

8. Dedov II, Mokrysheva NG, Mirnaya SS, Rostomyan LG, Pigarova EA, Rozhinskaya LA. Epidemiologiya pervichnogo giperparatireoza v Rossii (pervye rezul'taty po baze dannyh fgU ENC). Klinicheskaya endokrinologiya. 2011;3: 3-10.

9. Golohvastov NN, Emmanuel VL, Rybakova GV, Myagkov LV. Skrinig kal'ciya krovi stacionarnykh bol'nykh dlya vyyavleniya pervichnogo giperparatireoza. Sovremennye aspekty hirurgicheskoy endokrinologii. Saransk. 1997: 82-85.

10. Bruckaya-Stempkovskaya EV, Shepel'kevich AP, Kostin GM, Chertko EN. Rasprostranennost' giperkal'ciemii sredi vzroslogo naseleniya goroda Minska. Lechebnoye delo. 2017;2(54): 35-40.

11. Shepel'kevich AP, Bruckaya-Stempkovskaya EV, Pavlovich TP, Gotina YA, Losik MV, Burko II. Rezul'taty sploshnogo issledovaniya giperkal'ciemii u vzroslogo naseleniya goroda Minska. Medicinskij al'manah. 2018; noyabr':6(57): 159-162.

12. Silva IS. Cancer epidemiology: principles and methods. In: Muñoz ND, Parkin M, Estève J, Boffetta P, editors. Lyon, PA: IARC Press; 1999. p. 130-1.

13. Yeh MW, Ituarte PH, Zhou HC, Nishimoto S, Liu IL, Harrari A, Haigh PI, Adams AL. Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013;98:1122-29. doi:10.1210/jc.2012-4022.

14. Yu N, Donnan PT, Murphy MJ, Leese GP. Epidemiology of primary hyperparathyroidism in Tayside, Scotland, UK. Clin. Endocrinol. 2009;71:485-93. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03520.x.

Адрес для корреспонденции

246040, Республика Беларусь,
г. Гомель, ул. Ильича, 290,
ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»,
Лаборатория эпидемиологии,
Тел. моб.: +375 29 6596032,
e-mail: veyalkin@mail.ru
Вейалкин Илья Владимирович

Сведения об авторах

Вейалкин И.В. к.б.н., доцент, заведующий лабораторией эпидемиологии ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Рожко А.В., д.м.н., доцент, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Величко Александр Владимирович, к.м.н., доцент, заведующий хирургическим отделением (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Ярец Юлия Игоревна, к.м.н., доцент, заведующий клинико-диагностической лабораторией ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Address for correspondence

246040, The Republic of Belarus,
Gomel, Ilycha Str., 290,
Republican Scientific and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology,
Tel. mobile: +375 29 6596032,
e-mail: veyalkin@mail.ru
Ilya Veyalkin

Information about the authors

Ilya Veyalkin, PhD, Ass. Professor, Head of Laboratory of Epidemiology, Republican Scientific and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology.

Aliaksandr Rozhko, PhD, MD, Director of Republican Scientific and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology.

Vialichka Aliaksandr, PhD, Head of Surgical Department, Republican Scientific and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology

Yarets Yuliya, MD, PhD, Head of Clinical Laboratory Medicine Department, Republican Scientific and Practical Center of Radiation Medicine and Human Ecology.

Поступила 14.05.2019

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.24-036.12-036.65-078:575

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ОБОСТРЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Д. Ю. Рузанов¹, Е. В. Воропаев¹, В. А. Воробей¹, С. В. Миронова², О. В. Осипкина¹,
Л. Н. Семенова², И. В. Буйневич¹, А. А. Зятков¹, Н. Н. Рубаник¹, Н. А. Бонда¹

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

²Учреждение здравоохранения

«Гомельская областная туберкулезная клиническая больница»

г. Гомель, Республика Беларусь

Цель: изучить возможности методики определения гена 16S рРНК бактерий в определении бактериального спектра обострения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) с использованием защищенного забора материала.

Материалы и методы. Проспективно оценены 68 госпитализированных пациентов с обострением ХОБЛ. Использовалось молекулярно-генетическое определение гена 16S рРНК бактерий и культуральные микробиологические методики из материала бронхиального дерева, полученного при защищенной браш-биопсии, и рутинные микробиологические исследования мокроты.

Результаты. Бактериальные агенты были выявлены в 91,2 % случаев острого обострения ХОБЛ. *Pseudomonas aeruginosa* выявлялась в биопсийном материале в 1,8 раза чаще, чем при использовании рутинных методик. Определены паттерны течения ХОБЛ с частыми обострениями, инфекционного обострения и псевдомонадной этиологии обострения.

Заключение. Использование методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК позволяет верифицировать бактериальный спектр обострения ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь лёгких, острое обострение, 16S рРНК, метабеном.

Objective: To study the possibilities of the method of determining the 16S rRNA gene of bacteria in the determination of the bacterial spectrum of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) using a protected material sampling

Materials and Methods: 68 Hospitalized patients with acute exacerbation of COPD were prospectively evaluated. Molecular genetic determination of the 16S rRNA gene of bacteria and cultural microbiological techniques from sputum and a bronchial tree material obtained using a protected brush biopsy were used.

