



УДК 543.9

## Тест-система с адсорбционным чипом для экспресс-диагностики заболеваний репродуктивного тракта

© 2021 Хороших Н.В., Золотухин В.О., Миттова В.О.,  
Мадыкин Ю.Ю., Золотухин О.В.

*Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Воронеж*

Поступила в редакцию 09.08.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3779

В последнее время для проведения экспресс-диагностики перед назначением эмпирической фармакотерапии все большую популярность приобретают методы, основанные на рН-метрии. В работе рассмотрена возможность создания тест-системы с адсорбционным чипом на основе хлопковой целлюлозы, модифицированной индикатором для экспресс-диагностики заболеваний мочеполовой системы. В основе метода лежит биологический феномен изменения кислотности при развитии патологического процесса.

Был осуществлен выбор индикатора, способного реагировать на изменение кислотности в диапазоне рН 5.5-7.5, подобран оптимальный растворитель для приготовления раствора индикатора с гипоаллергенными свойствами, высокой способностью к адгезии и умеренной вязкостью, определено необходимое количество раствора для эффективной диагностики и подобран носитель для индикатора. В качестве индикатора был выбран бромтимоловый синий (3',3'-дибромтимолсульфоталеин).

Предложены условия фиксации бромтимолового синего на целлюлозе, установлены условия предподготовки взятых проб и стандартизации ввода их в чип, исследована длительность сохранения свойств полученного чипа во времени. В результате, была предложена схема закрепления бромтимолового синего на прокладках Kotex. Предлагаемая тест-система, в которой сенсором служит адсорбированный чип на основе целлюлозы, модифицированный индикатором, является оригинальной. Данную сенсорную систему можно считать одной из разновидностей распределительной хроматографии.

Эффективность разработанной тест-системы была оценена клинически у 50 женщин в возрасте от 19 до 75 лет. В качестве контроля проводили измерение рН влагалищной жидкости стандартным способом и бактериоскопическое исследование мазка, окрашенного по Граму. Установлено, что обработка полученного отклика на изменение окраски адсорбированного на носителе индикатора позволяет установить степень выраженности воспалительного процесса репродуктивного тракта обследуемых женщин. Интенсивность окрашивания тест-системы коррелировала с активностью воспалительного процесса, а не с особенностями микроорганизмов, вызывающих патологический процесс.

Анализ полученных данных дает достоверные результаты для проведения ранней диагностики заболеваний мочеполовой системы инфекционного генеза, приводятся рекомендации по особенностям использования тест-системы.

**Ключевые слова:** бромтимоловый синий, рН-метрия, заболевания репродуктивного тракта, экспресс-диагностика.

### Введение

Кислотность в медицинских и биологических жидкостях (желудочном соке, слюне, лимфе, моче, растворах репродуктивной системы) широко используется в диагностике различных заболеваний [1-3].

Традиционно методы оценки кислотно-основного баланса у пациентов ограничены системным мониторингом. Однако в последнее время были разработаны неинвазивные методы измерения рН, позволяющие оценить внутри- и/или внеклеточный рН тканей и биологических жидкостей [4]. При определении значений



Рис. 1. Блок-схема тест-системы с адсорбционным чипом для экспресс-диагностики.

Fig 1. A scheme of the test kit with an adsorption chip used for express diagnostics.

растворов используют калориметрический и потенциометрический методы [5]. Потенциометрический метод основан на измерении ЭДС электродной системы, состоящей из индикаторного электрода и электрода сравнения. Этот метод применяется в интрагастральной рН-метрии для пролонгированного фиксирования рН желудочного сока при использовании фармасекреторных проб [5-6]. Колориметрический метод основан на применении индикаторных тест-полосок, окраска которых зависит от величины рН вагинальной жидкости [1,3].

В состав нормальной микрофлоры влагалища здоровых женщин репродуктивного возраста входит 95-98% лактобацилл, активно продуцирующих молочную кислоты и перекись водорода. Их количество достигает в вагинальной жидкости  $10^7$ - $10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Расщепление гликогена в процессе метаболизма молочнокислых бактерий до молочной кислоты и  $H_2O_2$  способствует поддержанию кислой среды влагалища (рН=3.7-4.5) у здоровых женщин репродуктивного возраста.

Для непрерывного определения рН вагинальной жидкости предложена тест-система [7]. Тест-система включает адсорбированный чип, предподготовку и ввод пробы, отклик, обработку бактериоскопических данных, анализ данных чипа для пациента. Считаем, что разработанная тест-система является одной из модификаций получения диагностических данных при установлении заболеваний (рис. 1).

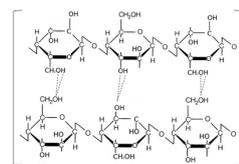


Рис. 2. Структура молекул целлюлозы.

Fig. 2. The structure of cellulose molecules

Подобраны условия закрепления бромтимолового синего на целлюлозном носителе Kotex, представляющем собой ассоциированные параллельные цепочки (рис. 2). Ассоциация цепочек целлюлозы обусловлена межмолекулярными водородными связями различной устойчивости. Это улучшает хроматографические характеристики полиуглевода. На сорбционную способность целлюлозы влияют рН среды, ионная сила растворителя, температура. Поэтому одним из этапов исследования был посвящен выбору условий фиксации бромтимолового синего на целлюлозе и длительности сохранения свойств полученного чипа во времени.

