праймеры должны быть длиной 15–30 пар оснований.

7. Общее количество оснований G или C на 3' концах праймеров в пределах 5 нуклеотидов не должно превышать 2 основания, что создает относительную нестабильность 3' концов праймеров и тем самым препятствует неспецифичному связыванию праймеров.

8. Максимальная длина ампликона не должна превышать 400 пар оснований (оптимально 50–150 оснований).

9. Содержание G+C для зонда должно составлять 30–80 %, при этом нуклеотиды C должны превалировать, на 5' конце зонда не должно быть нуклеотида G.

Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и TaqMan-зондов проводили с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Приготовление ПКО для ПЦР-РВ осуществлялось на базе лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси путем клонирования необходимого ампликона в плазмиду pXcmkn12 (The cloning vector collection, Япония).

Для получения ампликона, содержащего анализируемый фрагмент P1 гена *M. pneumoniae*, использовалась суммарная ДНК *M. pneumoniae* (AmpliRun® *Mycoplasma pneumoniae* DNA Control, Vircell),  $10^4$  копий/мкл.

Для получения ампликона, содержащего анализируемый PstI фрагмент *C. pneumoniae*, использовалась суммарная ДНК *C. pneumoniae* (AmpliRun® Chlamydia pneumoniae DNA Control, Vircell),  $10^4$  копий/мкл.

Присутствие анализируемых фрагментов P1 гена *M. pneumoniae* и PstI фрагмента *C. pneumoniae* в полученных плаزمиды рMPp1 и рCPpstI соответственно проверяли с помощью реакции секвенирования.

Плазмиды рMPp1 и рCPpstI в концентрации  $1 \times 10^4$  копии/мл использовались в качестве отдельных ПКО. Отрицательным контрольным материалом служила бидистиллированная вода.

Для оптимизации условий мультиплексной ПЦР-РВ в ходе исследования был установлен оптимальный вариант проведения амплификации с подобранными праймерами в моноплексном формате.

Протестировано несколько вариантов амплификации для анализируемых фрагментов P1 гена *M. pneumoniae* и PstI фрагмента *C. pneumoniae*, при этом варьировали температуру отжига праймеров (от 53 °С до 57 °С), длительность этапа отжига праймеров (от 20 до 40 секунд), длительность этапа элонгации (от 20 до 40 секунд). Оптимизацию условий амплификации и определение аналитической чувствительности проводили на образцах ПКО.

Результаты электрофоретического анализа показали, что оптимальным для применения в мультиплексном формате является использование температуры отжига, равной 55 °С, длительности этапа отжига праймеров и элонгации в течение 30 секунд.

Таким образом, был подобран наилучший режим для амплификации фрагментов P1 гена *M. pneumoniae* и PstI фрагмента *C. pneumoniae*, который далее тестировался в мультиплексном формате:

Денатурация	+95 °С... 5 мин.
Циклирование (45 циклов)	+95 °С... 30 сек.
	+55 °С... 30 сек.
	+72 °С... 10 сек.

Состав амплификационной смеси:

- 5–10 мкл выделенной ДНК;
- 1 мкл специфического (P1 ген *M pneumoniae*) прямого праймера;
- 1 мкл специфического (P1 ген *M pneumoniae*) обратного праймера;
- 1 мкл TaqMan-зонда (P1 ген *M pneumoniae*);
- 1 мкл специфического (PstI фрагмент *C pneumoniae*) прямого праймера;
- 1 мкл специфического (PstI фрагмент *C pneumoniae*) обратного праймера;
- 1 мкл специфического TaqMan-зонда (PstI фрагмент *C pneumoniae*);
- 25 мкл мастер-микс для TaqMan-ПЦР.

Для сравнения чувствительностей пар праймеров моно- и мультиплексного ПЦР-РВ анализа параллельно тестировались серийные разведения ПКО *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* в концентрациях  $10^2$ ;  $10^3$  и  $10^4$  копий/мл, при этом количество ПКО *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* на реакцию амплификации составило 1, 10 и 100 копий соответственно (табл. 5.4).

Таблица 5.4

**Чувствительность мультиплексной и моноплексной ПЦР-РВ при тестировании со стандартом одного из возбудителей в различных концентрациях (копии на реакцию)**

ДНК матрица	Формат анализа (пары праймеров)	Сt, медиана (мин...макс)		
		$10^2$	$10^1$	$10^0$
pMPp1	Мультиплексный	26,3 (25,9...26,7)	30,9 (30,4...31,4)	38,8 (38,3...39,3)
	Моноплексный	26,8 (26,5...27,1)	30,0 (29,6...30,4)	38,2 (38,0...38,4)
pCPpstI	Мультиплексный	25,7 (25,1...26,3)	29,9 (29,3...30,5)	38,3 (37,9...38,7)
	Моноплексный	25,2 (24,7...25,7)	29,5 (29,2...29,8)	37,6 (37,2...38,0)

Далее различные концентрации ДНК матрицы каждого микроорганизма смешивались и тестировались в мультиплексной ПЦР-РВ для оценки способности усовершенствованного метода коамплифицировать множество матриц, присутствующих в различных количествах в образцах (табл. 5.5).

Таблица 5.5

**Чувствительность мультиплексной ПЦР-РВ при коамплификации стандартов возбудителей (копии на реакцию)**

ДНК матрица	Сt, медиана (мин...макс)			
	pMPp1		pCPpstI	
	$10^2$ копий	$10^1$ копий	$10^2$ копий	$10^1$ копий
pMPp1 и pCPpstI	26,7 (26,4...27,0)	–	–	30,1 (29,5...30,7)
pMPp1 и pCPpstI	–	30,8 (30,4...31,2)	25,1 (24,3...25,9)	–

При анализе результатов амплификации каждой из ДНК матриц (pMPp1 и pCPpstI) отдельно при наличии обеих пар праймеров в реакционной смеси и различных концентраций ДНК матрицы отсутствовали статистически значимые отличия в значениях порогового цикла для моноплексной и мультиплексной ПЦР-РВ ( $p < 0,05$ ).

Усовершенствованная мультиплексная ПЦР-РВ позволяет детектировать с надежностью 90–100 % ДНК возбудителя при наличии порядка 10 копий ДНК. При концентрации 1 копия на реакцию порядка 50 % 40 % образцов было отрицательными.

При анализе результатов коампликации матриц (pMPp1 и pCPstI) при наличии обоих пар праймеров в реакционной смеси и различных концентраций матриц отсутствовали статистически значимые отличия в значениях порогового цикла для моноплексной и мультиплексной ПЦР-РВ ( $p < 0,05$ ).

Значения порогового цикла остались неизменными для ДНК матрицы, которая находилась в низкой относительной концентрации, даже при условиях наличия в большей концентрации ДНК матрица другого возбудителя в одной пробирке (в 10 раз превышение концентрации).

Таким образом, аналитическая чувствительность (предел обнаружения) для усовершенствованной методики составила 10 копий ДНК *M. pneumoniae* и/или *S. pneumoniae* на реакцию амплификации.