Results: Bacterial agents were detected in 91,2 % of cases of acute exacerbation of COPD. *Pseudomonas aeruginosa* was detected in the biopsy material 1.8 times more often than with the use of routine methods. Patterns of COPD with frequent exacerbations, infectious exacerbations and *Pseudomonas* etiology of exacerbations were determined.

Conclusion: Using the method of molecular-genetic determination of the 16S rRNA gene allows to verify the bacterial spectrum of acute exacerbation of COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, acute exacerbation, 16S rRNA, metagenome.

D. Yu. Ruzanov, E. V. Voropaev, V. A. Vorobey, S. V. Mironova, O. V. Osipkina, L. N. Semenova, I. V. Buynovich, A. A. Zyatkov, N. N. Rubanik, N. A. Bonda
Etiological verification of

Etiological verification of infectious exacerbation of chronic obstructive lung disease using molecular genetics methods

Problemy zdorov'ya i ekologii. 2019 Apr-Jun; Vol 60 (2): 94–102

Введение

Обострение хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) определяется как внезапное утяжеление и одномоментное нарастание симптомов у пациента, требующее медицинского вмешательства и интенсификации терапии. Диагностика инфекционного характера обострения ХОБЛ проводится в основном на основании симптомов пациента. Руководства Global initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) фокусируются на симптомах, которые включают увеличение одышки, гнойности и/или объема мокроты [1]. Спирометрия не рекомендуется пациентам с инфекционным обострением ХОБЛ. Назначение антибактериальных лекарственных средств (АБЛС) проводится, как правило, эмпирически [2, 3, 4]. Инфекционные обострения могут быть вызваны активным размножением колонизированных бактерий или инфекцией дыхательных путей новыми штаммами микроорганизмов. Поскольку пациенты с ХОБЛ, вероятно, имеют хроническую бактериальную колонизацию, микробиологические исследования мокроты трудно интерпретировать, если только предшествующие данные культуры недоступны для сравнения. Поэтому существует мнение, что рутинное микробиологическое исследование мокроты не информативно [5]. Методы высокопроизводительного секвенирования произвели революцию в исследованиях микробиоты легких, что привело к пониманию того, что здоровые легкие не являются стерильными. Несколько исследований микробиоты здоровых и пациентов с ХОБЛ с использованием

бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и мокроты были описаны с использованием молекулярных методов [6]. В этих исследованиях использовались образцы, полученные через верхние дыхательные пути, такие как индуцированная мокрота, бронхоальвеолярный лаваж и эндотрахеальный аспират. Многие из этих исследований идентифицировали оральные бактерии в образцах легких нижних дыхательных путей. Микробиота легких была почти неотличима от микробиоты полости рта, но авторы не смогли определить, были ли их результаты следствием аспирации и загрязнения бронхоскопа во время введения через рот.

У пациентов с обострением ХОБЛ, которые отвечают критериям антибактериальной терапии, необходимо учитывать спектр традиционных респираторных патогенов, таких как *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* и *Streptococcus pneumoniae* [7]. Вероятность атипичных бактерий обычно не рассматривается. Антибиотики, рекомендованные GOLD, включают амоксициллин/клавуланат, макролид или доксициклин, если не требуется активность в отношении устойчивых организмов, основанная на клинических и анамнестических факторах. В большинстве клинических рекомендаций по антибиотикотерапии обострений ХОБЛ амоксициллин/клавуланат заслуженно рассматривается как АБЛС стартовой терапии. К его достоинствам относится высокая биодоступность при приеме внутрь, накопление в тканях и жидкостях организма, широкий спектр антибактериальной активности по отношению к грамотрицательным возбудителям, способным

к продукции β -лактамаз (*H. influenzae*, *M. catarrhalis*), некоторым энтеробактериям (*Klebsiella pneumoniae* и др.), метициллиночувствительным *Staphylococcus aureus* и неспорообразующим анаэробам. У пациентов, использовавших антибиотики последние 30 дней, или при наличии рецидивирующих респираторных инфекций показаны другие классы антибиотиков и/или идентификация микроорганизмов с проведением теста лекарственной чувствительности [8, 9]. Однако в июле 2016 года FDA заявило о недостаточно изученной безопасности класса фторхинолонов с позиции отдаленных необратимых нежелательных лекарственных реакций, таких как эффекты со стороны центральной нервной системы, периферическая нейропатия и тендинит или разрыв сухожилий, суициды и др. [10]. Поэтому в рекомендациях Американского Торакального Общества фторхинолоны не рекомендуются для лечения острых обострений ХОБЛ, если только у пациента нет тяжелой аллергии на бета-лактамы и отсутствуют другие доступные варианты лечения [11]. В Республике Беларусь фторхинолоны широко используются в лечении респираторной патологии, в том числе неосложненной, хотя возможность нежелательных реакций, вероятно, недооценена. Но и высокую активность по отношению к *S. pneumoniae*, включая мультирезистентные штаммы, респираторных фторхинолонов (левофлоксацин, моксифлоксацин, гатифлоксацин) нельзя сбрасывать со счетов. При этом респираторные фторхинолоны сохраняют высокую активность и в отношении грамотрицательных микроорганизмов (*H. influenzae* и *M. catarrhalis*), и внутриклеточных патогенов.

