

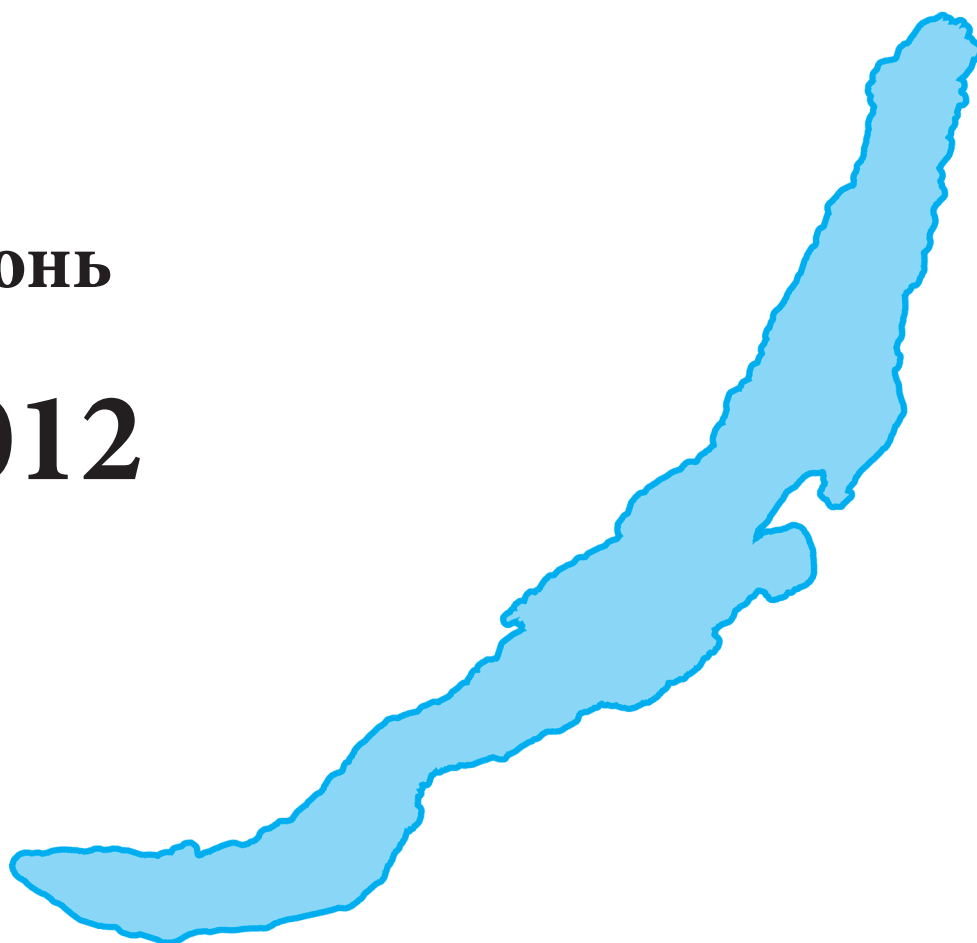
# СИБИРСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

---

**4**

**ИЮНЬ**

**2012**



**Иркутск**

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

### Редакция «Сибирского медицинского журнала» просит внимательно ознакомиться с нижеследующими инструкциями по подготовке рукописей для публикации

«Сибирский медицинский журнал» публикует статьи по проблемам медицинской науки и практического здравоохранения, а также по смежным проблемам.

В журнале публикуются обзоры, оригинальные статьи, сообщения из практики, лекции, информационные сообщения. Все представленные материалы **рецензируются** и обсуждаются редакционной коллегией.

Рукопись статьи должна быть представлена в 2 экземплярах, напечатанной на одной стороне стандартного листа (шрифт Times New Roman 14 пт, межстрочный интервал «полуторный»). Размеры полей: левое — 30 мм, правое — 10 мм, верхнее и нижнее — каждое не менее 20 мм. В электронном виде рукопись статьи представляется на дискете, CD или направляется прикрепленным файлом по электронной почте на адрес: **sibmedjur@mail.ru** в формате rtf (в разделе «тема» письма указывается ФИО автора, город и первые слова названия работы). Таблиц должно быть не более 3-4. При построении таблиц необходимо все пункты представлять отдельными строками. Буквы греческого алфавита в печатном варианте статьи должны быть подчеркнуты красным. Иллюстрации выполняются в графических редакторах в виде чёрно-белых чётких файлов формата \*.jpg, \*.tif с разрешением не менее 300x300 dpi. Рисунки следует выполнять компактно в целях экономии места. Наиболее удобны для типографского воспроизведения рисунки шириной в одну колонку (до 8 см), две колонки (до 17 см) или во весь лист (15x20 см). Рисунки необходимо представлять в отдельных файлах.