Другой задачей исследования явилось установление условий предподготовки взятых проб и стандартизации ввода их в чип. Обработка полученного отклика на изменение окраски адсорбированного на носителе индикатора позволяет установить степень выраженности воспалительного процесса репродуктивного тракта обследуемых женщин. Анализ полученных данных дает достоверные результаты для проведения ранней диагностики заболеваний мочеполовой системы инфекционного генеза.

Следует отметить, что помимо главного метаболита-молочной кислоты, во влагалищной жидкости содержится определенное количество трансудата (секретируемого железами), слущенного эпителия влагалища и шейки матки, лейкоцитов и микроорганизмов. На рН влагалищ

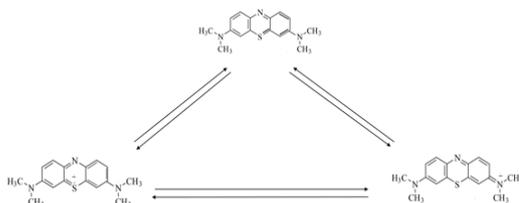


Рис.3. Изменение окраски бромтимолового синего.

Fig. 3. Changes in the colour of bromothymol blue

ной жидкости влияют также половые гормоны, наличие которых мешает точному определению молочной кислоты. Кроме того, в результате предварительных опытов было установлено, что отдельные партии прокладок Kotex в верхнем или во впитывающем слоях содержат ароматизаторы или силиконизированную бумагу, которые придают адсорбционному сорбенту щелочные свойства. Установленные примеси мешают точному переходу окраски бромтимолового синего, что ведет к ложноположительным результатам в отклике (рис. 3).

Таким образом, целью исследования явилось разработка тест-системы с адсорбционным чипом на основе целлюлозы, модифицированной индикатором бромтимоловым синим, для диагностики заболеваний мочеполовой системы [7-10]. Для решения цели работы выполнялись следующие эксперименты:

1. Выбор условий модификации целлюлозного адсорбента бромтимоловым синим, способствующих созданию адсорбционного чипа для определения изменения pH в пробах репродуктивного тракта

2. Разработка способов подготовки и вводы пробы в адсорбционный чип для получения отклика.

3. Представление результатов бактериоскопических данных для обработки

### Теоретическая часть

Модификация целлюлозного носителя индикатором бромтимоловым синим происходит за счет супрамолекулярных

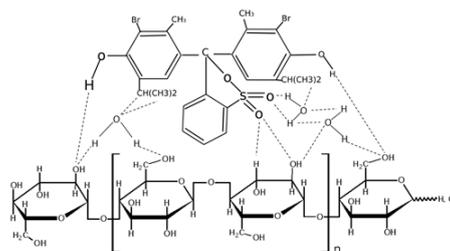


Рис. 4. Схема цепей целлюлозы, стабилизированных водородными связями

Fig. 4. A scheme of the cellulose chains stabilised with hydrogen bonds.

взаимодействий [5]. Один из возможных вариантов самоорганизующейся системы, выполняющей роль адсорбционного чипа, приведен на рис. 4. Представленная схема предполагает конкурирующие реакции. Одна из них обуславливает стабильность межмолекулярных связей между соседними цепочками целлюлозы согласно рис. 1. Другая реакция приводит к образованию водородных связей между OH-группами глюкозных колец целлюлозы и OH-группами, а также  $-S=O$  группировками индикатора (рис. 4).

Полученные ИК-спектры и их расшифровка на рис. 5-6 и таблице 1 свидетельствуют о правомерности высказанных предположений. В ИК-спектрах целлюлозы, ассоциированной с бромтимоловым синим, появляются новые полосы поглощения  $3210\text{ см}^{-1}$  (OH---SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>);  $1231\text{ см}^{-1}$  (V<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> в R-O-SO<sub>2</sub>-R);  $1160\text{ см}^{-1}$   $\nu_{\text{as}}(\text{C-S})$ ,  $739\text{ см}^{-1}$  (дыхательные колебания кольца C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) по сравнению с исходным носителем [11, 12].

Корректная интерпретация изменения цвета бромтимолового синего возможна на основе ионно-хромофорной теории. В нашем случае основной вопрос - что приводит к появлению или изменению цветовых характеристик при переходе от основной формы к кислотной и обратно, то есть при отдаче или присоединения протонов, требует рассмотрения. Причиной подобного явления выступает превращение одних хромофорных групп в другие или замена одних хромофорных группировок другими. Примером может служить переход фенолфталеина из кислотной в

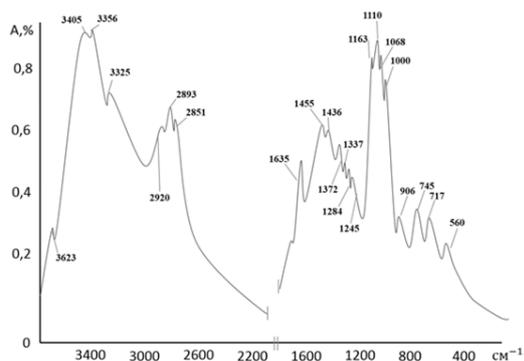


Рис. 5. ИК-спектр целлюлозы с двумя параллельными цепочками  
Fig. 5. IR spectrum of cellulose with two parallel chains