Важным фактором этиологической терапии ХОБЛ является верификация вероятного возбудителя и определение лекарственной чувствительности, однако ряд факторов сдерживают использование культуральных методов выявления бактериального триггера инфекционного обострения ХОБЛ. Это длительность и низкая чувствительность проводимого исследования. В

этой связи представляется актуальным использование современных молекулярно-генетических методов, воспроизводимых в рутинной лабораторной и клинической практике.

Целью исследования

Изучить возможность методики определения гена 16S рРНК бактерий в определении бактериального спектра острого обострения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) с использованием защищенного забора материала.

Материалы и методы

Проспективно оценены пациенты с диагнозом: «ХОБЛ, обострение», госпитализированные в пульмонологические отделения Гомельской областной туберкулезной клинической больницы (ГОТКБ) с января по ноябрь 2018 года и давших согласие на включение в исследование с использованием молекулярно-генетических исследований. ХОБЛ была диагностирована в соответствии с руководящими принципами Глобальной инициативы по обструктивным заболеваниям легких (GOLD). Обострение ХОБЛ предполагалось, если пациент имел по крайней мере два из трех симптомов: (а) увеличение одышки, (б) увеличение объема мокроты и (в) увеличение гнойности мокроты. Письменное информированное согласие было получено от всех участников исследования. Исследование одобрено комитетом по этике.

Пациенты не включались в исследование, если получили антибиотик в течение последних 48 часов до госпитализации; у них были выявлены ограниченные затемнения на рентгенограмме грудной клетки; обнаружены злокачественные новообразования; они длительно использовали стероиды (> 5 мг преднизолона или эквивалент в день более 3 месяцев). Пациенты были включены в исследование только один раз, даже если они повторно госпитализировались в течение периода исследования. Всего в исследование включено 68 пациентов. Основные характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Основные характеристики пациентов, госпитализированных с обострением ХОБЛ и включенных в исследование

Характеристики	Всего (n = 68), %
Средний возраст (лет)	66,4
Мужской пол, n (%)	59 (86,8 %)
Статус курения, n (%)	
Некурящий	7 (10,3 %)
Бывший курильщик	24 (35,3 %)
Курящий	37 (54,4 %)
Средняя интенсивность курения (пачко-лет)	36,1
Индекс массы тела	22,8
Число обострений за последний год	2,6
Использование кислорода амбулаторно, n (%)	10 (14,7 %)
Использование ИГКС, n (%)	18 (26,5 %)
Использование ДДБА, n (%)	16 (23,5 %)

Окончание таблицы 1

Характеристики	Всего (n = 68), %
Использование ДДМА, n (%)	5 (7,4 %)
Использование системных КС регулярно, n (%)	12 (17,6 %)
ОФВ1, средний (% от должного)	51,6
Соотношение ОФВ1/ФЖЕЛ	46,4
РаО2 (%)	87,5
Инфекционное обострение, n (%)	39 (57,4 %)
Стадия по GOLD;	
легкая (1), n (%)	1 (1,5 %)
среднетяжелая (2), n (%)	32 (47,1 %)
тяжелая (3), n (%)	27 (39,7 %)
очень тяжелая (4), n (%)	8 (11,8 %)
Перекрест астма/ХОБЛ, n (%)	12 (17,6 %)

Примечание: ИГКС — ингаляционные кортикостероиды; КС — кортикостероиды; ДДБА — длительно-действующие бета-агонисты; ДДМА — длительно-действующие мускариновые агонисты

Контрольные группы сформированы из пациентов, которые также были госпитализированы в пульмонологические отделения ГОТКБ с января по ноябрь 2018 года с диагнозом: «ХОБЛ, обострение». Материалом для исследования служила мокрота пациента, а в качестве рутинного микробиологического исследования – посев на питательный агар в лаборатории ГОТКБ (63 пациента). В 37 случаях у одного и того же пациента использовались методики защищенного забора материала и рутинного микробиологического исследования мокроты. Также спектр микробиома легких пациентов с ХОБЛ из группы исследования сравнивался с группой пациентов (8 дифференциально-диагностических случаев) без выявленной бронхолегочной патологии.

Для взятия клинического материала из бронхиального дерева с целью молекулярно-генетических исследований был использован разработанный алгоритм защищенной щеточной браш-биопсии. Алгоритм направлен на предотвращение контаминации микрофлорой из ротовой полости и верхних дыхательных путей. В качестве биоматериала для выделения ДНК использовали соскоб слизистой оболочки бронха пациентов. Браш-биоптаты вместе с фрагментом цитощетки, с помощью которой была выполнена биопсия, помещали в стерильную транспортную пробирку, содержащую транспортную среду.

Для изучения метагенома нижних дыхательных путей использована разработанная методика молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий в соскобах слизистой оболочки бронхов пациентов с обострением ХОБЛ.