Биологическим материалом для оценки диагностических характеристик и апробирования усовершенствованного метода ПЦР-РВ для выявления ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* в мультиплексном формате стали 50 образцов мокроты детей с бронхитами и пневмониями, у которых с применением комплекса методов: культуральный, ПЦР-РВ с применением референсной тест-системы

«АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/ Chlamydia pneumoniae*-FL» (Российская Федерация) для выявления ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* и ИФА была установлена хламидийно-микоплазменная этиология заболевания, а также соскобы 30 детей и подростков без респираторной патологии с диагнозом функциональная кардиопатия.

При сопоставлении результатов усовершенствованной методики с референсной тест-системой значения диагностической специфичности и чувствительности составили 100 % (табл. 5.6): все случаи выявления ассоциаций *M. pneumoniae* с *S. pneumoniae* у детей с бронхитами и пневмониями были подтверждены при использовании усовершенствованной методики [149].

Таблица 5.6

Диагностические характеристики усовершенствованной методики для выявления ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*

Клинический образец	Результаты применения усовершенствованной методики	Результаты применения референсной тест-системы				
		<i>S. pneumoniae</i>		<i>M. pneumoniae</i>		
		П-ых <sup>а</sup>	О-ых <sup>б</sup>	П-ых	О-ых	
<i>Группа детей с респираторной патологией</i>						
Мокрота	Всего исследовано 50 образцов	положительно	37	0	37	0
		отрицательно	0	13	0	13
<i>Группа детей без респираторной патологии</i>						
Соскоб	Всего исследовано 30 образцов	положительно	0	0	0	0
		отрицательно	0	30	0	30

Примечание: <sup>а</sup> — положительных образцов, <sup>б</sup> — отрицательных образцов.

Таким образом, усовершенствованная и апробированная методика для выявления ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* методом ПЦР-РВ с применением TaqMan олигонуклеотидных зондов в мультиплексном формате позволяет получать результат в течение 4–5 часов в высоко стандартизированном формате без обработки ПЦР продуктов, что снижает риск ложноположительных результатов, которые могут иметь место при манипуляциях с ампликонами [142, 144–147].

### 5.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК *Mycoplasma pneumoniae* В МОКРОТЕ ПРИ МОНО- И СМЕШАННЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Согласно полученным данным, наиболее частым микроорганизмом, который выявлялся в ассоциациях с бактериальной патогенной микрофлорой респираторного тракта у детей, была *M. pneumoniae* [149, 143].

В ходе исследования была оценена концентрация ДНК *M. pneumoniae* в мокроте при моно-инфицировании данным патогеном и в ассоциациях с другими возбудителями.

Для проведения количественного определения амплификацию ДНК, выделенную из исследуемых образцов мокроты, проводили одновременно с амплификацией ДНК калибраторов — образцов с известной концентрацией ДНК-мишени. Калибратором стала плаزمиды, содержащая фрагмент гена *M. pneumoniae*. Концентрация плазмиды в калибраторе I составила  $1 \times 10^2$  копий/мл, в калибраторе II —  $1 \times 10^3$  копий/мл, в калибраторе III —  $1 \times 10^4$  копий/мл.

По результатам амплификации ДНК-калибраторов строили калибровочные линии (рис. 5.3), по которым определяли концентрацию ДНК-мишени в исследуемых образцах.

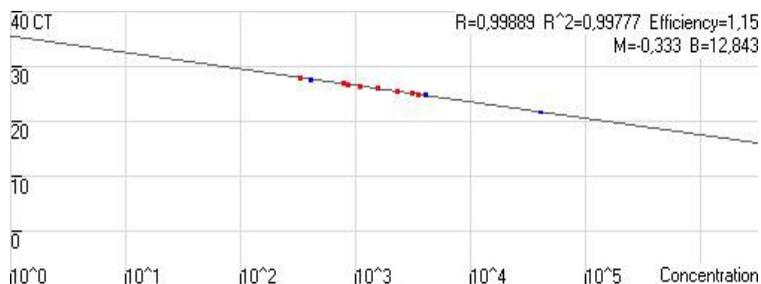


Рис. 5.3. Линейная зависимость между исходной концентрацией ДНК мишени в образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговым циклом, Ct). Концентрация ДНК-калибраторов в диапазоне от  $10^2$  до  $10^4$  копий/мл

Концентрацию ДНК *M. pneumoniae*, выраженную в количестве копий в 1 мл мокроты ( $Q_{\text{ДНК-М}}$ ), рассчитывали по формуле 5.1 [149]:

$$Q_{\text{ДНК-М}} = X \times [(V_{\text{ДНК}} \times V_{\text{разв}}) / (V_{\text{экстр}} \times V_{\text{м}})] \times k, \quad (5.1)$$

где  $X$  — концентрация ДНК, найденная по калибровочной зависимости порогового цикла флуоресценции  $C_t$  от концентрации калибратора, соответствует копиям ДНК на 1 мл раствора ДНК после экстракции;  $V_{\text{ДНК}}$  — объем раствора ДНК после экстракции, мл;  $V_{\text{разв}}$  — объем смеси мокроты и реагента «Муколизин», мл;  $V_{\text{экстр}}$  — объем смеси мокроты и муколизина, взятый для экстракции ДНК, мл;  $V_{\text{м}}$  — объем мокроты, взятый для смешивания с реагентом «Муколизин», мл;  $k$  — коэффициент, соответствующий эффективности выделения ДНК *M. pneumoniae* из мокроты с применением ЦТАБ.

Для определения коэффициента  $k$  готовились разведения суммарной ДНК *M. pneumoniae* (AmpliRun® *Mycoplasma pneumoniae* DNA Control, Vircell) и культуры *M. pneumoniae*, которые в параллельных экспериментах добавлялись к образцам мокроты после ее предварительной обработки реагентом «Муколизин». Коэффициент  $k$  рассчитывался как отношение концентрации ДНК *M. pneumoniae*, внесенной в образец мокроты до процесса экстракции методом на основе ЦТАБ, к концентрации ДНК *M. pneumoniae*, найденной по калибровочной кривой при проведении количественной ПЦР-РВ. Коэффициент  $k$  составил 1,5.

При использовании количественной ПЦР-РВ для выявления ДНК *M. pneumoniae* были определены концентрации ДНК *M. pneumoniae* в мокроте в случае моно-инфицирования данным микроорганизмом (1500–8000 копий на мл) и в ассоциациях (12000–55600 копий на мл) [145–149]. Было показано, что отличие концентраций ДНК *M. pneumoniae* в ассоциациях от концентраций ДНК данным микроорганизмом при моно-инфицировании статистически значимо по результатам применения  $U$ -критерия Манна–Уитни с уровнем значимости  $p = 0,05$ .

### **Выводы**

1. Особенности физико-химических свойств мокроты оказывают существенное влияние на эффективность выделения ДНК. Присутствие слизи и высокая вязкость исследуемого образца затрудняют экстракцию.