К рукописи должно быть приложено официальное направление учреждения, в котором проведена работа. На первой странице рукописи должна быть подпись научного руководителя, заверенная круглой печатью учреждения. На последней странице рукописи должны быть подписи всех авторов. К рукописи прилагаются сведения об авторе, ответственном за контакты с редакцией (фамилия, имя, отчество, полный почтовый адрес, контактные телефоны, адрес электронной почты). Обязательно прилагается почтовый конверт с маркой.

Титульный лист (первая страница) включает на русском и английском языках: **название** работы, **инициалы и фамилии авторов**, полное **название учреждения**, кафедры (отдела, лаборатории и т.п.) с указанием инициалов, фамилии, ученого звания и степени руководителей, а также резюме. **Резюме** должно содержать не менее 400-500 слов, кратко отражать цель, методы, важнейшие результаты исследования с ключевыми числовыми данными. Резюме завершают **ключевые слова** (от 3 до 10), способствующие индексированию статьи в информационно-поисковых системах. В конце приводятся контактные данные авторов, почтовый и электронный адрес, телефон и электронная почта, а также полные фамилии, имена, отчества, должности, ученые степени и звания всех авторов.

Объём оригинальных статей не должен превышать 8 страниц, научного обзора литературы — 12 страниц, казуистических сообщений — 1,5 страницы, аннотаций диссертаций — 0,5 страницы.

**Структура оригинальной статьи включает: введение** — в нем формулируются цель и необходимость проведения исследования, кратко освещается состояние вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации; **материалы и методы** — приводятся количественные и качественные характеристики обследованных (объектов исследования), а также упоминаются все методы исследований, применявшиеся в работе, включая методы статистической обработки данных и программные продукты. **Результаты** следует представлять в логической последовательности в тексте, таблицах и на рисунках. В **обсуждении** выделяются новые и важные аспекты результатов исследования, могут быть включены обоснованные рекомендации и краткое заключение.

**Библиография.** Список литературы составляется в алфавитном порядке (сначала работы отечественных авторов, затем — иностранных), печатается на отдельном листе. В тексте статьи библиографические ссылки обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках, в соответствии с нумерацией в списке литературы. При упоминании отдельных фамилий авторов в тексте им должны предшествовать инициалы (фамилии иностранных авторов даются в оригинальной транскрипции). Рекомендуется в оригинальных статьях цитировать не более 15, а в обзорах — 60 источников. Библиографическое описание литературных источников к статье даётся в соответствии с ГОСТом 7.0.5-2008 «Библиографическое описание документов» (2008). Сокращение слов и словосочетаний приводят также в соответствии с ГОСТом 7.11-78 «Сокращение слов и словосочетаний на иностранных и европейских языках в библиографическом описании произведений печати» и 7.12-77 «Сокращение русских слов и словосочетаний в библиографическом описании произведений печати».

Работа должна быть написана грамотно, текст, таблицы и другие материалы тщательно выверены.

Рукописи, оформленные не в соответствии с указанными правилами, к рассмотрению не принимаются и возвращаются авторам на доработку.

Редколлегия оставляет за собой право сокращать и редактировать работы. Ответственность за содержание статьи и интерпретацию полученных данных несёт автор.

УЧРЕДИТЕЛИ:

Иркутский государственный медицинский университет  
Красноярский государственный медицинский университет  
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Бурятский государственный университет  
Монгольский государственный медицинский университет

## СИБИРСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

Научно-практический журнал, центральное международное издание,  
восемь номеров в год, издается с 1994 года.

Возможно размещение рекламного материала.  
Тарифы на одноразовое размещение формата А4:

черно-белая:	1 стр. — 8000 руб.
	1/2 стр. — 4000 руб.
	1/4 стр. — 2500 руб.
цветная:	1 стр. — 10000 руб.
	1/2 стр. — 5000 руб.
	1/4 стр. — 3000 руб.

---

Компьютерная верстка: *Н.И. Долгих*  
Ответственный за выпуск: *доц. А. Н. Калягин*.

Подписано в печать 25.05.2012  
Тираж 1000 экз. Заказ \_\_\_\_\_. Цена договорная.

Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати,  
телерадиовещанию и средств массовых коммуникаций, рег. ПИ № 77-15668 от 22 июля 2003 г.  
Адрес редакции: 664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1.

Отпечатано по заказу Иркутского государственного медицинского университета  
в ООО «Издательство Отгиск», 664025, Иркутск, ул. 5 Армии, 26. Телефон: 34-32-34.

