

Пациенты, имеющие аномально малое подвязочное пространство и, как следствие, ограниченную смещаемость, расположенных под средней третью ЗДКПС нервов и сосудов, имеют основания быть отнесенными к группе риска по синдрому БНЧС.

### Заключение

Риск возникновения синдрома БНЧС будет наиболее высоким при значениях площади подвязочного пространства менее 0,6 см<sup>2</sup>.

Причиной возникновения болевого синдрома у пациентов с аномально малым подвязочным пространством может быть не только уменьшение подвязочного пространства, вызванное лигаментотомом, но и перенапряжение ЗДКПС.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Юрковский АМ, Ачинович СЛ, Латышева ВЯ. Связки, ассоциированные с крестцово-подвздошным сочленением: анатомический базис для лучевого диагноста. *Проблемы Здоровья и Экологии*. 2013;4:67-72.
2. Юрковский АМ, Назаренко ИВ. Симптом утолщения задней длинной крестцово-подвздошной связки у пациентов с синдромом боли в нижней части спины. *Неврология и Нейрохирургия. Восточная Европа*. 2018;3:400-06.
3. Юрковский АМ, Аникеев ОИ, Ачинович СЛ. Сонография задних крестцово-подвздошных связок: топографо-анатомические и методические аспекты. *Журнал ГрГМУ*. 2014;3:12-16.
4. LeGoff B, Berthelot J-M, Maugars Y. Ultrasound assessment of the posterior sacroiliac ligaments. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(6):1014-17.
5. Михайлов АН, Юрковский АМ, Ачинович СЛ, Рыбин ИА. Сонография в оценке выраженности дистрофических изменений задней длинной крестцово-подвздошной связки: сонографические и гистологические сопоставления. *Медицина*. 2014;4:3-7.
6. Юрковский АМ, Аникеев ОИ, Ачинович СЛ. Сонография задних крестцово-подвздошных связок: топографо-анатомические и методические аспекты. *Журнал ГрГМУ*. 2014;3:12-6.
7. McGrath C, Jeffery R, Stringer JR. The dorsal sacral rami and branches: sonographic visualisation of their vascular signature. *Intern. J. Osteopathic Med*. 2012;15(1):3-12. doi.org/10.1016/j.ijosm.2011.09.002.
8. McGrath C, Nicholson H, Hurst P. The long posterior sacroiliac ligament: a histological study of morphological relations in the posterior sacroiliac region. *Joint Bone Spine*. 2009;76(1):57-62. doi: 10.1016/j.jbspin.2008.02.015.

### REFERENCES

1. Yurkovskij AM, Achinovich SL, Latysheva VYA. Svyazki, associirovannye s krestcovo-podvzdoshnym sochleneniem: anatomicheskij bazis dlya lucheвого diagnosta. *Problemy Zdorov'ya i Ekkologii*. 2013;4:67-2
2. Yurkovskij AM, Nazarenko IV. Simptom utolshcheniya zadnej dlinnoj krestcovo-podvzdoshnoj svyazki u pacientov s sindromom boli v nizhnej chasti spiny. *Nevrologiya i Nejrohirurgiya. Vostochnaya Evropa*. 2018;3:400-06.
3. Yurkovskij AM, Anikeev OI, Achinovich SL. Sonografiya zadnih krestcovo-podvzdoshnyh svyazok: topografo-anatomicheskie i metodicheskie aspekty. *Zhurn GrGMU*. 2014;3:12-6.
4. LeGoff V, Berthelot J-M, Maugars Y. Ultrasound assessment of the posterior sacroiliac ligaments. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(6):1014-17.
5. Mihajlov AN, Jurkovskij AM, Achinovich SL, Rybin IA. Sonografija v ocenke vyrazhennosti distroficheskikh izmenenij zadnej dlinnoj krestcovo-podvzdoshnoj svyazki: sonograficheskie i gistologicheskie sopostavleniya. *Medicina*. 2014;4:3-7.
6. Jurkovskij AM, Anikeev OI, Achinovich SL. Sonografija zadnih krestcovo-podvzdoshnyh svyazok: topografo-anatomicheskie i metodicheskie aspekty. *Zhurn GrGMU*. 2014;3:12-6.
7. McGrath C, Jeffery R, Stringer JR. The dorsal sacral rami and branches: sonographic visualisation of their vascular signature. *Intern. J. Osteopathic Med*. 2012;15(1):3-12. doi.org/10.1016/j.ijosm.2011.09.002.
8. McGrath C, Nicholson H, Hurst P. The long posterior sacroiliac ligament: a histological study of morphological relations in the posterior sacroiliac region. *Joint Bone Spine*. 2009;76(1):57-62. doi: 10.1016/j.jbspin.2008.02.015.