2. Применение классических способов экстракции, к которым относятся фенол-хлороформная и сорбционная экстракции, не лишено недостатков, способных привести к получению ложноотрицательных результатов ПЦР. Причиной этого является недостаточное удаление ингибиторов ПЦР, основными из которых являются содержащиеся в мокроте полисахариды. К тому же данные методы не обеспечивают достаточно глубокого лизиса клеток с целью высвобождения ДНК *M. pneumoniae*.

3. Разработанные условия применения ЦТАБ в комплексе с ферментом протеиназа К и детергентом SDS для выделения ДНК из мокроты позволяют получить нуклеиновую кислоту с чистотой, соответствующей критериям эффективного удаления полисахаридов и белков.

4. Применение усовершенствованного метода на основе ЦТАБ реагента позволило получить наибольшее количество положительных результатов выявления ДНК *M. pneumoniae* в мокроте, что отражает повышение эффективности ПЦР в детекции ДНК этого этиологически значимого в развитии респираторной патологии микроорганизма.

5. Идентификация ассоциаций *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* при бронхитах и пневмониях у детей оптимизирована применением методики на основе ПЦР-РВ с мультиплексным форматом детекции, которая по показателям диагностической чувствительности и специфичности не уступает тест-системе для выявления ДНК *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* в биологическом материале методом ПЦР в мультиплексном формате «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydia pneumoniae*-FL» (Российская Федерация).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ (РАЗДЕЛ 2)

1. *Официальный* статистический сборник Министерства здравоохранения за 2018 г. [Электронный ресурс] // Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Режим доступа: <http://m.med.by>. Дата доступа: 29.06.2020.
2. *Микоплазменная пневмония у детей* / О. Ф. Романовская [и др.] // *Здравоохранение*. 2019. № 4. С. 20–28.
3. *Жерносек, В. Ф.* Острая пневмония у детей: лечение, профилактика / В. Ф. Жерносек, К. К. Орынбасарова, Ш. К. Батырханов. Минск : БелМАПО, 2013. 51 с.
4. *Ковтун, Т. А.* Современные представления об эпидемиологии и этиологии острых респираторных заболеваний дыхательных путей у детей / Т. А. Ковтун, А. В. Тутельян, С. А. Шабалина // *Эпидемиологии и вакцинопрофилактика*. 2010. Т. 54, № 5. С. 41–44.
5. *The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America* / J. S. Bradley [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* 2011. Vol. 53, № 7. P. 25–76.
6. *Мусалимова, Г. Г.* Диагностика и лечение микоплазменной и хламидийной пневмоний / Г. Г. Мусалимова, В. Н. Саперов, Т. А. Никонорова // *Лечащий врач*. 2004. № 8. С. 46–50.
7. *Viruses and bacteria in acute asthma exacerbations* / N. G. Papadopoulos [et al.] // *Allergy*. 2011. Vol. 66. P. 458–468.
8. *Re-annotating the Mycoplasma pneumoniae genome sequence: adding value, function and reading frames* / T. Dandekar [et al.] // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 17. P. 3278–3288.
9. *Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae* / R. Himmelreich [et al.] // *Nucleic Acids Res.* 1996. Vol. 24, № 22. P. 4420–4449.
10. *Waites, K. B.* Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen / K. B. Waites, D. F. Talkington // *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. Vol. 17, № 4. P. 697–728.
11. *Mycoplasma pneumoniae as a trigger for Henoch-Schönlein purpura in children* / E. Kuźma-Mroczkowska [et al.] // *Cent. Eur. J. Immunol.* 2016. Vol. 40, № 4. P. 489–492.
12. *Insights into the pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae (Review)* / J. He [et al.] // *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 14, № 5. P. 4030–4036.
13. *Novel aspects on the pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia and therapeutic implications* [Electronic resource] / T. Saraya [et al.] // *Front Microbiol.* 2014. Vol. 5. Article 410. Режим доступа: doi:10.3389/fmicb.2014.00410. Дата доступа: 02.11.2017.
14. *Role of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in children with community-acquired lower respiratory tract infections* / N. Principi [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* 2001. Vol. 32. P. 1281–1289.
15. *Clinical and laboratory profiles of refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children* / M. Wang [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* 2014. Vol. 29. P. 18–23.
16. *Коровина, Н. А.* Респираторный микоплазмоз у детей / Н. А. Коровина, А. Л. Заплатников // *Рус. мед. журнал*. 2004. Т. 12, № 13. С. 773–777.
17. *Chaudhry, R.* Pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae: an update / R. Chaudhry, A. Ghosh, A. Chandolia // *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2016. Vol. 34, № 1. P. 7–16.
18. *Balish, M. F.* Mycoplasma pneumoniae, an underutilized model for bacterial cell biology / M. F. Balish // *J. Bacteriol.* 2014. Vol. 196, № 21. P. 3675–3682.
19. *Cytadherence of Mycoplasma pneumoniae induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4* / T. Shimizu [et al.] // *Infect. Immun.* 2014. Vol. 82. P. 3076–3086.
20. *Dallo, S. F.* Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas / S. F. Dallo, J. V. Baseman // *Microb Pathog.* 2000. Vol. 29, № 5. P. 301–309.
21. *Identification and characterization of human surfactant protein a binding protein of Mycoplasma pneumoniae* / T. R. Kannan [et al.] // *Infect. Immun.* 2005. Vol. 73. P. 2828–2834.