Ключевое название: *Sibirskij medicinskij zurnal*  
Сокращенное название *Sib. med. z.*  
EAN13:9771815757380

Подписной индекс  
в каталоге «Пресса России» 10309

Иркутский государственный медицинский университет  
Красноярский государственный медицинский университет  
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Бурятский государственный университет  
Монгольский государственный медицинский университет

---

# СИБИРСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

---

**№ 4**

**ИЮНЬ**

**2012**

**ТОМ 111**

**Редакционная коллегия:**

**Главный редактор** А.А. Майборода, проф.,  
д.б.н.

**Зам. гл. редактора** А.В. Щербатых, проф., д.м.н.  
А.Н. Калягин, проф., д.м.н.  
Ю.В. Зобнин, доц., к.м.н.

**Члены редколлегии:** А.Д. Ботвинкин, проф., д.м.н.  
Ю.Н. Быков, проф., д.м.н.  
Г.М. Гайдаров, проф., д.м.н.  
В.И. Злобин, проф., д.м.н.  
Л.П. Игнатьева, проф., д.б.н.  
В.Г. Лалетин, проф., д.м.н.  
И.В. Малов, проф., д.м.н.  
С.Б. Пинский, проф., д.м.н.  
Л.А. Решетник, проф., д.м.н.  
М.Ф. Савченков, проф., д.м.н.  
Л.А. Усов, проф., д.м.н.

**Отв. секретарь:** С.И. Горшунова

---

Научно-практический рецензируемый журнал  
Основан в 1994 г.  
8 номеров в год

**Иркутск**

## ГЛУБОКОУВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

«Сибирский медицинский журнал» издается Иркутским государственным медицинским университетом. Соучредителями научно-практического журнала при его создании в 1994 году были Алтайский и Красноярский медицинские институты, Иркутский территориальный фонд обязательного медицинского страхования и др. В настоящее время соучредителями журнала являются Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Бурятский государственный университет и Монгольский государственный медицинский университет. С 2004 года журнал выходит с регулярностью восемь номеров в год. Кроме того, издаются дополнительные (специальные) номера журнала. Редакционную коллегию и совет журнала возглавляет почетный ректор ИГМУ, профессор А.А. Майборода. В течение 12 лет заместителем главного редактора была профессор Т.П. Сизых. С 2006 года заместителями главного редактора стали профессор А.В. Щербатых, доцент Ю.В. Зобнин, доцент А.Н. Калягин, .

Журнал традиционно включает следующие разделы и рубрики: «Научные обзоры», «Оригинальные исследования», «Лекарственные растения», «Образ жизни, экология», «Здоровье, вопросы организации здравоохранения», «Случаи из практики», «Страницы истории науки и здравоохранения», «Лекции», «Педагогика», «Основы духовной культуры», «Аспекты медицинского права и этики», «Дискуссия», «Юбилейные даты». Публикуются реферативные сообщения о защищенных диссертациях, аннотации и рецензии монографических изданий, информационные сообщения о состоявшихся научных форумах.

Редакционная коллегия и совет журнала выражают надежду, что публикуемые материалы будут интересны для научных работников и практических врачей и приглашают их к сотрудничеству.

В 2012 году стоимость публикации в журнале статьи объемом до 8 страниц — 2400 руб., при превышении этого объема взимается плата 300 руб. за каждую последующую страницу. **Публикации аспирантов принимаются бесплатно.** Стоимость годовой подписки на журнал в 2012 г. составляет 3000 руб. (с учетом НДС), одного номера — 375 руб. Почтовая рассылка номеров журнала осуществляется по предоплате.

Расчетный счет: ГРКЦ ГУ Банка России по Иркутской области г. Иркутск ИНН 3811022096 КПП 381101001 УФК по Иркутской области (ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России р/сч 40501810000002000001) БИК 042520001 ОГРН 1923801539673 ОКПО 01963054 ОКАТО 2540100000 Назначение платежа: (000 0 00 00000 00 0000 130, л/сч. 20346U95880) доходы от издания реализации научн., учебно-методической продукции (оплата) за подписку на (публикацию статьи Ф.И.О.) «Сибирского медицинского журнала».

### Наш адрес:

664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,  
Иркутский государственный медицинский университет, Редакция «Сибирского медицинского журнала».  
Статьи, копии квитанций о приеме платежей и др. отправлять по адресу только простыми письмами.

E-mail: [sibmedjur@mail.ru](mailto:sibmedjur@mail.ru)

Телефоны редакции:  
(3952) 70-86-61, 70-37-22, 24-36-61

### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

И.П. Артюхов, проф., д.м.н.	(Красноярск)
А.В. Говорин, проф., д.м.н.	(Чита)
С.М. Николаев, проф., д.м.н.	(Улан-Удэ)
С.В. Шойко, д.э.н.	(Иркутск)
В.В. Шпрах, проф., д.м.н.	(Иркутск)

Рефераты статей «Сибирского медицинского журнала» публикуются в «Реферативном журнале ВИНИТИ РАН» (серия «Медицина»).  
Полные тексты помещаются на сайте «Научной электронной библиотеки» [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)  
и на сайте Иркутского государственного медицинского университета [www.ismu.irkutsk.ru](http://www.ismu.irkutsk.ru)

«Сибирский медицинский журнал» с 2002 г. входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук».