Поступила 04.10.2018

УДК 618.14:579]:575

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЛОСТИ МАТКИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 16S РРНК

Ю. А. Лызикова, О. В. Осипкина, А. А. Зяцьков, Н. Н. Рубаник

Учреждение образования  
«Гомельский государственный медицинский университет»  
г. Гомель, Республика Беларусь

**Цель:** с использованием метода секвенирования фрагмента гена 16s рРНК идентифицировать микроорганизмы, присутствующие в биоптатах эндометрия.

**Материалы и методы.** С помощью метода секвенирования фрагмента гена 16s рРНК выполнена идентификация микроорганизмов, присутствующих в биоптате эндометрия у 56 пациенток. Дополнительно проведена идентификация смешанных бактериальных культур, полученных при субкультивировании биоптатов эндометрия.

**Результаты.** Методом секвенирования определен вид микроорганизмов в смешанной бактериальной культуре у 18 (32,1 %) пациенток, в ткани эндометрия — у 30 (53,6 %) пациенток. Преобладающими родами микроорганизмов в биоптате эндометрия являются *Lactobacillus spp.*, выявленные у 10 (33,3 %) пациенток, и *Staphylococcus spp.*, определенные у 9 (30 %) пациенток. С помощью иммуногистохимического исследования хронический эндометрит диагностирован у 26 (86,7 %) пациенток с положительными результатами секвенирования в ткани эндометрия. У пациенток с хроническим эндометритом в ткани эндометрия преобладает Гр(+) кокковая флора ( $\chi^2 = 3,98$ ;  $p = 0,05$ ), у пациенток без хронического эндометрита — лактобактерии ( $\chi^2 = 6,35$ ;  $p = 0,01$ ). Видовой состав микроорганизмов в цервикальном канале и эндометрии в 17 (56,7 %) случаях не совпадает.

**Заключение.** Определение вида микроорганизма с помощью метода секвенирования фрагмента гена 16s рРНК в ткани эндометрия является высокоинформативным методом диагностики и его целесообразно использовать для выявления воспалительных заболеваний эндометрия при нарушениях репродуктивной функции.

**Ключевые слова:** секвенирование, хронический эндометрит.

**Objective:** to identify microorganisms present in the biopsy material of the endometrium using the method of 16s rRNA gene fragment sequencing.

**Material and methods.** Using the method of 16s rRNA gene fragment sequencing, we identified the microorganisms present in the endometrial biopsy material in 56 patients. Additionally, identification of mixed bacterial cultures obtained during subculturing of the endometrial biopsy material was carried out.

**Results.** The sequencing method was used to determine the type of microorganisms in mixed cell culture in 18 (32.1 %) patients and in the endometrial tissue in 30 (53.6 %) patients. The predominant microorganisms in the biopsy material of the endometrium are *Lactobacillus spp.*, detected in 10 (33.3 %) patients and *Staphylococcus spp.*, revealed in 9 (30 %) patients. Based on the immunohistochemical examination, chronic endometritis was diagnosed in 26 (86.7 %) patients with positive sequencing results in the endometrial tissue. Gr+cocci dominate in patients with chronic endometritis ( $\chi^2 = 3.98$ ;  $p = 0.05$ ), Lactobacilli — in patients without chronic endometritis ( $\chi^2 = 6.35$ ;  $p = 0.01$ ). The species composition of microorganisms in the cervical canal and endometrium were not identical in 17 (56.7%) cases.

**Conclusion.** Determination of the type of microorganisms by means of the method of 16s rRNA gene fragment sequencing in the endometrial tissue is a highly informative diagnostic method and it is expedient to use it to detect inflammatory diseases of the endometrium in cases of reproductive malfunction.

**Key words:** sequencing, chronic endometritis.

Problemy zdorov'ya i ekologii. 2018 Oct-Dec; Vol 58 (4): 24-30

### The Results of Identification of Microorganisms from the Uterine Cavity by Means of the Method of 16s Rrna Gene Fragment Sequencing

Yu.A. Lyzikova, O.V. Osipkina, A.A. Zyatkov, N.N. Rubanik

#### Введение

Одной из важнейших задач современной медицины является изучение микробиома человека. Нормальная микрофлора половых органов разнообразна и представлена аэробами, факультативными и строгими анаэробами. Любое изменение в составе микробиома половых путей приводит к развитию воспалительных заболеваний [1, 2, 3].