22. Kannan, T. R. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens / T. R. Kannan, J. B. Baseman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, № 17. P. 6724–6729.
23. *Mycoplasma pneumoniae* Community Acquired Respiratory Distress Syndrome toxin expression reveals growth phase and infection-dependent regulation / T. R. Kannan [et al.] // Mol. Microbiol. 2010. Vol. 76, № 5. P. 1127–1141.
24. Comparative “-omics” in *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals key virulence factors [Electronic resource] / M. Lluch-Senar [et al.] // PLoS. 2015. Vol. 10, № 9. Режим доступа: <https://doi.org>. Дата доступа: 02.11.2017.
25. Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae* [Electronic resource] / L. Xiao [et al.] // BMC Genomics. 2015. Vol. 16, № 1. Article 610. Режим доступа: doi:10.1186/s12864-015-1801-0. Дата доступа: 02.11.2017.
26. Krishnan, M. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin is internalized via clathrin-mediated endocytosis [Electronic resource] / M. Krishnan, T. R. Kannan, J. B. Baseman // PLoS. 2013. Vol. 8, № 5. Режим доступа: <https://doi.org>. Дата доступа: 15.11.2017.
27. Structure of CARDS toxin, a unique ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin from *Mycoplasma pneumoniae* / A. Becker [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. Vol. 112, № 16. P. 5165–5170.
28. Parrott, G. L. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae* [Electronic resource] / G. L. Parrott, T. Kinjo, J. Fujita // Front. Microbiol. 2016. Vol. 7. Article 513. Режим доступа: doi:10.3389/fmicb.2016.00513. Дата доступа: 11.12.2018.
29. Bai, D. The effect of down-regulation of CCL5 on lipopolysaccharide-induced WI-38 fibroblast injury: a potential role for infantile pneumoniae / D. Bai, A. Han, S. Cong // Iran J. Basic Med. Sci. 2018. Vol. 21, № 5. P. 449–454.
30. Changes of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia / H. M. Qiao [et al.] // Journal of Clinical Pediatrics. 2012. Vol. 1. P. 59–61.
31. Decreased interleukin-18 response in asthmatic children with severe *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia / H. L. Chung [et al.] // Cytokine. 2011. Vol. 54, № 2. P. 218–221.
32. Global secretome characterization of A549 human alveolar epithelial carcinoma cells during *Mycoplasma pneumoniae* infection [Electronic resource] / S. Li [et al.] // BMC Microbiol. 2014. Vol. 14. Article 27. Режим доступа: doi:10.1186/1471-2180-14-27. Дата доступа: 11.12.2018.
33. Interleukin 1 receptor-like 1 (IL1RL1) promotes airway bacterial and viral infection and inflammation [Electronic resource] / N. Schaunaman [et al.] // Infect. Immun. 2019. Vol. 87, № 7. Режим доступа: doi:10.1128/IAI.00340-19. Дата доступа: 02.07.2020.
34. RANTES (CCL5) regulates airway responsiveness after repeated allergen challenge / T. Koya [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2006. Vol. 35, № 2. P. 147–154.
35. Drake, L. Y. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease / L. Y. Drake, H. Kita // Immunol. Rev. 2017. Vol. 278, № 1. P. 173–184.
36. Surfactant protein-A inhibits *Mycoplasma*-induced dendritic cell maturation through regulation of HMGB-1 cytokine activity / J. G. Ledford [et al.] // J. Immunol. 2010. Vol. 185, № 7. P. 3884–3894.
37. Mast cell TNF receptors regulate responses to *Mycoplasma pneumoniae* in surfactant protein A (SP-A)<sup>-/-</sup> mice / B. J. Hsia // American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. 2012. Vol. 130, № 1. P. 205–214.
38. *Mycoplasma pneumoniae* infection induces reactive oxygen species and DNA damage in A549 human lung carcinoma cells / G. Sun [et al.] // Infect. Immun. 2008. Vol. 76, № 10. P. 4405–4413.
39. Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae* / C. Hames [et al.] // Journal of Bacteriology. 2009. Vol. 191, № 3. P. 747–753.

40. Balish, M. F. Potential molecular targets for narrow-spectrum agents to combat *Mycoplasma pneumoniae* infection and disease [Electronic resource] / M. F. Balish, S. L. Distelhorst // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. Article 205. Режим доступа: doi: 10.3389/fmicb.2016.00205. Дата доступа: 02.11.2017.
41. *Implication of glycerol and phospholipid transporters in Mycoplasma pneumoniae growth and virulence* / S. Großhennig [et al.] // *Infect. Immun.* 2013. Vol. 81, № 3. P. 896–904.
42. Mok, J. Y. *Mycoplasma pneumoniae* infection. A follow-up study of 50 children with respiratory illness / J. Y. Mok, P. R. Waugh, H. Simpson // *Arch. Dis. Child.* 1979. Vol. 54. P. 506–511.
43. *Association of Mycoplasma pneumoniae antigen with initial onset of bronchial asthma* / T. Yano [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994. Vol. 149. P. 1348–1353.
44. *Mycoplasma pneumoniae* infection in a pediatric population: analysis of soluble immune markers as risk factors for asthma / J. Hassan [et al.] // *Human Immunology.* 2008. Vol. 69, № 12. P. 851–855.
45. *Infection with and carriage of Mycoplasma pneumoniae in children* [Electronic resource] / P. M. Meyer Sauteur [et al.] // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. Article 329. Режим доступа: <https://doi.org>. Дата доступа: 22.11.2017.
46. *Changes in levels of IL-9, IL-17, IFN- $\gamma$ , dendritic cell numbers and TLR expression in peripheral blood in asthmatic children with Mycoplasma pneumoniae* / L. Shao [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8, № 5. P. 5263–5272.
47. *Comparison of Mycoplasma pneumoniae infections in asthmatic children versus asthmatic adults* / C. Bébear [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014. Vol. 33, № 3. P. 71–75.
48. Hong, S. J. The role of *Mycoplasma pneumoniae* infection in asthma / S. J. Hong [et al.] // *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2012. Vol. 4, № 2. P. 59–61.
49. Johnston, S. L. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*: a role in asthma pathogenesis? / S. L. Johnston, R. L. Martin // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005. Vol. 172, № 9. P. 1078–1089.
50. *Multi-season analyses of causative pathogens in children hospitalized with asthma exacerbation* / N. Abe [et al.] // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2019. Vol. 30. P. 724–731.
51. *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute and refractory asthma / P. R. Wood [et al.] // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2013. Vol. 110, № 5. P. 328–334.
52. *Importance of acute Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae infections in children with wheezing* / S. Esposito [et al.] // *Eur. Respir. J.* 2000. Vol. 16. P. 1142–1146.
53. Ali, M. Association of *Mycoplasma pneumoniae* in asthma pathogenesis / M. Ali // *Tuberc. Respir. Dis.* 2008. Vol. 65. P. 261–268.
54. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children / S. Biscardi [et al.] // *Clinical Infectious Diseases.* 2004. Vol. 38, № 10. P. 1341–1346.
55. Sun, W. Risk factors for readmission of children hospitalized with acute asthma attacks in South China / W. Sun, L. Pan, W. Zhang // *J. Asthma.* 2019. P. 1–10.
56. *A link between chronic asthma and chronic infection* / R. J. Martin [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. Vol. 107. P. 595–601.
57. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin elicits a functional IgE response in Balb/c mice [Electronic resource] / J. L. Medina [et al.] // *PLoS.* 2017. Vol. 12, № 2. Режим доступа: doi: 10.1371/journal.pone.0172447. Дата доступа: 02.07.2020.
58. *Toll-like receptor-2 down regulation in established mouse allergic lungs contributes to decreased Mycoplasma clearance* [Electronic resource] / Q. Wu [et al.] // *AJRCMB.* 2008. Vol. 177, № 7. Режим доступа: <https://doi.org>. Дата доступа: 02.07.2020.
59. *Levels of interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with Mycoplasma pneumoniae: implication of tendency toward increased immunoglobulin E production* [Electronic resource] / Y. Y. Koh [et al.] // *Pediatrics.* 2001. Vol. 107: E39. Режим доступа: doi: 10.1542/peds.107.3.e39. Дата доступа: 02.07.2020.