Выделение ДНК проводили с использованием готовых коммерческих наборов, позволяющих выделять ДНК из небольшого количе-

ства образца. Для определения качества полученной ДНК проводили спектрофотометрический анализ. Для дальнейшего анализа использовали образцы, соотношение экстинкций A260/A280 которых составляло не ниже 1,85. В качестве контрольных образцов использовали паспортизованные чистые бактериальные культуры (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Рестрикционный анализ проводили с применением коммерческой рестриктазы согласно инструкции производителя. Детекцию продуктов ПЦР и рестрикционных фрагментов проводили с помощью горизонтального гель-электрофореза. Для окрашивания применяли раствор бромистого этидия. Для визуализации полученных результатов использовали видеосистему фирмы «Bio-Rad» (США) GelDocXR, для переноса изображения на компьютер и регистрации протоколов использовали программу «QuantiOne» той же фирмы. Для выполнения данного исследования в структуру прямого праймера был введен флуоресцентный краситель FAM, а в структуру обратного – HEX. Продукты ПЦР (ампликоны) обрабатывали рестриктазой MspI согласно инструкции производителя. На следующем этапе проводили фрагментный анализ с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 фирмы «Applied Biosystems» (США), используя реагенты той же фирмы.

Анализ полученных результатов проводили при помощи программного пакета Sequencing Analysis Software 5.1.1 («Applied Biosystems», США), CLC Sequence Viewer 6.5.4. Полученные данные о нуклеотидной последовательности в формате FASTA были использованы для поиска с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Учитывая, что культуральное исследование является «золотым» микробиологическим

стандартом, у 39 пациентов пробы, полученные из браш-биоптатов или промывных вод бронхов, засеивали на питательные среды с кровяным агаром, средой желточно-солевого агара, средой Эндо, средой Сабуро. С целью обнаружения анаэробных микроорганизмов производился посев на чашку Петри с анаэробным агаром и помещался в контейнер с газогенерирующим пакетом Genbag anaer (bioMérieux, Франция). Оставшийся материал использовался для посева на среду «обогащения» (тиогликолевая среда). Инкубация посевов проводилась при температуре 35–37 °С и 5 % содержании CO₂ (CO₂-инкубатор Nuaire NU-4950E, США) в течение 24–48 часов, в анаэробных условиях - в течение 72 часов.

Результаты и обсуждение

Бактериальные агенты были выявлены в 91,2 % случаев (62 пациента) при использовании методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий из материала, полученного при защищенной браш-биопсии; в 66,7 % — при прицельном микробиологическом исследовании на питательных средах с кровяным агаром, средой желточно-

солевого агара, средой Эндо, средой Сабуро. Для сравнения: бактериальные возбудители, выявленные из мокроты без использования методик защищенного забора материала, с использованием рутинных культуральных методик были обнаружены в 46,0 % случаев (29 пациентов), при этом спектр возбудителей в 55,2 % случаев существенно отличался.

В бронхиальном дереве было выделено 26 различных видов микроорганизмов, которые, по-видимому, представляют только часть метагенома нижних дыхательных путей (бронхов). Секвенирование по Сэнгеру позволило, как правило, определить один род микроорганизма в случаях гетерогенной матрицы. Использование метода фрагментного анализа позволяет определить более широкий спектр родов микроорганизмов в метагеноме нижних дыхательных путей. На рисунке 1 представлена частота встречаемости различных родов микроорганизмов, выявленных у пациентов с обострением ХОБЛ с использованием методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий из материала, полученного при защищенной браш-биопсии.