Хроническое воспаление эндометрия в большинстве случаев протекает бессимптомно, клинически проявляясь бесплодием и невынашиванием беременности. Так, хронический эндометрит считают причиной неудач ЭКО в 30 % случаев, идиопатического первичного бесплодия и повторных выкидышей — в 28 % [4, 5]. Учитывая высокую частоту хронического воспалительного процесса в полости матки, остаются актуальными вопросы диагностики возбудителя. Как правило, определение возбудителя производится в материале, полученном из цервикального канала [6, 7]. В то же время результаты оценки персистирующих в слизистой оболочке матки и во влагалище микроорганизмов противоречивы. Так, при оценке бактериальных сообществ из эндометрия и влагалищного содержимого у одних и тех же пациенток состав микрофлоры был различным [8]. Поэтому представляет интерес определение возбудителя непосредственно в очаге поражения.

Достижения в области исследования метагенома позволили создать новый метод диагностики, при котором с помощью секвенирования фрагмента гена 16s рРНК возможно определить набор генов всех микроорганизмов, находящихся в образце, и установить их видовую принадлежность [8]. Появление новых методов диагностики позволяет оценить

видовой состав возбудителей непосредственно в эндометрии, что позволит улучшить эффективность лечебных мероприятий.

#### Цель исследования

С использованием метода секвенирования фрагмента гена 16s рРНК идентифицировать микроорганизмы, присутствующие в биоптатах эндометрия.

#### Материалы и методы

В исследование включено 56 пациенток репродуктивного возраста, у которых проводилась аспирационная биопсия эндометрия. Критерии включения в исследование: репродуктивный возраст, патология репродуктивной функции, прегравидарная подготовка, информированное согласие на аспирационную биопсию. Биопсию эндометрия у пациенток проводили в зависимости от длительности менструального цикла на 7–9-й день после овуляции с помощью аспирационной кюретки ProfiCombi («Симург», Беларусь). Для определения НК-лимфоцитов в эндометрии применяли антитела CD56. Исследование экспрессии изучаемых иммуногистохимических маркеров проводилось в 3 неперекрывающихся полях зрения, при увеличении  $\times 400$ . Поля зрения выбирались в участках максимальной экспрессии изучаемых антител.

Молекулярно-генетический анализ материала из цервикального канала проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выделения ДНК, проведения ПЦР использовали наборы торговой марки «АмплиСенс» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия). Амплификацию и анализ данных проводили согласно инструкции производителя, используя амплификатор Rotor-Gene 3000 «CorbettResearch» (Австралия).

Использованы наборы для молекулярно-генетического тестирования: «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм Флороценоз-Аэробы», «АмплиСенс Chlamydia trachomatis», «Амплисенс Mycoplasma genitalium», «Амплисенс Trichomonas vaginalis», «Амплисенс Neisseria gonorrhoeae».

Выделение ДНК из биоптатов эндометрия проводили с применением готовых коммерческих наборов согласно инструкции производителя. В качестве положительного контроля использовали паспортизованные чистые бактериальные культуры (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Параллельно выполняли субкультивирование биоптатов эндометрия с последующей идентификацией полученных смешанных культур.

Биоптат эндометрия помещали в стерильную транспортную пробирку, содержащую 1 мл бульона с сердечно-мозговой вытяжкой (BD, США) и стеклошарики, и транспортировали в микробиологическую лабораторию в термоконтейнере с поддержанием температуры 28–35 °С. Выполняли гомогенизацию образцов путем 2-минутного вортексирования транспортных пробирок (вортекс V-1 plus, «Biosan», Латвия).

Предварительную инкубацию выполняли в течение 18–24 часов при температуре 35 °С. После инкубации из пробирки отбирали 200–300 мкл бульонной культуры, переносили в криопробирку и замораживали при температуре –20 °С для проведения дальнейших молекулярных исследований. Кроме того, сразу после инкубации проводили посев 100 мкл содержимого транспортной пробирки на чашку (90 мм) с шоколадным агаром, содержащим ростовые добавки (Chocolate agar + PolyViteX, bioMérieux, Франция). Посевы инкубировали 18–24 часа при 35 °С.