60. *Mycoplasma pneumoniae* infection in children is a risk factor for developing allergic diseases [Electronic resource] / Q. Ye [et al.] // Scientific World Journal. 2014. Article 986527. Режим доступа: doi: 10.1155/2014/986527. Дата доступа: 02.07.2020.
61. *Mast* cells protect against airway *Mycoplasma pneumoniae* under allergic conditions / N. M. Michels [et al.] // Clin. Exp. Allergy. 2010. Vol. 40, № 9. P. 1406–1413.
62. *Changes* of serum TNF- $\alpha$ , IL-5 and IgE levels in the patients of *Mycoplasma pneumoniae* infection with or without bronchial asthma / L. Wang [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Med. 2015. Vol. 8, № 3. P. 3901–3906.
63. *Mycoplasma pneumoniae* infection affects serum levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-5 in atopic children/ Y. C. Jeong [et al.] // Allergy Asthma Immunol Res. 2012. Vol. 4, № 2. P. 92–97.
64. *Mycoplasma pneumoniae* modulates STAT3-STAT6/EGFR-FOXA2 signaling to induce overexpression of airway mucins / Y. Hao [et al.] // Infect. Immun. 2014. Vol. 82, № 12. P. 5246–5255.
65. *Metersky, M.* Can animal models really teach us anything about pneumonia? Con [Electronic resource] / M. Metersky, G. Waterer // Eur. Respir. J. 2020. Vol. 55. Article 1901525. Режим доступа: <https://doi.org>. Дата доступа: 02.07.2020.
66. *Expectations* for methodology and translation of animal research: a survey of health care workers [Electronic resource] / A. R. Joffe [et al.] // BMC Med Ethics. 2015. Vol. 16. Article 29. Режим доступа: doi:10.1186/s12910-015-0024-x. Дата доступа: 02.07.2020.
67. *Raty, R.* Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR / R. Raty, E. Ronkko, M. Kleemola // Journal of Medical Microbiology. 2005. Vol. 54. P. 287–291.
68. *Филатова, Е. Н.* Культуры клеток в моделировании инфекционных процессов / Е. Н. Филатова, О. В. Уткин // Успехи современной биологии. 2014. Т. 134, № 1. С. 19–25.
69. *Gruber, F. P.* Alternatives to animal experiments in basic research / F. P. Gruber, T. Hartung // ALTEX. 2004. Vol. 21, Suppl. 1. P. 3–31.
70. *Прозоровский, С. В.* Медицинская микоплазмология / С. В. Прозоровский, И. В. Раковская, Ю. В. Вульфович. Москва : Медицина, 1995. 386 с.
71. *Directive 2010/63/EU* on the protection of animals used for scientific purposes [Electronic resource] / Official journal of European Union. 2010. L276. P. 33–79. Режим доступа: <https://eur-lex.europa.eu>. Дата доступа: 02.07.2020.
72. *Shimizu, T.* Inflammation-inducing factors of *Mycoplasma pneumoniae* / T. Shimizu [Electronic resource] // Front Microbiol. 2016. Vol. 7. Article 414. Режим доступа: doi: 10.3389/fmicb.2016.00414. Дата доступа: 02.07.2020.
73. *Limited* utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections / R. C. She [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48, № 9. P. 3380–3382.
74. *Comparison* of real-time polymerase chain reaction and serological tests for the confirmation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia / H. Y. Chang [et al.] // J. Microbiol. Immunol. Infect. 2014. Vol. 47, № 2. P. 137–144.
75. *Loens, K.* Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods / K. Loens, H. Goossens, M. Ieven // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2010. Vol. 29, № 9. P. 1055–1069.
76. *Костюк, С. А.* Молекулярно-биологические методы в медицине : монография / С. А. Костюк. Минск : БелМАПО, 2013. 327 с.
77. *Теоретические* и прикладные вопросы применения методов анализа нуклеиновых кислот монография / С. А. Костюк [и др.]. Минск : БелМАПО, 2014. 272 с.
78. *Molecular* diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections / K. Loens [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2003. Vol. 41, № 11. P. 4915–4923.

79. *Impact of bacterial and viral coinfection on Mycoplasmal pneumoniae in childhood community-acquired pneumonia* / C. Y. Chiu [et al.] // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2015. Vol. 48, № 1. P. 51–56.

80. *Song, Q.* Effects of bacterial and viral co-infections of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children: analysis report from Beijing Children's Hospital between 2010 and 2014 / Q. Song, B. P. Xu, K. L. Shen // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. Vol. 8, № 9. P. 15666–15674.

81. *Сомма, М.* Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 4. Выделение и очистка ДНК : метод. рекомендации [Электронный ресурс] / М. Сомма. Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. 2006. 20 с. Режим доступа: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>. Дата доступа: 03.11.2017.

82. *Molecular detection of Mycoplasma pneumoniae in adults with community-acquired pneumonia requiring hospitalization* / J. W. Dorigo-Zetsma [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology.* 2001. Vol. 39, № 3. P. 1184–1186.

83. *Методы клинических лабораторных исследований* / В. С. Камышников [и др.] ; под ред. В. С. Камышникова. Минск : Бел. наука, 2002. 775 с.

84. *Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности* : метод. указания. Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 51 с.

85. *Ходзицкая, В. К.* Нарушение и коррекция мукоцилиарного клиренса при заболеваниях дыхательных путей и ЛОР-органов [Электронный ресурс] / В. К. Ходзицкая, С. В. Ходзицкая // *Болезни и антибиотикотерапии.* 2010. Режим доступа: <http://antibiotic.mif-ua.com>. Дата доступа: 03.11.2017.

86. *Ieven, M.* Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory / M. Ieven, H. Goossens // *Clinical Microbiology Reviews.* 1997. Vol. 10, № 2. P. 242–256.

87. *Клинические протоколы диагностики и лечения детей с заболеваниями органов дыхания* : приложение 1 к Приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 27 декабря 2012 г. № 1536. [Электронный ресурс] / Министерство Здравоохранения Республики Беларусь. Режим доступа: <http://minzdrav.gov.by>. Дата доступа: 02.11.2017.

88. *Зайцева, С. В.* Микоплазменная инфекция у детей / С. В. Зайцева, А. К. Застрожина, О. А. Муртазаева // *Рус. мед. журнал.* 2017. № 5. С. 327–334.

89. *Ведерников, В. Е.* Сравнительная характеристика способов экстракции нуклеиновых кислот / В. Е. Ведерников // *Лаборатория.* 2012. № 4. С. 14–15.

90. *Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material* : a review / J. Hosek [et al.] // *Veterinari Medicina.* 2006. Vol. 5. P. 180–192.

91. *Микробиологические методы исследования биологического материала* : инструкция по применению № 075-0210 : утв. Гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь 19.03.10 / сост. Н. Д. Коломиец [и др.]. Минск, 2010. 129 с.

92. *Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to Mycoplasma pneumoniae* / M. Abele-Horn [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* 1998. Vol. 36. P. 548–551.

93. *Maass, M.* Comparison of sample preparation methods for detection of *Chlamydia pneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluid by PCR / M. Maass, K. Dalhoff // *J. Clinical Microbiology.* 1994. Vol. 32, № 10. P. 2616–2619.

94. *Murray, M. G.* Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // *Nucleic Acids Res.* 1980. Vol. 8, № 19. P. 4321–4325.

95. *Каюмов, А. Р.* Практикум по молекулярной генетике : учеб.-метод. пособие / А. Р. Каюмов, О. А. Гимадудинов. Казань: КФУ, 2016. 36 с.