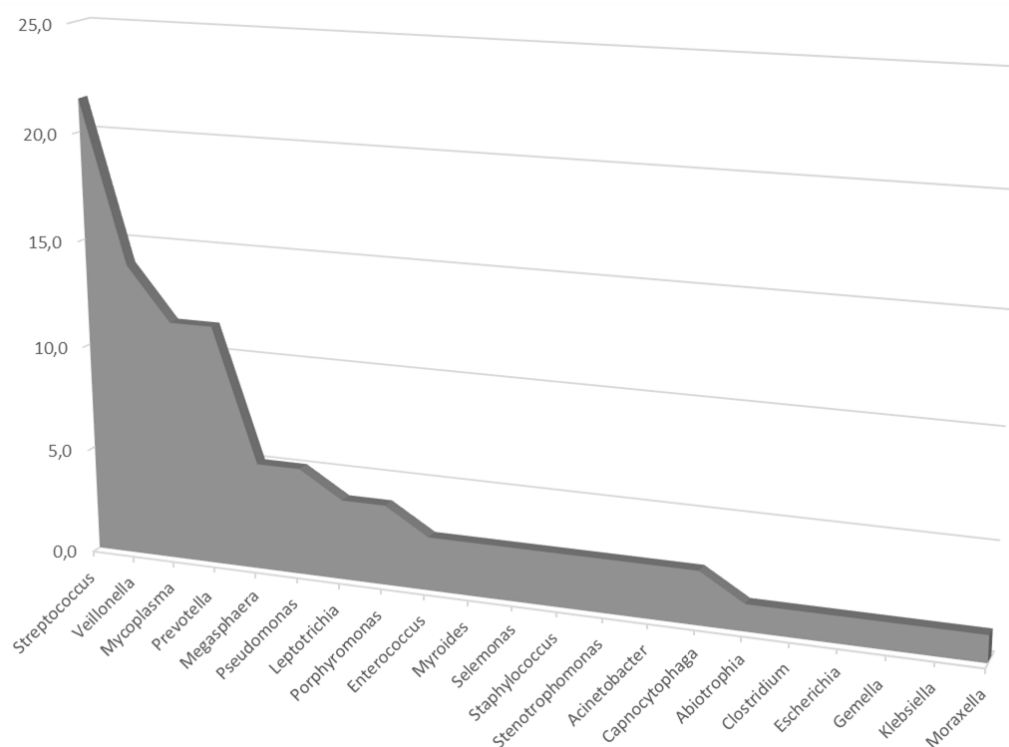


Рисунок 1 — Преобладающие роды микроорганизмов в микробиоте бронхального дерева пациентов с ХОБЛ без учета клинического течения и факторов риска

В 39 случаях пробы, полученные из браш-биоптатов или промывных вод бронхов, засеивали также на питательные среды с кровяным агаром, средой желточно-солевого агара, средой Эндо, средой Сабуро. В 57,4 % случаев

наблюдались признаки инфекционного обострения. В результате бактериальные возбудители были выявлены в 32 (82,1 %) случаях. Результаты микробиологических исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Результаты микробиологических исследований материала, полученного при защищенной браш-биопсии от пациентов с обострением ХОБЛ

Микроорганизм	%
Не выявлен возбудитель	17,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	21,9
<i>Acinetobacter spp.</i>	12,5
Другие возбудители	15,6
Выявлено два и более возбудителя	28,1

Наиболее частыми выявленными патогенами были *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* Более редко выявлялись в диагностических титрах *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus faecium*, *Fusobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus lentus* и *Escherichia coli*. В низких диагностических титрах выявлено 11 различных видов организмов. У 9 пациентов выделено два и более патогенных возбудителя.

У 1 пациента выделялось от 1 до 8 микроорганизмов (геномов микроорганизмов). Множественные комбинации выявлялись, как правило,

молекулярно-генетическими методами. Примечательно, что результаты детекции возбудителей при заборе материала промывными водами бронхов и защищенной браш-биопсией отличались (*Pseudomonas aeruginosa* выявлялась методикой молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК в биопсийном материале в 1,8 раза чаще).

В таблице 3 представлены наиболее часто встречаемые бактерии в бронхиальном дереве пациентов с ХОБЛ по результатам молекулярно-генетических и культуральных микробиологических исследований с использованием защищенных методик забора материала с ранжированием по частоте встречаемости.

Таблица 3 — Наиболее часто встречаемые бактерии в бронхиальном дереве пациентов с ХОБЛ

Пациенты с ХОБЛ с редкими обострениями (не более одного в год), n = 14	Пациенты с ХОБЛ с частыми обострениями (два и более в год), n = 22	Пациенты с легким и среднетяжелым обострением ХОБЛ, n = 15	Пациенты с тяжелым обострением ХОБЛ, n = 17
<i>Veilonella dispar</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Parvularculaceae bacterium</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Veillonella sp.</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Seimonas sp.</i> <i>Abiotrophia sp.</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Clostridium merdae</i> <i>Leptotrichia sp.</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Mycoplasma amphoriforme</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Prevotella tanneriae</i> <i>Leptotrichia buccalis</i> <i>Eubacterium sulci</i> <i>Staphylococcus lentus</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Gemella haemolysans</i> <i>Leptotrichia sp.</i> <i>Escherichia sp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Myroides pelagicus</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Veillonella parvula</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nanceiensis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Mycoplasma sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterobacteriaceae sp.</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Myroides odoratimimus</i>

Как видно из данных таблицы 3, для пациентов с редкими обострениями характерно существенно более выраженное разнообразие микроорганизмов: 23 вида микроорганизмов у пациентов с редкими обострениями против 11 штаммов от пациентов с частыми обострениями и 8 — с тяжелым обострением.

Мы сравнили характеристики пациентов, у которых были обнаружены потенциально-патогенные микроорганизмы (ППМ), в сравнении с не-ППМ. Так, инфекционный характер воспаления с выделением бактериального патогена коррелировал с возрастом ($p < 0,02$), обострениями два и более раз в год ($p < 0,001$), использованием системных кортикостероидов ($p < 0,005$) и снижением ОФВ1 ниже 50 % от должного ($p < 0,02$). Не выявлено существен-

ной разницы в статусе курения и использования ингаляционных стероидов.

Также проанализированы характеристики пациентов, у которых были обнаружены псевдомонадные и непсевдомонадные микроорганизмы. Полученные данные с указанием стандартного отклонения (SD) приведены в таблице 4.