При наличии видимого роста на поверхности питательной среды с помощью пластико-

вой петли (1 мкл) проводили отбор совокупности колоний различных морфотипов, и переносили их для отмывки от внеклеточных экзополисахаридов в пробирку с 1 мл деионизированной воды (общий объем бактериальных культур 0,5–2,0 мкл на пробирку). Выполняли суспендирование бульонной культуры с помощью вортексирования, микробные клетки осаждали центрифугированием 10 000 оборотов в минуту в течение 5 минут, тщательно удаляли супернатант. Осадок, содержащий отмываемые микробные клетки, ресуспендировали в 200 мкл ТЕ-буфера («Амплисенс», РФ) и замораживали при температуре –20 °С до проведения дальнейших молекулярных исследований.

Выделение ДНК проводили с применением готовых коммерческих наборов согласно инструкции производителя. В качестве положительного контроля использовали паспортизованные чистые бактериальные культуры (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Для проведения ПЦР, электрофоретической детекции и рестрикционного анализа использовали реагенты фирмы «ThermoScientific» (США). Амплификацию проводили с помощью амплификатора «PalmCycler» фирмы «Corbett Research» (Австралия). Детекцию продуктов ПЦР 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». Структура праймеров (синтезированы «Праймтех», Беларусь) приведена в таблице 1. Программа амплификации: начальная денатурация 95 °С — 3 мин, денатурация 95 °С — 30 с, отжиг 55 °С — 25 с, элонгация 72 °С — 50 с (в течение 35 циклов).

Таблица 1 — Структура праймеров, используемых для выявления фрагмента гена 16S рРНК бактерий, и ориентировочный размер ампликона

Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.
МЕТ-прямой	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~ 900
МЕТ-обратный	CCGTC AATTCCTTTAGTTT	

По результатам ПЦР-анализа, направленного на выявление бактериальной ДНК, для каждого исследованного образца был получен электрофоретический спектр ампликонов, характеризующийся наличием нескольких фракций в диапазоне около 900 пар нуклеотидов, что свидетельствовало о содержании генетического материала более чем одного вида микроорганизмов.

Для идентификации микроорганизмов использовали метод секвенирования по Сэнгеру. Очистку ампликонов и продуктов секвенирующей реакции проводили с применением коммерческих наборов согласно инструкции производителя. Электрофоретическое разделение флюоресцентно-меченых продуктов секвенирующей реакции проводили с помощью гене-

тического анализатора ABI PRISM 310 фирмы «Applied Biosystems» (США), используя реагенты той же фирмы. Анализ полученных результатов проводили при помощи программ-

ного пакета Sequencing Analysis Software 5.1.1 («Applied Biosystems», США). Электрофореграмма в качестве иллюстрации приведена на рисунке 1.

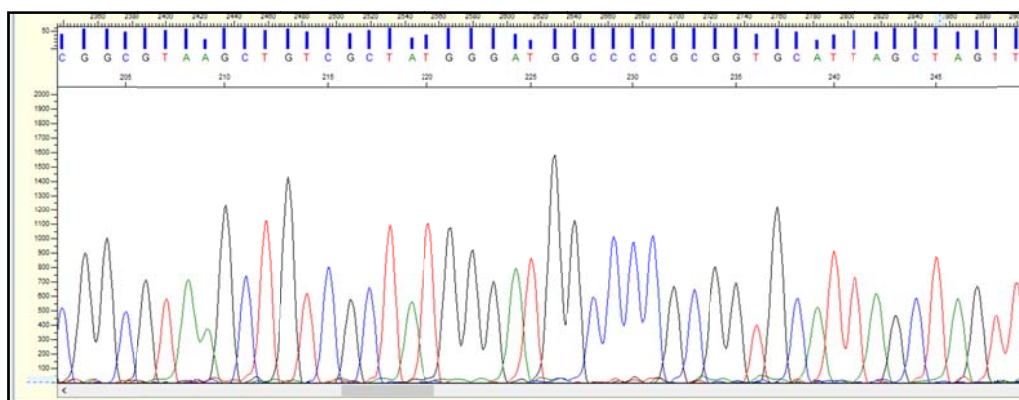


Рисунок 1 — Электрофореграмма нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК *Lactobacillus crispatus*

Полученные данные о нуклеотидной последовательности в формате FASTA были использованы для поиска с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

При анализе качественных признаков в группах сравнения использован непараметрический критерий  $\chi^2$  Пирсона. Результаты считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Всего обследовано 56 пациенток репродуктивного возраста. С помощью секвенирования определены микроорганизмы в смешанной бактериальной культуре у 18 (32,1 %) пациенток, в ткани эндометрия — у 30 (53,6 %) пациенток.