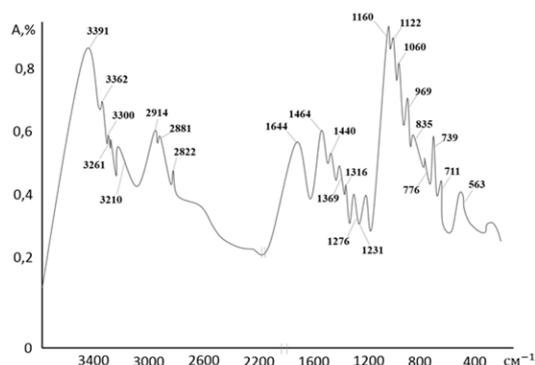


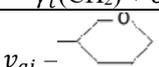
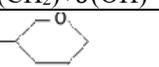
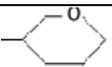
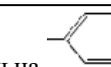
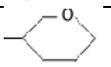
Рис. 6. ИК-спектр целлюлозы, ассоциированной с бромтимоловым синим  
Fig. 6. IR spectrum of cellulose associated with bromothymol blue

основную форму, сопровождаемый появлением вместо бензойной новой хромофорной группы – хиноидной. Для

хиноидной формы (рис. 7) характерно интенсивное поглощение света в видимой области спектра.

Таблица 1. Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах целлюлозы свободной и целлюлозы, ассоциированной с бромтимоловым синим.

Table 1. Assignment of the absorption bands in the IR spectra of free cellulose and cellulose associated with bromothymol blue.

Свободная целлюлоза		Целлюлоза, ассоциированная с бромтимоловым синим	
$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	Отнесение полос	$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	Отнесение полос
3623	$\nu$ (OH) с одной Н-связью	3391	$\nu$ (OH...OH) с 3- или 4-Н связями
3405	$\nu$ (OH...OH) с 3- или 4-Н связями	3362	$\nu$ (OH...OH) двух сосед колец
3356	$\nu$ (OH...OH) двух сосед колец	3300	$\nu$ (OH...O) параллельных цепей
-	-	3261	HO...HO-CH <sub>2</sub> -
-	-	3210	
2920	as CH <sub>2</sub>	2914	$\nu_{\text{as}}$ CH <sub>2</sub>
2893	vs CH <sub>2</sub>	2881	vs(CH <sub>2</sub> )
2851	$\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )	2822	$\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )
1635	$\beta$ H <sub>2</sub> O адсорбион.	1644	$\delta$ H <sub>2</sub> O адсорбир.
1455	$\delta$ (CH) + $\delta$ (OH)	1464	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ); $\delta_s$ (CH)+ $\gamma_t$ (OH)
1436	$\delta_s$ (CH <sub>2</sub> ) + $\delta_s$ (CH)	1440	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ); $\delta_s$ (CH <sub>2</sub> )+ $\delta_s$ (CH)
1372	$\delta_s$ (OH)+ $\delta$ (CH)+ $\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )	1369	$V_{\text{as}}$ SO <sub>2</sub> ; $\delta$ (OH)+ $\delta$ (CH)+ $\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )
1337	$\delta$ (OH) + $\delta$ (CH)	1316	$\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> ) + $\gamma_t$ (CH <sub>2</sub> ); $\delta$ (OH)+ $\delta$ (CH)
1284	$\delta$ (OH) + $\delta$ (CH) + $\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )	1276	$\gamma_w$ (CH <sub>2</sub> )+ $\gamma_t$ (CH)+ $\delta$ (OH); $V_s$ SO <sub>2</sub> в R-O-SO <sub>2</sub> -R
1245		1231	
1163	$\gamma_t$ (CH <sub>2</sub> ) + $\delta$ (OH)	1160	R <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> ; $V_{\text{as}}$ (C-S); $\gamma_t$ (CH <sub>2</sub> )+ $\delta$ (OH)
1110	$\nu_{\text{ai}}$ -  ; $\gamma_t$ (CH <sub>2</sub> )	1122	(R <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> ) $V_s$ ; $\gamma_t$ (CH <sub>3</sub> ); $V_{\text{as}}$ - 
1068	$\nu_a$ (COC мостик)	1060	$V_a$ (COC)-мостик
1000	$\nu$ (C-C); $\nu$ (C-OH); $\delta$ (CH) + $\delta$	969	$V$ (C-C); $V$ (C-OH); $\delta$ (CH)+ $\delta$ (OH);
906	(OH)	835	$\gamma_r$ (CH <sub>2</sub> )
745	«Дыхат.» колеб. кольца 	776	«Дыхат.» колебания кольца 
-	-	739	$\gamma_r$ (CH <sub>2</sub> ) и кольца 
717	$\gamma_r$ (CH <sub>2</sub> ) ; $\delta$ (H <sub>2</sub> O)	711	$V$ (C-S); $\gamma_r$ (CH <sub>2</sub> ); $\delta$ (H <sub>2</sub> O)
560		563	

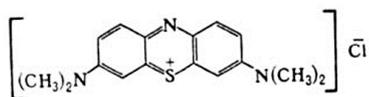
$\nu_w$  – веерные.  $\nu_t$  – маятниковые.  $\nu_l$  – топзидонные.