Выделение *P. aeruginosa* значительно чаще встречается у пациентов с частыми обострениями, которым требуется госпитализация, а также использующих системные стероиды, по сравнению с другими патогенами.

Для кластерного анализа пациенты разделены по течению ХОБЛ (в качестве основного критерия выбрана частота обострений в год) и степени тяжести обострения (рисунок 2).

Таблица 4 — Характеристики пациента с псевдомонадной и непсевдомонадной этиологией инфекционного обострения ХОБЛ

Клинические данные	Всего	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 13)	Непсевдомонадные микроорганизмы (n = 31)
Средний возраст, лет, (SD)	66,4 (5,2)	69,4 (4,7)	64,1 (4,6)
Число обострений за последний год (SD)	2,6 (0,7)	3,2 (0,2)	1,1 (0,2)
Использование системных стероидов регулярно, % (SD)	17,6	61,5	12,9
ОФВ1, средний	1,5 (0,4)	1,02 (0,2)	1,61 (0,3)

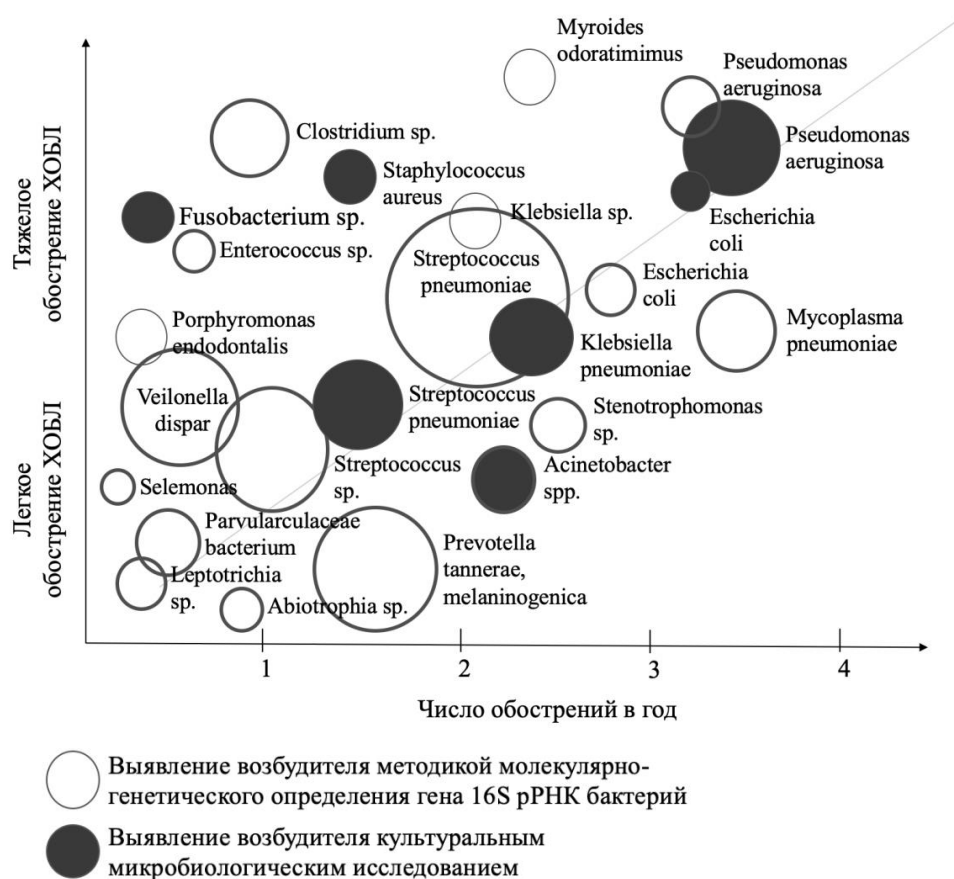


Рисунок 2 — Кластерный анализ частоты встречаемости различных микроорганизмов в зависимости от вариантов течения ХОБЛ

Данные кластерного анализа подтверждают сокращение родового разнообразия микробиоты трахео-бронхиального дерева пациентов с частыми и тяжелыми обострениями ХОБЛ. Причины данного явления не до конца понятны. Возможно, частое использование антибиотиков у пациентов с частыми обострениями приводит к гибели колонистов бронхиального дерева с сокращением родового разнообразия и более частым обнаружением респираторных патогенов. Маркерами частых и тяжелых обострений по данным нашего исследования являются: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, обычно не культивируемая, *Mycoplasma pneumoniae* (о роли которой в обострении ХОБЛ имеются противоречивые мнения) и *Myroides odoratimimus*.