96. *Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L.* / M. Azmat [et al.] // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2012. № 4. P. 239–243.

97. *Xin, Z.* A high throughput DNA extraction method with high yield and quality [Electronic resource] / *Z. Xin, J. Chen* // *Plant Methods*. 2012. Vol. 8. Article 26. Режим доступа: <https://plantmethods.biomedcentral.com>. Дата доступа: 02.11.2017.
98. *Comparison* of DNA extraction methods for microbial community profiling with an application to pediatric bronchoalveolar lavage samples [Electronic resource] / *D. Willner [et al.]* // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. Article 4. Режим доступа: <https://doi.org>. Дата доступа: 02.11.2017.
99. *Evaluation* of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: preliminary study [Electronic resource] / *I. Almeida [et al.]* // *BMC Res Notes*. 2013. Vol. 6. Article 561. Режим доступа: <http://doi.org>. Дата доступа: 02.11.2017.
100. *Molecular* detection of *Mycoplasma pneumoniae* by quantitative real-time PCR in patients with community acquired pneumonia / *R. Chaudhry [et al.]* // *Indian J. Med. Res.* 2013. Vol. 138, № 2. P. 244–251.
101. *Dumke, R.* Antibody response to *Mycoplasma pneumoniae*: protection of host and influence on outbreaks? [Electronic resource] / *R. Dumke, E. Jacobs* // *Front Microbiol.* 2016. Vol. 7. Article 39. Режим доступа: [doi:10.3389/fmicb.2016.00039](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00039). Дата доступа: 02.11.2017.
102. *Титова, Н. Д.* Развитие системы иммунитета плода, новорожденного и детей раннего возраста / *Н. Д. Титова* // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2007. № 4. С. 38–46.
103. *Литусов, Н. В.* Микоплазмы / *Н. В. Литусов*. Екатеринбург : Изд-во УГМУ, 2017. 19 с.
104. *Armstrong, S.* Impact of aerobicity on Mollicute colony growth on agar / *S. Armstrong, J. Strough, R. Nims* // *Adv. Biotech. & Micro.* 2018. Vol. 8, № 2. P. 555733.
105. *Detection* of *Mycoplasma pneumoniae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification / *K. Loens [et al.]* // *J. Clin. Microbiol.* 2003. Vol. 41, № 9. P. 4448–4450.
106. *Structure* and proposed mechanism of L- $\alpha$ -glycerophosphate oxidase from *Mycoplasma pneumoniae* / *C. K. Elkhali [et al.]* // *FEBS Journal*. 2015. Vol. 282. P. 3030–3042.
107. *Митрошина, Е. В.* Определение жизнеспособности клеточных культур : учеб.-метод. пособие / *Е. В. Митрошина, Т. А. Мищенко, М. В. Ведунова*. Нижний Новгород : Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, 2015. 21 с.
108. *Livak, K. J.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method / *K. J. Livak, T. D. Schmittgen* // *Method*. 2001. Vol. 25. P. 402–408.
109. *Наркевич, А. Н.* Методы определения минимально необходимого объема выборки в медицинских исследованиях [Электронный ресурс] / *А. Н. Наркевич, К. А. Виноградов* // *Социальные аспекты здоровья населения*. 2019. Т. 65, № 6. Статья 10. Режим доступа: [doi: 10.21045/2071-5021-2019-65-6-10](https://doi.org/10.21045/2071-5021-2019-65-6-10). Дата доступа: 20.07.2020.
110. *Tumor* necrosis factor- $\alpha$  regulates interleukin-33 expression through extracellular signal-regulated kinase / *I. H. Park [et al.]* // *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2016. Vol. 6, № 9. P. 973–980.
111. *Yavlovich, A.* Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells / *A. Yavlovich, M. Tarshis, S. Rottem* // *FEMS Microbiology Letters*. 2004. Vol. 233, Issue 2. P. 241–246.
112. *Chen, Y. Y.* Parasitism of hamster trachea epithelial cells by *Mycoplasma pneumoniae* / *Y. Y. Chen, D. C. Krause* // *Infection and immunity*. 1988. Vol. 56, № 3. P. 570–576.
113. *Interplay* between *Mycoplasmas* and host target cells / *J. B. Baseman [et al.]* // *Microb. Pathol.* 1995. Vol. 19, № 2. P. 105–116.
114. *Chan, L. L.-Y.* Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells [Electronic resource] / *L. L.-Y. Chan, W. L. Rice, J. Qiu* // *PLoS*. 2020. Vol. 15, № 1. Режим доступа : <https://doi.org>. Дата доступа: 17.07.2020.

115. *Role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection* [Electronic resource] / A. A. Crawford [et al.] // PLoS. 2011. Vol. 7, № 7. Режим доступа: doi:10.1371/journal.ppat.1002098. Дата доступа: 17.07.2020.
116. *Induction of Regulated upon Activation, Normal T Cells Expressed and Secreted (RANTES) and Transforming Growth Factor- $\beta$  in airway epithelial cells by Mycoplasma pneumoniae* / A. Dakhama [et al.] // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2003. Vol. 29, № 3. P. 344–351.
117. *Wright, J. R. Surfactant apoprotein MR = 26,000–36,000 enhances uptake of liposomes by type-II cells* / J. R. Wright // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262, № 6. P. 2888–2894.
118. *Wright, J. R. Immunomodulatory functions of surfactant* / J. R. Wright // Physiol. Rev. 1997. Vol. 77, № 4. P. 931–962.
119. *The emerging roles of surfactant protein-A in asthma* [Electronic resource] / A. B. C. Dy [et al.] // J. Clin. Cell Immunol. 2018. Vol. 9, № 4. Article 553. Режим доступа: doi: 10.4172/2155-9899.1000553. Дата доступа: 02.11.2019.
120. *Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumoniae* / R. P. Baughman [et al.] // Am. Rev. Respir. Dis. 1993. Vol. 147. P. 653–657.
121. *Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity* / R. Ghildyal [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. 1999. Vol. 180, Issue 6. P. 2009–2013.
122. *Sun, F. Murine bronchoalveolar lavage* [Electronic resource] / F. Sun, G. Xiao, Z. Qu // Bio Protoc. 2017. Vol. 7, № 10. Article 2287. Режим доступа: doi: 10.21769/BioProtoc.2287. Дата доступа: 02.07.2020.
123. *Animal testing and its alternatives — the most important omics is economics* / L. Meigs [et al.] // Alternatives to animal experimentation. 2018. Vol. 35, № 3. P. 275–305.
124. *Kany, S. Cytokines in inflammatory disease* [Electronic resource] / S. Kany, J. T. Vollrath, B. Relja // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, № 23. Article 6008. Режим доступа: doi: 10.3390/ijms20236008. Дата доступа: 20.07.2020.
125. *Mills, P. R. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants* / P. R. Mills, R. J. Davies, J. L. Devalia // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999. Vol. 160, Suppl 1. P. 38–43.
126. *Hayden, M. S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines* / M. S. Hayden, S. Ghosh // Semin. Immunol. 2014. Vol. 26, № 3. P. 253–266.
127. *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs* / L. Chen [et al.] // Oncotarget. 2018. Vol. 9. P. 7204–7218.
128. *Molofsky, A. B. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury and inflammation* / A. B. Molofsky, A. Savage, R. M. Lockley // Immunity. 2015. Vol. 42, № 6. P. 1005–1019.
129. *Surfactant protein A is defective in abrogating inflammation in asthma* / Y. Wang [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2011. Vol. 301, № 4. P. 598–606.
130. *Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF- $\kappa$ B and IFN-regulated factor transcription factors* / P. Génin [et al.] // J. Immunol. 2000. Vol. 164, № 10. P. 5352–5361.
131. *Кулага, О. К. Коэффициент перинатальной контагиозности урогенитальных инфекций* / О. К. Кулага, С. А. Костюк // Медицинские новости. 2007. № 14. С. 92–94.
132. *A trigger enzyme in Mycoplasma pneumoniae: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression* / S. R. Schmidl [et al.] // PLoS. 2011. Vol. 9, № 7. Режим доступа: doi:10.1371/journal.ppat.1002263. Дата доступа: 17.07.2020.
133. *Горбунова, А. А. Критерии проверки гипотез об однородности дисперсий при наблюдаемых законах, отличных от нормального* / А. А. Горбунова, Б. Ю. Лемешко, С. Б. Лемешко // Материалы X международной конференции «Актуальные проблемы электронного приборостроения» АПЭП-2010. 2010. С. 36–41.
134. *Type 1 and type 2 strains of Mycoplasma pneumoniae form different biofilms* / W. Simmons [et al.] // Microbiology. 2013. Vol. 159, Pt. 4. P. 737–747.