Рис. 7. Переход фенолфталеина из кислой в основную форму  
Fig. 7. Acid-base transition of phenolphthalein

Приведенные данные по фенолфталеину выбраны целенаправленно [5], так как он является родственным по ионно-хромофорной теории индикатору бромтимоловому синему (рис. 8). Бромтимоловый синий, исходя из теории Бренстеда, является протолитом и способен проявлять кислотные свойства. При взаимодействии с амфипротными (нейтральными) растворителями бромтимоловый синий существует в виде биполярного иона.

В ряде случаев переход окраски индикатора бромтимолового синего (от синего к желтому) может быть замаскирован присутствием примесных веществ. Конечную точку перехода окраски бромтимолового синего при этом определить затруднительно, так как верно отличить тесно-зеленый цвет от травянисто-зеленого удается не всегда.



Поэтому (наряду с бромтимоловым синим) готовили тестовые полоски с метиленовым синим, у которого переход окраски от бесцветного к синему не вызывает затруднений.

### Экспериментальная часть

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:



Рис. 8. Изменение окраски фенолфталеина и бромтимолового синего  
Fig. 8. Changes in the colour of phenolphthalein and bromothymol blue.

1. Выбор индикатора, способного реагировать на изменение кислотности в диапазоне pH 5.5-7.5. Кроме того, химическая реакция индикатора и раствора должна быть видимой и изменение цвета индикатора должно быть явным.

2. Подбор оптимального растворителя для приготовления раствора индикатора, который должен обладать гипоаллергенными свойствами, высокой способностью к адгезии и умеренной вязкостью. На данный момент для приготовления большинства растворов гигиенической направленности имеется несколько стандартных растворителей: глицерин, дистиллированная вода, изопропиловый спирт, этиловый спирт.

3. Создание раствора индикатора, реагирующего на изменение кислотности в диапазоне 5.5 до 7.5.

4. Определение необходимого количества раствора для эффективной диагностики.

5. Отдельной задачей являлся выбор носителя для индикатора.

В ходе решения первой задачи в качестве индикатора нами был выбран бромтимоловый синий (3',3'-дибромтимолсульффталеин) – кислотно-основный индикатор, малорастворимый в воде. Бромтимоловый синий регистрирует на изменения pH в диапазоне значений от 5.8 до 7.6, нейтральные значения (pH=7.0) соответствуют травянисто-зеленому цвету [13].

Апротонными растворителями для бромтимолового синего были выбраны вода и глицерин (задача 2), которые обладают гипоаллергенными свойствами, хорошо растворяют индикатор – бромтимоловый синий, а также имеют нейтральный рН, что исключает образование ложноположительных результатов на этапе приготовления раствора.

Для решения задачи 3 было разработано 3 способа приготовления раствора индикатора с использованием отобранных растворителей:

Способ 1: 0.01 г бромтимолового синего растворяли в 5 см<sup>3</sup> глицерина и доводили до 10 см<sup>3</sup> водой дистиллированной.

Способ 2: 0.01 г бромтимолового синего растворяли в 10 см<sup>3</sup> глицерина.

Способ 3: 0.01 г бромтимолового синего растворяли в 10 см<sup>3</sup> воды.

Оптимальное количество раствора (задача 4) определяли, исходя из площади носителя, контактирующего с областью наружной части органов малого таза у женщин. Количество раствора, необходимое для заполнения данной площади, составило 1 см<sup>3</sup>. На средний слой прокладки с помощью шприца объемом 1 см<sup>3</sup> наносили приготовленный раствор индикатора. Нагреванием образца при 100°C, в течение 30 минут добивались фиксации индикатора в целлюлозной прокладке (заметим, что нагревание прокладки выше 100°C ведет к разрушению верхнего слоя носителя).

После завершения сушки прокладки с закрепленным индикатором фасовались и упаковывались в вакуумной камере или без нее. Хранение прокладок при 25°C проводили в темноте. Дegrаdацию абсорбционных образцов проверяли для установления сроков их годности на 7-е, 14-е, 60-е, 90-е, 12-е, 200-е и 260-е сутки, поддерживая рН прокладки; буферными растворами в пределах от 5.00 до 9.18 рН 1.0 миллилитровых объемах.

В качестве носителя (задача 5) были рассмотрены несколько вариантов популярных марок производителей женских

гигиенических прокладок: Kotex, Always, Sanny, Bella. Исследовались все линейки товаров данных производителей в области ежедневных женских гигиенических прокладок.

В ходе эксперимента было выявлено, что прокладки, в состав которых входят силиконизированная бумага или ароматизатор, имеют щелочную среду верхнего и/или впитывающего слоя в результате чего после пропитывания данного слоя индикатором происходит изменение его цвета на темно-зеленый. Это дает большое количество ложноположительных результатов и делает невозможным использование данных носителей в предлагаемой методике. Основным носителем выбраны прокладки марки Kotex с верхним покрытием прокладки из 100% хлопка, поскольку их впитывающий и верхний слой имел нейтральный рН и не изменял цвет раствора индикатора.

Измерение рН влагалищного содержимого проводили с использованием тест-системы с абсорбционным чипом, нанося нативные выделения из влагалища, полученные во время гинекологических осмотров. В ряде случаев эти показатели сравнивали со значениями рН полученными с использованием бумажных лакмусовых полосок «рН Special test paper» (Россия) со шкалой измерения от 2.5 до 9.0 и шагом в 0.5.