Изучение чувствительности к антибиотикам выделенных изолятов продемонстрировало устойчивость хотя бы к одному беталактаму в 29 (61,9 %) случаях. Анализ структуры чувствительности различных антибиотиков к *Pseudomonas aeruginosa* показал, что большинство изолятов демонстрируют устойчивость к аминопенициллинам, макролидам и цефалоспорином 4-го поколения, как к часто используемым антибиотикам у этих пациентов. Ципрофлоксацин и пиперацillin/тазобактам эффективны в 79,4 % изолятов, за которыми следуют аминогликозиды — в 76 %. Данные АБЛС, по-видимому, являются наиболее подходящими для большинства микроорганизмов, выделенных от госпитализированных пациентов с выявленными факторами индивидуального риска псевдомонадной этиологии инфекционного обострения ХОБЛ. Существенной проблемой оказалась антибиотикорезистентность *Acinetobacter*, который способен быстро формировать резистентность к различным классам антибактериальных препаратов. Выделенные культуры *A. baumannii* были резистентны к цефепиму (100 %), цефтазидиму (75 %). Высокий уровень резистентности был выявлен и к другим препаратам: к ципрофлоксацину (75 %), гентамицину (100 %), амикацину (50 %). Чувствительны данные микроорганизмы были только к имипенему (100 %).

Заключение

При использовании методики молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий из материала, полученного при защищенной браш-биопсии, бактериальные агенты были выявлены в 91,2 % случаев и в 46 % случаев при использовании рутинных микробиологических исследований, при этом спектр возбудителей в 55,2 % случаев существенно отличался. *Pseudomonas aeruginosa* выявлялась методикой молекулярно-генетического определения гена 16S рРНК бактерий в биопсийном материале в 1,8 раза чаще.

Инфекционный характер воспаления с выделением бактериального патогена коррелировал с возрастом ($p < 0,02$), обострениями два и более раз в год ($p < 0,001$), использованием системных кортикостероидов ($p < 0,005$) и снижением ОФВ1 ниже 50 % от должного ($p < 0,02$). Для пациентов с редкими обострениями характерно существенно более выраженное разнообразие микроорганизмов (определение гена 16S рРНК бактерий): 23 вида микроорганизмов у пациентов с редкими обострениями против 11 штаммов от пациента с частыми обострениями или 8 — с тяжелым обострением. Кластерный анализ продемонстрировал, что данные, полученные молекулярно-генетическими методами, совпадают с результатами культуральных микробиологических методов. Антибиотикотерапия оказывает влияние на микробиом (уменьшая его разнообразие) респираторного тракта, что, возможно, связано с частотой и тяжестью обострения ХОБЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017 // [Electronic resource]. – Mode of access: – <http://goldcopd.org/>. – Data of access: 28.05.2018.
2. Авдеев СН. Современные подходы к антибактериальной терапии обострений хронической обструктивной болезни легких. Пульмонология. 2012; 3: 109–114.
3. Wang Jin-Xiang, Zhang Shu-Ming, Li Xiao-Hui, Yao Zhang, Zhen-Yang Xu, Bin Cao. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with low serum procalcitonin values do not benefit from antibiotic treatment: a prospective randomized controlled trial. International Journal of Infectious Diseases. 2016; 48: 40–45. doi.org/10.1016/j.ijid.2016.04.024
4. Lin C, Pang Q. Meta-analysis and systematic review of procalcitonin-guided treatment in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. The Clinical Respiratory Journal. 2016. DOI:10.1111/crj.12519.
5. Corti C, Fally M, Fabricius-Bjerre A, Mortensen K, Jensen BN, Andreassen HF, Porsbjerg C, Knudsen JD, Jensen JU. Point-of-care procalcitonin test to reduce antibiotic exposure in patients hospitalized with acute exacerbation of COPD. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2016; 11: 1381–1389. doi: 10.2147/COPD.S104051.
6. Pavord ID, Jones PW, Burgel PR, Rabe KF. Exacerbations of COPD. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2016; 11 (Spec Iss): 21–30. doi.org/10.2147/COPD.S85978
7. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184:957–963.
8. Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of Sputum Color to Nature and Outpatient Management of Acute Exacerbations of COPD. CHEST. 2000; 117(6): 1638–1645. DOI: 10.1378/chest.117.6.1638
9. Vollenweider DJ, Jarrett H, Steurer-Stey CA, Garcia-Aymerich J, Puhan MA. Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Cochrane Database of Systematic Reviews 2012, Issue 12. Art. No.: CD 010257. doi: 10.1002/14651858.CD010257.
10. Miravittles M, Moragas A, Hernandez S, Bayona C, Llor C. Is it possible to identify exacerbations of mild to moderate COPD that do not require antibiotic treatment? CHEST. 2013; 144(5): 1571–1577. doi: 10.1378/chest.13-0518.
11. U.S. Food & Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA updates warnings for oral and injectable fluoroquinolone antibiotics due to disabling side effects. Updated 9 August 2016. Retrieved from <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm511530.htm>. Accessed 29 November 2016.