Для 30 образцов аспиратов эндометрия, в которых удалось амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК бактериальных патогенов, субкультивирование на шоколадном агаре позволило выявить микробный рост только в 18 образцах (60 %), в 12 (40 %) — микробный рост на питательных средах отсутствовал. Несовпадающие результаты отмечались прежде всего при прямом обнаружении в биоптатах ДНК различных видов лактобацилл (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*), которые требуют особых условий культивирования и поэтому, как правило, не выявлялись в полученных на шоколадном агаре смешанных культурах.

Среди 30 пациенток с положительными результатами секвенирования в ткани эндометрия у 26 (86,7 %) пациенток была патология репродуктивной функции, 4 (13,3 %) были здоровы и проходили обследование для прегравидарной подготовки. Среди патологии репродукции преобладало бесплодие — 20 (66,7 %), у 3 (10 %) была замершая беременность, у 1

(3,3 %) — самопроизвольный выкидыш. Хронический эндометрит по результатам иммуногистохимического исследования был выявлен у 26 (72,2 %) пациенток с положительными результатами секвенирования в ткани эндометрия.

Среди 26 пациенток с отрицательными результатами секвенирования в ткани эндометрия у 12 (46,2 %) была патология репродуктивной функции, у 10 (38,5 %) — бесплодие, у 2 (7,7 %) невынашивание беременности. С помощью иммуногистохимического исследования биоптатов эндометрия хронический эндометрит был выявлен у 10 (38,5 %) пациенток.

Таким образом, среди пациенток с выявленными микроорганизмами в ткани эндометрия признаки хронического эндометрита диагностированы в 2,3 раза чаще, чем у пациенток с отрицательными результатами секвенирования ( $\chi^2 = 14,10$ ,  $p = 0,0002$ ).

Преобладающими родами микроорганизмов в биоптате эндометрия являются *Lactobacillus spp.*, выявленные у 10 (33,3 %) пациенток и *Staphylococcus spp.*, определенные у 9 (30 %) пациенток. *Streptococcus spp.* и *Atopobium spp.* в полости матки встречались с одинаковой частотой — 4 (13,3 %). *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Morganella spp.*, *Prevotella spp.* выявлялись с частотой 1 (3,3 %). Обращает на себя внимание отсутствие амплификации возбудителя у 4 (15,38 %) пациенток при проведении секвенирования в смешанной бактериальной культуре. С помощью исследования биоптата эндометрия в этих случаях определены микроорганизмы: *Lactobacillus gasseri*, *Streptococcus anginosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Morganella morganii*.

В большинстве случаев (33,3 %) в ткани эндометрия определены лактобактерии [9]. Лактобактерии являются представителями нормальной микрофлоры влагалища. В биотопе здоровых женщин преобладают *Lactobacillus crispatus*, в то время как *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus crispatus* ассоциированы с развитием дисбиотических нарушений [10, 11]. Среди многообразия лактобактерий особенное место отводится *Lactobacillus iners*, которая способствует гибели других лактобактерий и размножению анаэробных микроорганизмов. Данный вид лактобактерий не препятствует, а предрасполагает к заселению половых путей патогенной флорой, кроме этого *Lactobacillus*

*iners* способна катализировать процессы, приводящие к преждевременной родовой деятельности [5]. Вид *Lactobacillus iners* является труднокультивируемым микроорганизмом, поскольку очень изменчив по морфологическим свойствам. *Lactobacillus iners* определена у 1 (3,3 %) пациентки с положительным результатом секвенирования в ткани эндометрия, *Lactobacillus crispatus* — у 5 (16,7 %).

У пациенток с иммуногистохимическими признаками хронического эндометрита в ткани эндометрия преобладает кокковая флора — 44,4 %, у пациенток без признаков хронического эндометрита в 42,8 % случаях выявлены лактобактерии ( $\chi^2 = 6,35$ ;  $p = 0,01$ ) (таблица 2).