Для бактериоскопических исследований материал, забранный из трех точек (цервикальный канал, шейки матки и уретра) наносили тонким слоем на два предметных стекла, которые высушивали, фиксировали 96% этиловым спиртом в течение 3 мин, окрашивали 1% водным раствором метиленового синего (1-е стекло) и по Грамму (2-е стекло). Интерпретацию данных проводили в соответствии общепринятой оценкой по степеням чистоты влагалища:

I степень – под микроскопом с увеличением 100x10 видны только единичные клетки слущенного плоского эпителия и лактобациллы (бациллярная флора), ре

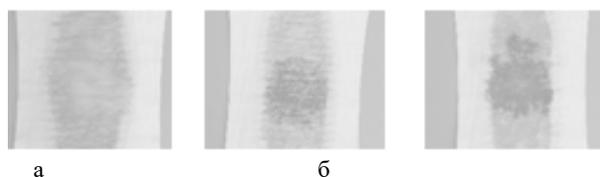


Рис. 9. Изменение цвета индикатора бромтимолового синего при pH=5.0 (а), pH=6.86 (б), pH=9.18 (в) через 90 суток после нанесения раствора индикатора в тест-систему.

Fig. 9. Changes in the colour of the bromothymol blue indicator at pH=5.0 (a), pH=6.86 (b), pH=9.18 (c) 90 days after the application of the indicator solution into the test kit.

Таблица 2. Результаты бактериоскопического исследования пациенток выделенных групп.  
Table 2. Results of the microbiological study of the vaginal discharge of the patients.

Возраст обследуемых	1 степень чистоты (нормоциноз)	2 степень чистоты (промежуточный тип мазка)	3 степень чистоты (дисбиоз влагалища)	4 степень чистоты (вагинит)
Постменопауза (n=6)	4 (67%)	-	-	2 (33%)
Ранний репродуктивный возраст (n= 26)	5 (19%)	3 (11%)	9 (35%)	9 (35%)
Поздний репродуктивный возраст (n= 14)	4 (29%)	4 (29%)	4 (29%)	2 (13%)
Послеродовый период (n=4)	2 (50%)	-	-	2 (50%)

акция кислая (pH 4.0-4.5), лейкоцитов незначительное количество (до 5 в поле зрения);

II степень – лактобацилл меньше, появляются единичные (мелкие стафилококки или стрептококки (флора смешанная), слущенных эпителиальных клеток значительно больше, лейкоцитов больше, но число их не превышает 15-20 в поле зрения, реакция остается кислой (pH может повыситься до 5.0);

III степень – лактобацилл почти нет, преобладают стафилококки и стрептококки (кокковая флора), слущенного эпителия много, лейкоцитов значительное количество (до 50-60 в поле зрения), реакция слабо-кислая (pH до 6.0-6.5);

IV степень – лактобацилл нет, флора пестрая, смешанная, могут встретиться трихомонады и диплококки, клеток слущенного эпителия мало, лейкоцитов очень много (сплошь или до 80-100 в поле зрения), реакция нейтральная или слабощелочная (pH 7.0-8.0).

### Обсуждение результатов

Раствор, приготовленный каждым из описанных способов, показал свою эффективность и изменение цвета среды при нахождении в диапазоне 5.8-7.6.

Наилучшее распределение на носители было показано для раствора, приготовленного способом 1. Было установлено, что, независимо от длительности и условий хранения тест-системы с нанесенным индикатором, при нанесении буферных растворов с pH=5.0; 6.86 и 9.18 наблюдалось аналогичное изменение цвета (рис. 9).

Всего было изучено 50 образцов тест-системы, полученных, соответственно от 50 женщин. Все пациентки, включенные в исследование, были разделены на 4 группы, в соответствии с возрастом: постменопауза, ранний репродуктивный возраст, поздний репродуктивный возраст, послеродовый период. Большую часть обследуемых составляли женщины репродуктивного возраста и только 6 человек – пациентки в периоде постменопаузы.

Как показывают результаты, приведенные в таблице 2, у пациенток старшего возраста вагинит бактериоскопически подтвердился у 2 (33%) человек, в послеродовом периоде – также у 2 (50%) женщин. У женщин раннего репродуктивного и позднего репродуктивного возраста вагинит был подтвержден у 9 (35%) и 2 (13%) женщин, соответственно. В

Таблица 3. Сравнительный анализ результатов рН-метрии влагалищных выделений пациенток выделенных групп.

Table 3. A comparative analysis of the pH measurements of vaginal discharge of the patients.

Возраст обследуемых	pH 2.5-3.5	pH 4.0-5.0	pH 5.5-6.5	pH 7.0	Значительное изменение окраски тест-системы
Постменопауза (n=6)	-	6 (100%)	-	-	-
Ранний репродуктивный возраст (n=26)	6 (23%)	12 (46%)	8 (31%)	-	8 (31%)

группе женщин репродуктивного возраста частота выявления воспалительного типа мазка превышала частоту клинической манифестации заболевания. По мнению большинства исследователей у женщин детородного возраста может иметь место несовпадение жалоб и степень выраженности воспалительного и/или дисбиотического процесса в нижних отделах полового тракта [14-17].