135. Рябушкина, Н. А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н. А. Рябушкина, М. Е. Омашева, Н. Н. Галиакпаров // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 2. С. 9–26.
136. *Improving gene-expression studies from sputum: a multistep optimization of RNA isolation and qPCR protocols* / C. Paska [et al.] // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2017. Vol. 57, № 5. P. 626–628.
137. *Real-time quantitative PCR* / C. A. Heid [et al.] // Genome Res. 1996. № 6. P. 986–994.
138. *Detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction* / L. A. Campbell [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1992. Vol. 30, № 2. P. 434–439.
139. *Kornak, J. M. Sequence analysis of the gene encoding the Chlamydia pneumoniae DnaK protein homolog* / J. M. Kornak, C. C. Kuo, L. A. Campbell // Infect. Immun. 1991. Vol. 59, № 2. P. 721–725.
140. *MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design* [Electronic resource] / Z. Shen [et al.] // BMC Bioinformatics. 2010. Vol. 11. Article 143. Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com>. Дата доступа: 17.07.2020.
141. *Ozturk, A. R. A multiplex primer design algorithm for target amplification of continuous genomic regions* [Electronic resource] / A. R. Ozturk, T. Can // BMC Bioinformatics. 2017. Vol. 18. Article 306. Режим доступа: DOI 10.1186/s12859-017-1716-7. Дата доступа: 17.07.2020.
142. *Силич (Глинкина), Т. В.* Разработка и апробация технологии ПЦР в режиме реального времени для одновременной количественной детекции *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в клиническом материале от детей и подростков / Т. В. Силич (Глинкина), С. А. Костюк, О. С. Полуян // Известия НАН Беларуси. Серия медицинских наук. 2006. № 5. С. 86–88.
143. *Реакция транскрипционной амплификации как новый этап в развитии технологий клинико-лабораторного молекулярно-биологического исследования* / О. С. Полуян, С. А. Костюк, Т. В. Силич (Глинкина) // Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук. 2011. № 3. С. 119–123.
144. *Глинкина, Т. В.* Биологические механизмы, обуславливающие участие *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* в патогенезе заболеваний респираторного тракта / Т. В. Глинкина, С. А. Костюк // Новости медико-биологических наук. 2017. Т. 16, № 2. С. 88–96.
145. *Глинкина, Т. В.* Принципы этиологической микробиологической диагностики инфекций респираторного тракта, обусловленных *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, у детей и подростков / Т. В. Глинкина // Медицинский журнал. 2018. № 1. С. 8–15.
146. *Методология выявления ДНК возбудителей хламидийно-микоплазменной инфекции в мокроте* / С. А. Костюк [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2018. Т. 7, № 4. С. 497–508.
147. *Влияние Mycoplasma pneumoniae и рекомбинантного CARDS-токсина на клетки альвеолярного эпителия человека: эффекты протеина А сурфактанта на патогенные свойства микроорганизма in vitro* / Т. В. Глинкина [и др.] // Журнал Гродненского медицинского университета. 2019. Т. 17, № 2. С. 176–180.
148. *Глинкина, Т. В.* Продукция пероксида водорода и цитотоксичность клинических изолятов *Mycoplasma pneumoniae*, несущих нуклеотидные замены в гене глицерол-3-фосфат оксидазы / Т. В. Глинкина, С. А. Костюк // Новости медико-биологических наук. 2019. Т. 19, № 3. С. 40–45.
149. *Глинкина, Т. В.* Молекулярно-генетическая диагностика и особенности видовой структуры патогенной флоры при хламидийном и микоплазменном инфицировании респираторного тракта у детей / Т. В. Глинкина // Проблемы здоровья и экологии. 2019. Т. 62, № 4. С. 11–17.

150. *Hlinkina, T. V.* Correlation between nucleotide substitutions in glycerol-3-phosphate oxidase gene, the level of hydrogen peroxide production, and cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae* / T. V. Hlinkina, S. A. Kastiuk // *Cytology and Genetics*. 2020. Т. 54, № 1. С. 27–32.

151. *Глинкина, Т. В.* Биологические модели *in vitro* для изучения патогенного действия *Mycoplasma pneumoniae* / Т. В. Глинкина, С. А. Костюк // *Новости медико-биологических наук*. 2020. Т. 20, № 2. С. 49–54.

152. *Polymorphism* of the glycerol-3-phosphate oxidase gene as one of the *Mycoplasma pneumoniae* genetic features influencing the formation of pathogenicity factors / S. A. Kostiuk [et al.] // *Problems of health and ecology*. 2020. Vol. 64, № 2. P. 130–135.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Патогенные для человека микроорганизмы рода <i>Mycoplasma</i> .....	3
Список использованной литературы.....	6
РАЗДЕЛ 1. MYCOPLASMA GENITALIUM.....	7
Перечень сокращений и условных обозначений.....	7
Введение .....	8
Глава 1. Инфекция урогенитального тракта, обусловленная <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	10
1.1. Роль <i>Mycoplasma genitalium</i> в формировании воспалительных процессов урогенитального тракта .....	10
1.2. Патогенез воспалительных процессов урогенитального тракта, обусловленных <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	12
1.3. Биологические особенности микоплазм .....	13
1.3.1. Характеристика обменных процессов и строения клеток <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	13
1.3.2. Организация генома у <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	14
1.3.3. Особенности культивирования <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	16
1.4. Взаимодействие <i>Mycoplasma genitalium</i> с иммунной системой организма-хозяина .....	19
1.5. Факторы патогенности микоплазм.....	21
1.6. Генетические механизмы формирования устойчивости <i>Mycoplasma genitalium</i> к основным группам используемых антибактериальных лекарственных средств .....	24
1.7. Методы диагностики инфекций, обусловленных <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	25
Глава 2. Разработка состава питательной среды для культивирования и выявления <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	27
2.1. Разработка состава и условий использования питательной среды для культивирования и выявления <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	27
2.2. Изучение морфологических и ультраструктурных характеристик выделенных штаммов <i>Mycoplasma genitalium</i> МГ-9 и МГ-20.....	29
2.3. Определение минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных лекарственных средств для депонированных штаммов <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	31
2.4. Валидация культурального метода выявления <i>Mycoplasma genitalium</i> с применением разработанной «Питательной среды для культивирования и выявления <i>Mycoplasma genitalium</i> » .....	35