Таблица 2 — Сводные результаты амплификации и секвенирования фрагмента гена 16s рРНК в биоптатах эндометрия пациенток

Идентифицированный микроорганизм	Пациентки с хроническим эндометритом (n = 36)	Пациентки без хронического эндометрита (n = 14)	Статистическая значимость различий между группами
<i>Lactobacillus spp.</i>	4 (16,7 %)	6 (42,8 %)	$\chi^2 = 6,35$ ; $p = 0,01$
Гр(+) кокки	16 (44,4 %)	2 (14,3 %)	$\chi^2 = 3,98$ ; $p = 0,05$
Бактериальный патоген	6 (16,7 %)	—	$\chi^2 = 2,65$ ; $p = 0,10$
Отрицательный результат	10 (27,8 %)	6 (42,9 %)	$\chi^2 = 1,05$ ; $p = 0,30$

Слизистая влагалища является входными воротами для возбудителей урогенитальной инфекции, видовой состав микрофлоры которой способствует или препятствует распространению инфекции. Учитывая преимущественно восходящий путь

распространения микроорганизмов в полость матки, оценены результаты молекулярно-генетического анализа материала из цервикального канала у пациенток с положительными результатами, полученными при секвенировании (таблица 3).

Таблица 3 — Результат идентификации микроорганизмов с помощью метода секвенирования фрагмента гена 16S рРНК в биоптатах эндометрия и материале из цервикального канала методом ПЦР

№ п/п	Микроорганизм, определенный методом секвенирования в биоптате эндометрия	Микроорганизм, определенный методом ПЦР в цервикальном канале
1.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Не обнаружен
2.	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>
3.	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
4.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
5.	<i>Prevotella timonensis</i>	Не обнаружен
6.	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>
7.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
8.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
9.	Гетерогенная матрица, сложность дифференцировки	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
10.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
11.	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Ureaplasma spp.</i>
12.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
13.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
14.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
15.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Не обнаружен
16.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружен
17.	<i>Lactobacillus jensenii</i>	Не обнаружен
18.	Гетерогенная матрица, сложность дифференцировки	Не обнаружен
19.	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>

## Окончание таблицы 3

№ п/п	Микроорганизм, определенный методом секвенирования в биоптате эндометрия	Микроорганизм, определенный методом ПЦР в цервикальном канале
20.	<i>Morganella morganii</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>
21.	<i>Corynebacterium sp.</i>	Не обнаружен
22.	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Не обнаружен
23.	<i>Lactobacillus crispatus</i> ( <i>Lactobacillus casei</i> )	Не обнаружен
24.	<i>Streptococcus cristatus</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus tigurinus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
25.	<i>Lactobacillus crispatus</i>	Не обнаружен
26.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Не обнаружен
27.	<i>Lactobacillus crispatus</i>	Не обнаружен
28.	<i>Lactobacillus iners</i>	Не обнаружен
29.	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
30.	<i>Atopobium vaginae</i>	Не обнаружен

У 13 (43,3 %) пациенток с положительными результатами секвенирования в ткани эндометрия в цервикальном канале ДНК патогенных микроорганизмов не выявлено, у 4 (13,3 %) пациенток отмечено совпадение вида микроорганизма в цервикальном канале и в полости матки. Таким образом, исследование материала из цервикального канала в 17 (56,7 %) случаях не позволяет определить микроорганизм в полости матки.

**Выводы**

1. Преобладающими видами микроорганизмов в ткани эндометрия, определенными методом секвенирования фрагмента гена 16s рРНК, являются *Lactobacillus spp.*, выявленные у 10 (33,3 %) пациенток, и *Staphylococcus spp.*, определенные у 9 (30,0 %) пациенток. Видовой состав микроорганизмов в цервикальном канале и эндометрии в 17 (56,7 %) случаях не совпадает.

2. Иммуногистохимические признаки хронического эндометрита выявлены у 72,2 % пациенток с положительным результатом секвенирования в ткани эндометрия ( $\chi^2 = 12,08$ ,  $p = 0,0002$ ).

3. У пациенток с хроническим эндометритом в ткани эндометрия преобладает Гр(+) кокковая флора ( $\chi^2 = 3,98$ ;  $p = 0,05$ ), у пациенток без хронического эндометрита — лактобактерии ( $\chi^2 = 6,35$ ;  $p = 0,01$ ).

**Заключение**

Определение вида микроорганизма методом секвенирования фрагмента гена 16s рРНК в ткани эндометрия является высокоинформативным методом диагностики и его целесообразно использовать для выявления воспалительных заболеваний эндометрия, при бесплодии, невынашивании беременности.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Lamont RF, Jack DS, Sobel, Akins R. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG*. 2011;118(5):533-549.
2. Gorgos LM, Sycuro LK, Srinivasan S, Fielder TL, Morgan MT, Balkus JE, McClelland RS, Fredericks DN, Marrazzo JM. Rela-

tionship of specific bacteria in the cervical and vaginal microbiotas with cervicitis. *Sex Transm Dis*. 2015;42(9):475-481.

3. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota-new player in town. *Fertil Steril*. 2017;108(1):32-39.

4. Буштырева ИО, Буштырев ВА, Баринаева ВВ, Кузнецова НБ. Микробиом женской репродуктивной системы: вопросов больше, чем ответов. *Гл Врач*. 2018;3(62):49-52.

5. Маринкин ИО, Трунченко НВ, Волчек АВ, Агеева ТА, Никитенко Е.В., Макаров К.Ю., Кулешов ВМ, Омигов ВВ, Айдагулова СВ. Маркеры воспаления в нормальном и тонком эндометрии при хроническом эндометрите. *Акушерство и Гинекология*. 2018;2:65-72.

6. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskienė A, Marcinkute A, Pleckaityte M. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):394.

7. Ling Z, Liu X, Chen X, Zhu H, Nelson KE, Xia Y, Li L, Xiang C. Diversity of cervicovaginal microbiota associated with female lower genital tract infections. *Microbial Ecology*. 2011;61(3):704-14.

8. Virtanen S, Kalliala I, Nieminen P, Salonen A. Comparative analysis of vaginal microbiota sampling using 16S rRNA gene analysis. *PLoS One*. 2017;12(7): doi: 10.1371/journal.pone.0181477.

9. Будилова ОВ. Современные представления о лактобациллах влагалища женщин репродуктивного возраста. *Журн Акушерства и Женских Болезней*. 2016;4:34-43.

10. Wilks M, Wiggins R, Whitley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, Corfield A, Millar M. Identification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):713-17.

11. Mane A, Kulkarni S, Ghate M, Risbud A, Thakar M. HIV-1 RNA shedding in the female genital tract is associated with reduced quantity of Lactobacilli in clinically asymptomatic HIV-positive women. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75:112-14.

**REFERENCES**

1. Lamont RF, Jack DS, Sobel, Akins R. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG*. 2011;118(5):533-549.
2. Gorgos LM, Sycuro LK, Srinivasan S, Fielder TL, Morgan MT, Balkus JE, McClelland RS, Fredericks DN, Marrazzo JM. Relationship of specific bacteria in the cervical and vaginal microbiotas with cervicitis. *Sex Transm Dis*. 2015;42(9):475-481.
3. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota-new player in town. *Fertil Steril*. 2017;108(1):32-39.
4. Bushtyrev VA, Barinova VV, Kuznetsova NB. Mikrobiom zhenskoy reproduktivnoy sistemy: voprosov bol'she, chem otvetov. *Gl Vrach*. 2018;3(62):49-52. (in Russ.)
5. Marinkin IO, Trunchenko NV, Volchek AV, Ageeva TA, Nikitenko E.V., Makarov KJu, Kuleshov VM, Omigov VV, Ajdagulova SV. Markery vospaleniya v normal'nom i tonkom jendometrii pri hronicheskom jendometite. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2018;2:65-72. (in Russ.)
6. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskienė A, Marcinkute A, Pleckaityte M. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):394.

7. Ling Z, Liu X, Chen X, Zhu H, Nelson KE, Xia Y, Li L, Xiang C. Diversity of cervicovaginal microbiota associated with female lower genital tract infections. *Microbial Ecology*. 2011;61(3):704-14.

8. Virtanen S, Kalliala I, Nieminen P, Salonen A. Comparative analysis of vaginal microbiota sampling using 16S rRNA gene analysis. *PLoS One*. 2017;12(7): doi: 10.1371/journal.pone.0181477.

9. Budilovskaja OV. Sovremennye predstavleniya o laktobacillah vlagalishha zhenshhin reproduktivnogo vozrasta. *Zhurn Akusherstva i Zhenskikh Boleznij*. 2016;4:34-43. (in Russ.)

10. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, Corfield A, Millar M. Identification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):713-17.

11. Mane A, Kulkarni S, Ghate M, Risbud A, Thakar M. HIV-1 RNA shedding in the female genital tract is associated with reduced quantity of Lactobacilli in clinically asymptomatic HIV-positive women. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75:112-14.