Выраженного повышения рН до 7.0 и выше не было обнаружено ни у одной из обследуемых пациенток (таблица 3). Умеренное повышение рН до уровня 5.5-6.5 выявлено у 2 (50%) пациенток в послеродовом периоде, у 8 (31%) пациенток раннего репродуктивного возраста и 4 (29%) пациенток позднего репродуктивного возраста. Незначительное повышение рН до 4.0-5.6 выявили у всех женщин старшего возраста, у 2 женщин в послеродовом периоде и у 18 женщин репродуктивного периода. Следует констатировать, что изменения кислотности влагалищных выделений в целом соответствовали клинической картине заболевания и результатам бактериоскопического исследования. По данным литературы максимально часто изменение кислотности влагалищной жидкости коррелировало именно с развитием дисбиотических процессов во влагалище, т.е. именно с развитием бактериального вагиноза [1, 17-19].

Сравнительные результаты исследования рН-метрии и изменения окраски тест-системы показали, что у 18 женщин окраска тест-системы не изменилась; это

были женщины постменопаузального возраста, 2 женщины послеродового периода и 10 женщин репродуктивного периода (табл. 3). У 17 пациенток позднего и раннего репродуктивного возраста окраска индикатора изменилась незначительно. Значительное изменение окраски тест-системы было выявлено у 2 (50%) пациенток в послеродовом периоде, у 8 (31%) пациенток раннего репродуктивного возраста и 3 (21%) пациенток позднего репродуктивного возраста. Данные, полученные для изменения окраски тест-системы соответствовали данным рН-метрии у пациенток в послеродовом периоде и пациенток раннего репродуктивного возраста. Из 4 пациенток позднего репродуктивного возраста, у которых было выявлено повышение рН по результатам рН-метрии, окраска индикатора изменилась у 3 пациенток. Данные результаты связаны с выявленной зависимостью изменения интенсивности окрашивания от возраста женщины. Наилучшее окрашивание тест-системы было получено у женщин детородного возраста, значительно более слабое - в перименопаузальном возрасте, еще более слабое - в периоде постменопаузы, что совпадает с данными литературы [4,15]. У женщин детородного возраста железы вырабатывают вагинальную слизь в количестве, достаточном для адекватного смачивания тест-системы и получения видимого глазу изменения окраски индикатора. Это является результатом влияния высокого содержания эстрогенов на слизистую

эпителия и количество гликогена в клетках плоского эпителия. У женщин старшего возраста концентрация эстрогенов в крови закономерно снижается, что приводит к существенному уменьшению секреции. При анализе образцов, полученных от женщин старшего возраста хочется отметить, что, несмотря на наличие цитогаммы воспаления при бактериоскопическом контроле, окрашивания прокладки практически не произошло. Это связано, по всей видимости с крайне скудным вагинальным секретом у женщин в периоде постменопаузы. Полученного количества материала было недостаточно для изменения цвета индикатора в тест-системе. Также мы выявили зависимость изменения окрашивания от фазы менструального цикла у женщин детородного возраста. Наилучшая реакция индикатора получена у женщин, тестируемых в середине менструального цикла, что также соответствует литературным данным [4,19]. Именно в период овуляции концентрация эстрадиола в крови максимальна, именно в этот период выделение слизи железами влагалища и шейки матки также достигает наибольших значений. Наиболее выраженную интенсивность изменения окрашивания получена у женщин с выраженным патологическим процессом в нижних отделах репродуктивного тракта. Именно у них отмечалось максимально сильное изменение цвета индикатора, что связано, скорее всего, с влиянием патогенной флоры на pH влагалищной жидкости. Следует подчеркнуть, что нам не удалось выявить зависимость между этиологическим фактором, вызывающим патологические изменения влагалищной микробиоты и степенью изменения кислотности выделений. В наших исследованиях интенсивность окрашивания тест-системы коррелировала с активностью воспалительного процесса, а не с особенностями микроорганизмов, вызывающих патологический процесс.

Следует особо подчеркнуть, что на этапе доклинических исследований время воздействия влагалищного секрета

на индикатор минимально; практически оно не превышает нескольких секунд, необходимых для нанесения выделений на поверхность прокладки. При ежедневном использовании тест-системы это время значительно увеличится. Рекомендуемое время использования одной прокладки составляет около 4 часов. Этого достаточно для адекватного смачивания прокладки даже у женщин с минимальной секрецией. Важно, что наиболее значимым из изученных нами факторов, максимально меняющим окраску индикатора, оказалась степень выраженности патологического процесса. С одной стороны, активный воспалительный процесс сопровождается обильными выделениями, достаточными для изменения окраски индикатора. С другой стороны, воспаление всегда сопровождается развитием патогенной флоры в количестве, достаточном для угнетения активности лактобацилл и нарушения равновесия во влагалищной микробиоте, а значит и для изменения pH выделений. Одинаково активно окраска менялась и при выраженном вагините, и при выраженном вагинозе.

### **Заключение**

В результате доклинического исследования был проведён выбор условий модификации целлюлозного адсорбента бромтимоловым синим, способствующих созданию адсорбционного чипа на хлопковой целлюлозе, а также предложены способы подготовки и ввода пробы в адсорбционный чип для мониторинга изменения кислотности влагалищных выделений при развитии патологических процессов. Было показано, что тест-система с адсорбционным чипом для экспресс-диагностики заболеваний репродуктивного тракта изменяет окраску при воздействии на нее выделений, полученных из полового тракта женщин различных возрастов. Было установлено, что интенсивность изменения окраски определялась количеством нанесенных выделений и степенью выраженности патологического процесса у обследуемой женщины,

что показывает возможность использования тест-системы с адсорбционным чи-

пом для ранней диагностики воспалительных заболеваний мочеполовой системы инфекционного генеза.