REFERENCES

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017 // [Electronic resource]. – Mode of access: – <http://goldcopd.org/>. – Data of access: 28.05.2018.
2. Avdeev SN. Sovremennyye podhody k antibakterial'noi terapii obostrenii khronicheskoi obstruktivnoi bolezni legkikh. Pul'monologiya. 2012; 3: 109–114.
3. Wang Jin-Xiang, Zhang Shu-Ming, Li Xiao-Hui, Zhang Yao, Zhen-Yang Xu, Bin Cao. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with low serum procalcitonin values do not benefit from antibiotic treatment: a prospective randomized controlled trial. International Journal of Infectious Diseases. 2016; 48: 40–45. doi.org/10.1016/j.ijid.2016.04.024.
4. Lin C, Pang Q. Meta-analysis and systematic review of procalcitonin-guided treatment in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. The Clinical Respiratory Journal. 2016. DOI:10.1111/crj.12519.
5. Corti C, Fally M, Fabricius-Bjerre A, Mortensen K, Jensen BN, Andreassen HF, Porsbjerg C, Knudsen JD, Jensen JU. Point-of-care procalcitonin test to reduce antibiotic exposure in patients hospitalized with acute exacerbation of COPD. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2016; 11: 1381–1389. doi: 10.2147/COPD.S104051.
6. Pavord ID, Jones PW, Burgel PR, Rabe KF. Exacerbations of COPD. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2016; 11 (Spec Iss): 21–30. doi.org/10.2147/COPD.S85978
7. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184:957–963.
8. Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of Sputum Color to Nature and Outpatient Management of Acute Exacerbations of COPD. CHEST. 2000; 117(6): 1638–1645. DOI: 10.1378/chest.117.6.1638
9. Vollenweider DJ, Jarrett H, Steurer-Stey CA, Garcia-Aymerich J, Puhan MA. Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Cochrane Database of Systematic Reviews 2012, Issue 12. Art. No.: CD010257. doi: 10.1002/14651858.CD010257.
10. Miravittles M, Moragas A, Hernandez S, Bayona C, Llor C. Is it possible to identify exacerbations of mild to moderate COPD that do not require antibiotic treatment? CHEST. 2013; 144(5): 1571–1577. doi: 10.1378/chest.13-0518.
- U.S. Food & Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA updates warnings for oral and injectable fluoroquinolone antibiotics due to disabling side effects. Updated 9 August 2016. Retrieved from <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm511530.htm>. Accessed 29 November 2016.

Адрес для корреспонденции

246000, Республика Беларусь,
г. Гомель, ул. Ланге, 5,
УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
кафедра фтизиопульмонологии
e-mail: druzanoff@mail.ru
Рузанов Дмитрий Юрьевич

Сведения об авторах

Рузанов Дмитрий Юрьевич, к.м.н., доцент, проректор по лечебной работе УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Воропаев Евгений Викторович, к.м.н., доцент, проректор по научной работе УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Воробей Виктория Александровна, ассистент кафедры фтизиопульмонологии УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Миронова Светлана Валерьевна, врач эндоскопического отделения УЗ «Гомельская областная туберкулезная клиническая больница».

Осипкина Ольга Викторовна, заведующий НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Семенова Лариса Николаевна, заведующий пульмонологическим отделением УЗ «Гомельская областная туберкулезная клиническая больница».

Буйневич Ирина Викторовна, к.м.н., доцент, заведующий кафедры фтизиопульмонологии УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Зятков Алексей Александрович, научный сотрудник НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Рубаник Наталья Николаевна, лаборант НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Бонда Наталья Александровна, старший научный сотрудник НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Address for correspondence

246000, The Republic of Belarus,
Gomel, Lange Str., 5,
Gomel State Medical University,
TB and pulmonology Department
e-mail: druzanoff@mail.ru
Ruzanov Dmitry Y.

Information about the authors

Voropaev Evgeny V., PhD, Associate Professor, Vice-Rector for Research of the EE «Gomel State Medical University».

Vorobei Victoria A., Assistant of the TB and pulmonology Department of EE «Gomel State Medical University».

Mironova Svetlana V., doctor of the endoscopic department of the «Gomel Regional Tuberculosis Clinical Hospital».

Osipkina Olga V., Head of the Scientific Research Laboratory of the EE «Gomel State Medical University».

Semenova Larisa N., Head of the Pulmonology Department of the «Gomel Regional Tuberculosis Clinical Hospital».

Buynevich Irina V., PhD, Associate Professor, Head of the TB and pulmonology Department of EE «Gomel State Medical University».

Zyatkov Alexey A., Researcher of the Scientific Research Laboratory of the EE «Gomel State Medical University».

Rubanik Natalia N., Laboratory Assistant, Scientific Research Laboratory, EE «Gomel State Medical University».

Bonda Natalya A., Senior Researcher, Scientific Research Laboratory, EE «Gomel State Medical University».

Поступила 14.05.2019

УДК 576.3:611.013.395[-097]

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И МАКРОФАГАХ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

А. Н. Кондрачук¹, Э. А. Надыров¹, А. Е. Козлов², М. В. Матвеев², А. С. Шафорост¹,
А. А. Зятков¹, А. Н. Переволоцкий³, Т. В. Переволоцкая³, В. Н. Беляковский¹

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии» Национальной академии наук Беларуси

г. Гомель, Республика Беларусь

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»

г. Обнинск, Российская Федерация

Цель: определить спонтанный и индуцированный уровень экспрессии генов цитокинов в мезенхимальных стромальных клетках (МСК) и макрофагах при их совместном культивировании как модель изучения иммуномодуляторных свойств мезенхимальных стромальных клеток.