2.5. Аprobация культурального метода выявления <i>Mycoplasma genitalium</i> на клиническом материале.....	40
2.6. Изучение фенотипической устойчивости клинических изолятов <i>Mycoplasma genitalium</i> к антибактериальным лекарственным средствам .....	41
Глава 3. Изучение нуклеотидных перестроек в генах, контролирующих формирование факторов патогенности <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	44
3.1. Усовершенствование метода анализа нуклеотидных последовательностей генов <i>mg191</i> , <i>mg192</i> и <i>msrA</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	44
3.2. Анализ нуклеотидных последовательностей генов <i>mg191</i> , <i>mg192</i> и <i>msrA</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> в клинических изолятах .....	46
Глава 4. Определение генетических маркеров устойчивости <i>Mycoplasma genitalium</i> к антибактериальным лекарственным средствам .....	48
4.1. Усовершенствование метода одновременного выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов и макролидов .....	48
4.2. Расчет показателей диагностической значимости теста одновременного выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов и макролидов .....	52
4.3. Аprobация метода одновременного выявления генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов и макролидов .....	54
Глава 5. Оценка состояния биохимических и иммунологических процессов в урогенитальном тракте беременных при инфицировании <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	58
5.1. Оценка показателей биохимических лабораторных тестов, отражающих метаболические изменения в урогенитальном тракте беременных при инфицировании <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	58
5.2. Определение про- и противовоспалительных цитокинов в слизи урогенитального тракта беременных при инфицировании <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	66
Список использованных источников (Раздел 1) .....	78
РАЗДЕЛ 2. MYCOPLASMA PNEUMONIAE .....	87
Перечень сокращений и условных обозначений.....	87
Введение .....	88
Глава 1. Оценка патогенного потенциала <i>Mycoplasma pneumoniae</i> на биологических моделях.....	91
1.1. Характеристика <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	91

1.2. Биологические механизмы, обуславливающие участие <i>Mycoplasma pneumoniae</i> в патогенезе заболеваний респираторного тракта.....	92
1.2.1. Адгезия к клеткам респираторного эпителия .....	92
1.2.2. Цитопатическое действие CARDS-токсина микроорганизма .....	93
1.2.3. Активация синтеза провоспалительных цитокинов при инфицировании <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	94
1.2.4. Оксидативный стресс, инициируемый возбудителем.....	95
1.3. Участие <i>Mycoplasma pneumoniae</i> в патогенезе воспаления, ассоциированного с бронхиальной астмой.....	96
1.3.1. Распространенность возбудителя при бронхиальной астме.....	96
1.3.2. Участие микроорганизма и его CARDS-токсина в патогенезе аллергического воспаления в респираторном тракте.....	97
1.4. Современные подходы к моделированию инфекции, обусловленной <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	100
1.5. Принципы диагностики респираторного микоплазмоза .....	102
1.6. Проблема преаналитического этапа и выбора оптимальной системы пробоподготовки при использовании метода ПЦР для выявления ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	104
Глава 2. Создание биологических клеточных моделей инфекции, обусловленной <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	106
2.1. Определение оптимальных условий для инфицирования A549 клеток <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	106
2.2. Оценка концентраций rCARDS-токсина для активации A549 клеток .....	112
2.3. Моделирование взаимодействия <i>Mycoplasma pneumoniae</i> и rCARDS-токсина с клетками респираторного эпителия в присутствии протеина А сурфактанта легких человека.....	115
Глава 3. Применение новых биологических моделей <i>in vitro</i> для изучения патогенного действия <i>Mycoplasma pneumoniae</i> на клетки респираторного эпителия человека.....	118
3.1. Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, RANTES и продукции ИЛ-33 A549 клетками при инфицировании <i>M. pneumoniae</i> и действии rCARDS-токсина .....	118
3.2. Особенности проявления провоспалительного действия возбудителя и rCARDS-токсина в отношении клеток респираторного эпителия человека в присутствии SP-A.....	123
Глава 4. Изучение вариабельности нуклеотидной последовательности гена глицерол-3-фосфат оксидазы и цитотоксичности <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	129

4.1. Выявление нуклеотидных замен в гене глицерол-3-фосфат оксидазы микроорганизма.....	129
4.2. Изучение цитотоксичности патогена in vitro .....	134
Глава 5. Оптимизация методики выделения ДНК и идентификация <i>Mycoplasma pneumoniae</i> в мокроте с использованием полимеразной цепной реакции .....	141
5.1. Разработка условий применения бромистого цетилтриметиламмония для выделения ДНК из мокроты .....	141
5.2. Сравнение методов экстракции ДНК из мокроты .....	146
5.3. Оценка пригодности выделенной из мокроты ДНК для выявления <i>Mycoplasma pneumoniae</i> методом полимеразной цепной реакции .....	148
5.4. Усовершенствование методики выявления <i>Mycoplasma pneumoniae</i> в ассоциации с <i>Chlamydia pneumoniae</i> методом полимеразной цепной реакции .....	150
5.5. Определение концентрации ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> в мокроте при моно- и смешанных инфекциях .....	156
Список использованных источников (Раздел 2) .....	159

Научное издание

**Костюк** Светалана Андреевна  
**Руденкова** Татьяна Владимировна  
**Глинкина** Татьяна Владимировна

**ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА *Mycoplasma pneumoniae*  
И *Mycoplasma genitalium*, ОПТИМИЗАЦИЯ  
ИХ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

Монография

Ответственная за выпуск С. А. Костюк  
Компьютерная вёрстка Н. М. Федорцовой

Подписано в печать \_\_\_\_\_, Формат 60×84/16. Бумага офсетная.  
Печать цифровая. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 10,0. Уч.-изд. л. 10,1. Тираж \_\_\_\_\_ экз. Заказ \_\_\_\_\_.

Издатель: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/187 от 24.11.2023.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.

Изготовитель: общество с ограниченной ответственностью  
«Производственная фирма «Интермикро».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 2/125 от 02.05.2014.  
Ул. Авиаторов, 21, пом. 33, 212039, Могилев.