### Список литературы

1. Кира Е.Ф., Душкина Е.А., Бадикова Н.С. // *Акушерство и гинекология*. 2013. Т. 3. С. 102-106.
2. Мюллер Э. Р., Вулф А. Дж., Брубейкер Л. // *Современное мнение в урологии*. 2017. Т. 27. С. 282-286.
3. Кира Е.Ф., Семенова К.Е., Маркарян А.М. // *Гинекология*. 2014. Т. 16. С. 9-13.
4. Gillies R.J. Raghunand N., Garcia-Martin M.L., Gatenby R.A. // *Engineering in Medicine and Biology Magazine*. 2004. Vol. 23. pp. 57-64.
5. Бончев П.Р. Введение в аналитическую химию. Ленинград. Химия. 1978. 496 с.
6. Трухманов А.С., Сторонова О.А., Ивашкин В.Т. // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016. Т. 26. С. 55-68.
7. Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б., Беланова Н.А. и др. Фосфолипиды на фоне природных матриц. Воронеж. Научная книга. 2020. 318 с.
8. Хороших Н.В., Мадькин Ю.Ю., Миттова В.О., Соловьева А.А. // *Прикладные информационные аспекты медицины*. 2019. Т. 22. С. 85-89.
9. Хороших Н.В., Мадькин Ю.Ю., Миттова В.О., Соловьева А.А. // *Прикладные информационные аспекты медицины*. 2019. Т. 22. С. 90-94.
10. Мадькин Ю.Ю., Хороших Н.В., Миттова В.О., Золотухин О.В. Патент РФ. № 2743428, 2021.
11. Казницина П.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-ИК и ЯМР спектроскопии в органической химии. М. Высшая школа. 1971. 264 с.
12. Дехант И., Данц Р., Киммер В., Шмольке Р. Инфракрасная спектроскопия полимеров М. Химия. 1976. 471 с.
13. Sabnis R.W. Handbook of Acid-Base Indicators. New York. CRC Press. 2007. 416 p.
14. Савичева А.М., Тапильская Н.И., Шипицына Е.В., Воробьева Н.Е. // *Акушерство и гинекология*. 2017. Т. 5. С. 24-31
15. Bagnall P., Rizzolo D. // *Journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2017. Vol. 30. pp. 15-21.
16. Sherrard J., Wilson J., Donders G, Mendling W. et al. // *International Journal of STD&AIDS*. 2018. Vol. 29. pp. 1258-1272
17. Малова И.О., Афанасьева И.Г., Гусевская К.А. // *Акушерство и гинекология: Новости, мнения, обучение*. 2019. Т. 7. С. 79-86
18. Sgibnev A., Kremleva E.I. // *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2017. Vol. 9. pp. 131-141
19. Диагностика инфекций в акушерско-гинекологической и неонатологической практике: учебное пособие. М. Радуга. 2018. 124 с.

## A test kit with an adsorption chip for the express diagnostics of genital tract disorders

© 2021 Khoroshikh N.V., Zolotukhin V.O., Mittova V.O., Madykin Yu.Yu., Zolotukhin O.V.

*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh*

Express diagnostics methods based on pH measurements conducted prior to empirical treatment have been gaining popularity lately. The article considers the possibility of creating a test kit with an adsorption chip based on cotton cellulose modified with an indicator for the express diagnostics of genitourinary disorders. The method is based on the biological phenomenon of changes in acidity during the development of a pathological process.

In our study, we selected an indicator that can register changes in acidity within the range of pH 5.5-7.5 and determined the optimal solvent for the preparation of a hypoallergic indicator solution with high adhesion capacity and moderate viscosity. We also determined the amount of the solution required for effective

diagnostics and selected a carrier for the indicator. Bromothymol blue (3',3'-dibromothymolsulfophthalein) was chosen as an indicator.

As results of the study, the conditions for the fixation of bromothymol blue on cellulose were proposed, the conditions for the preparation of the samples were determined and the standardisation of the introduction of the sample into the chip was performed. Evaluation of the in vivo longevity of the properties of the obtained test kit was investigated. As a result of the study, we suggested a scheme for the fixation of bromothymol blue on Kotex pads. The suggested test kit, in which an adsorbed cellulose-based chip modified with an indicator serves as a sensor, is original. This sensoric can be considered a type of partition chromatography.

The effectiveness of the suggested kit was clinically tested on 50 women between the ages of 19 and 75. The control test included standard measuring of the pH of vaginal discharge followed by a microbiological study of the gram-stained smears of vaginal discharge. The study demonstrated that the processing of the obtained reaction to the change in the colour of the indicator absorbed on the carrier can be used to determine the degree of inflammation of the reproductive tract in the examined patients. The intensity of the colour of the test kit correlated with the intensity of inflammation rather than with the type of microorganisms causing the pathological process.

The analysis of the obtained data provides reliable results that can be used for the early diagnostics of genitourinary tract infections. The article also provides recommendations for the application of the test kit.