Поступила 12.11.2018

УДК 616.24-008.44-036-06:616.12-008.313.2]:[616.12-008.331.1+616.12-005.4]  
**РОЛЬ СИНДРОМА ОБСТРУКТИВНОГО АПНОЭ/ГИПОПНОЭ СНА  
В СТРАТИФИКАЦИИ КАРДИОВАСКУЛЯРНОГО РИСКА У ПАЦИЕНТОВ  
С НЕКЛАПАННОЙ ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ НА ФОНЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ  
БОЛЕЗНИ СЕРДЦА И/ИЛИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

**Т. И. Балабанович, В. И. Шишко**

**Учреждение образования**

**«Гродненский государственный медицинский университет»**

**г. Гродно, Республика Беларусь**

**Цель.** Оценить роль синдрома обструктивного апноэ/гипопноэ сна (СОАГС) в стратификации кардиоваскулярного риска (КВР) по шкале PROCAM у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий (ФП) на фоне ишемической болезни сердца (ИБС) и/или артериальной гипертензии (АГ).

**Материал и методы.** В исследование включены 158 пациентов с неклапанной ФП на фоне ИБС и/или АГ в возрасте  $55,8 \pm 8,01$  года (69,62 % мужчин). На основании клинико-инструментальных данных все обследованные были разделены на 4 клинические группы в зависимости от наличия СОАГС и его степени тяжести. У всех пациентов рассчитывался суммарный КВР по шкале PROCAM.

**Результаты.** В изучаемой субпопуляции пациентов с неклапанной ФП на фоне ИБС и/или АГ частота выявления случаев СОАГС составила 72,78 %. Пациенты группы 2 характеризовались более высоким суммарным баллом по рискометру PROCAM в сравнении с группой 1 (47 (39; 53) против 39 (33; 50) соответственно;  $p < 0,01$ ). Встречаемость АГ, ИБС, хронической сердечной недостаточности (ХСН), сахарного диабета (СД) и дислипидемии была выше в группе пациентов с наличием СОАГС средней и тяжелой степени в сравнении с группой пациентов без такового синдрома ( $p < 0,01$ ). Наиболее сильные положительные корреляционные связи были выявлены между значениями риска по шкале PROCAM и показателями индекса апноэ/гипопноэ (ИАГ) и индекса гипоксемии (ИГ) у пациентов исследуемой выборки ( $r = 0,341$  и  $r = 0,289$  соответственно;  $p < 0,01$ ).

**Заключение.** Выявлена высокая распространенность СОАГС среди пациентов с неклапанной ФП на фоне ИБС и/или АГ. Сам факт наличия СОАГС и нарастание тяжести течения данного синдрома увеличивает риск сердечно-сосудистых событий (ССС) по оценочной шкале PROCAM у пациентов с неклапанной ФП на фоне ИБС и/или АГ. Проведенное исследование подтверждает необходимость введения в практику методик верификации СОАГС у «аритмических» пациентов с целью более точного определения данного риска и прогноза у обследуемых лиц.

**Ключевые слова:** фибрилляция предсердий, синдром обструктивного апноэ/гипопноэ сна, кардиореспираторный мониторинг, оценка кардиоваскулярного риска, шкала PROCAM.

**Objective.** To evaluate the role of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS) in stratification of the cardiovascular risk (CVR) by the PROCAM scale in patients with non-valvular atrial fibrillation (AF) associated with ischemic heart disease (IHD) and/or arterial hypertension (AH).

**Material and methods.** 158 patients aged  $55.8 \pm 8.01$  (69.62 % males) with non-valvular AF associated with IHD and/or AH were included into the study. Based on the results of clinical and instrumental data, the study subjects were divided into 4 groups according to presence of OSAHS and the degree of its severity. The total CVR score was calculated by the PROCAM scale in all the patients.

**Results.** In the study subpopulation of the patients with non-valvular AF associated with IHD and/or AH, the frequency rate of OSAHS was 72.78 %. The higher total PROCAM number was more characteristic for the second group of the patients compared to those of the first group (47 (39; 53) vs. 39 (33; 50) respectively;  $p < 0.01$ ). Occurrence of AH, IHD, chronic heart failure (CHF), diabetes mellitus (DM) and dyslipidemia was higher in moderate and severe OSAHS patients than in non-OSAHS patients ( $p < 0.01$ ). The strongest positive correlation links were found between the risk values by the PROCAM scale and indices of the apnea/hypopnea and hypoxemia parameters in the patients of the sample group ( $r = 0.341$  and  $r = 0.289$  respectively;  $p < 0.01$ ).

**Conclusion.** High prevalence of OSAHS in patients with non-valvular AF associated with IHD and/or AH has been revealed. The presence of OSAHS itself and growing severity of the course of this syndrome lead to higher CVR by the evaluation PROCAM scale in patients with non-valvular AF associated with IHD and/or AH. The per-