**Keywords:** bromothymol blue, pH measurement, genital tract disorders, express diagnostics.

## References

1. Kira E.F., Dushkina E.A., Badikova N.S., *Akusherstvo i ginekologiya*, 2013, Vol. 3, pp. 102-106.
2. Myuller E. R., Vulf A. Dzh., Brubejker L., *Sovremennoe mnenie v urologii*, 2017, Vol. 27, pp. 282-286.
3. Kira E.F., Semenova K.E., Markaryan A.M., *Ginekologiya*, 2014, Vol. 16, pp. 9-13.
4. Gillies R.J. Raghunand N., Garcia-Martin M.L., Gatenby R.A., *Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 2004, Vol. 23, pp. 57-64.
5. Bonchev P.R. Vvvedenie v analiticheskuyu khimiyu, Leningrad, Khimiya, 1978, 496 p.
6. Trukhmanov A.S., Storonova O.A., Ivashkin V.T., *Rossijskij zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*, 2016, Vol. 26, pp. 55-68.
7. Selemenev V.F., Rudakova L.V., Rudakov O.B., Belanova N.A. et al., Fosfolipidy` na fone prirodny`kh matricz, Voronezh, Nauchnaya kniga, 2020, 318 p.
8. Khoroshikh N.V., Mady`kin Yu.Yu., Mitova V.O., Solov`eva A.A., *Prikladny`e informacionny`e aspekty` medicziny`*, 2019, Vol. 22, pp. 85-89.
9. Khoroshikh N.V., Mady`kin Yu.Yu., Mitova V.O., Solov`eva A.A., *Prikladny`e informacionny`e aspekty` medicziny`*, 2019, Vol. 22, pp. 90-94.
10. Mady`kin Yu.Yu., Khoroshikh N.V., Mitova V.O., Zolotukhin O.V., Patent RF. 2743428, 2021.
11. Kazniczina P.A., Kupletckaya N.B., *Primenenie UF-IR i YaMR spektroskopi v organicheskoy khimii*, M., Vysshaya shkola, 1971, 264 p.
12. Dekhant I., Dancz R., Kimmer V., Shmol`ke R., *Infrakrasnaya spektroskopiya polimerov*, M., Khimiya, 1976, 471 p.
13. Sabnis R.W., *Handbook of Acid-Base Indicators*, New York, CRC Press, 2007, 416 p.
14. Savicheva A.M., Tapil`skaya N.I., Shipiczy`na E.V., Vorob`eva N.E., *Akusherstvo i ginekologiya*, 2017, Vol. 5, pp. 24-31
15. Bagnall P., Rizzolo D., *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 2017, Vol. 30, pp. 15-21.
16. Sherrard J., Wilson J., Donders G, Mendling W. et al., *International Journal of STD&AIDS*, 2018, Vol. 29, pp. 1258-1272
17. Malova I.O., Afanas`eva I.G., Gusevskaya K.A., *Akusherstvo i ginekologiya: Novosti, mneniya, obuchenie*, 2019, Vol. 7, pp. 79-86
18. Sgibnev A., Kremleva E.I., *Probiotics and antimicrobial proteins*, 2017, Vol. 9, pp. 131-141
19. *Diagnostika infekcij v akushersko-ginekologicheskoy i neonatologicheskoy praktike, uchebnoe posobie*, M., Raduga, 2018, 124 p.

**Хороших Наталья Владимировна** – к.м.н. доцент кафедры акушерства и гинекологии №2 ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

**Золотухин Владимир Олегович** – студент лечебного факультета ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

**Миттова Валентина Олеговна** – к.б.н., доцент кафедры биохимии Воронежского Государственного Медицинского Университета имени Н. Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, Воронеж

**Мадькин Юрий Юрьевич** – к.м.н. доцент кафедры онкологии и специализированных хирургических дисциплин ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

**Золотухин Олег Владимирович** – д.м.н., заведующий кафедрой урологии и андрологии ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, главный внештатный уролог Департамента здравоохранения Воронежской области, заместитель главного врача по медицинской части БУЗ ВО Воронежская областная клиническая больница № 1, Воронеж

**Knoroshikh Natalia V.** – PhD in Medicine, Assistant Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology №2, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko of the Ministry of Health of the Russian Federation, Voronezh, Russian Federation; e-mail: [nvh.vrn2011@yandex.ru](mailto:nvh.vrn2011@yandex.ru), ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-8955-1113>.

**Zolotukhin Vladimir O.** – student of the General Medicine Faculty, Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko of the Ministry of Health of the Russian Federation, Voronezh, Russian Federation; e-mail: [vladimir.zolotukhin@gmail.com](mailto:vladimir.zolotukhin@gmail.com), ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4067-6713>

**Mittova Valentina O.** – PhD in Biology, Assistant Professor of the Department of Biochemistry, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko of the Ministry of Health of the Russian Federation, Voronezh, Russian Federation; e-mail: [vmittova@mail.ru](mailto:vmittova@mail.ru), ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9844-8684>

**Madykin Yuri Yu.** – PhD in Medicine, Assistant Professor of the Department of Oncology and Specialized Surgical Disciplines, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko of the Ministry of Health of the Russian Federation, Voronezh, Russian Federation; e-mail: [madykin@mail.ru](mailto:madykin@mail.ru), ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1178-2610>.

**Zolotukhin Oleg V.** – Head of the Department of Urology and Andrology, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chief urologist of the Department of Health of the Voronezh Region, Deputy Chief Physician for the medical part of BUZ VO Voronezh Regional Clinical Hospital No. 1, Doctor of Medical Sciences, Voronezh, Russian Federation; e-mail: [zolutuhin-o@yandex.ru](mailto:zolutuhin-o@yandex.ru), ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3142>.