Территория распространения журнала — Российская Федерация, страны СНГ, зарубежные страны.  
Подписной индекс: 10309 в каталоге «Пресса России»

## СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
«КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ И ДРУГИЕ ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕНОСИМЫЕ КЛЕЩАМИ»,  
ПОСВЯЩЕННАЯ 75-ЛЕТИЮ ОТКРЫТИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

## ПЕРЕДОВАЯ

Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Рудакова С.А., Решетникова Т.А., Абрамова Н.В., Коломеец А.Н. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения риккетсиозов и сочетанных инфекций в России ..... 5

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Злобин В.И., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А., Абмэд Д., Батаа Ж., Цэрэнновов Д., Отгонбаатар Д. Вирус клещевого энцефалита в Монголии ..... 9
- Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Майстровская О.С., Беликов С.И., Кондратов И.Г. Вирулентность штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных от людей с разными формами инфекции ..... 12
- Пеньевская Н.А., Вайтович М.А., Рудаков Н.В., Рудакова С.А. Методология оценки эпидемиологической эффективности специфической профилактики клещевого энцефалита (на примере Омской области) ..... 16
- Ливанова Н.Н., Боргояков В.Ю., Ливанов С.Г., Фоменко Н.В. Характеристика природных очагов клещевых боррелиозов Новосибирского научного центра и Новосибирской области ..... 20
- Морозова В.В., Фоменко Н.В., Стронин О.В., Матвеев А.Л., Тикунова Н.В. Репертуар генов сегментов, кодирующих одноцепочечные антитела человека, направленные к антигенам *Borrelia garinii* ..... 23
- Тюлько Ж.С., Якименко В.В. Вариабельность нуклеотидных последовательностей геномов вируса клещевого энцефалита, связанная с их структурой ..... 27
- Байков И.К., Матвеев Л.Э., Матвеев А.Л., Тикунова Н.В. Сравнительный анализ вариабельных доменов моноклональных антител против вируса клещевого энцефалита ..... 30
- Бондаренко Е.И., Тимофеев Д.И., Фоменко Н.В., Якименко В.В., Таницев А.К., Рар В.А. Комплексный подход к выявлению возбудителей инфекций, переносимых клещами, с помощью ПЦР-анализа с детекцией в режиме реального времени ..... 33
- Бабкин И.В., Тикунова Н.В., Васькова А.А., Бабкина И.Н., Фоменко Н.В. Создание штаммов *Escherichia coli*, продуцирующих рекомбинантный белок Р83/100 *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* ..... 36
- Шкода О.С., Чикова Е.Д., Фоменко Н.В., Власов В.В., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю. Взаимосвязь циркулирующих ДНК крови с особенностями и характером иммунного ответа у больных иксодовым клещевым боррелиозом на ранних стадиях ..... 39
- Ткачев С.Е., Боргояков В.Ю., Ливанова Н.Н., Панов В.В. Встречаемость генетических типов и подтипов вируса клещевого энцефалита на территории Новосибирского научного центра ..... 41
- Тимофеев Д.И., Фоменко Н.В., Иванов М.К. Экстракция нуклеиновых кислот из клещей: проблемы и возможности стандартизации ..... 45
- Ковалев С.Ю., Мухачева Т.А., Кокорев В.С., Беляева И.В. Референсный штамм Софьин вируса клещевого энцефалита и проблема его аутентичности ..... 48
- Боргояков В.Ю., Васькова А.А., Чикова Е.Д., Фоменко Н.В. Динамика зараженности иксодовых клещей боррелиозом и клещевым энцефалитом в Новосибирском научном центре Сибирского отделения РАН в 2009-2011 гг. .... 52
- Самарджич С., Парлич М., Стеванович Я., Самарджич В., Михайлович Б., Маринкович Т. Первый случай геморрагической лихорадки Крым-Конго на территории Косова ..... 54
- Лепехин А.В., Ильинских Е.Н., Лукашова Л.В., Дорошенко А.С., Замятина Е.В. Изучение клинической эффективности профилактического применения йодантипирина при клещевом энцефалите ..... 55
- Жукова Н.Г., Пинегина Т.С., Полторацкая Т.Н., Насырова Р.Ф., Перминов В.А., Рассолова Л.В., Удинцева И.Н., Першина С.А., Пирогова Н.П., Шихин А.В. Исходы инфекций, переносимых иксодовыми клещами в Томской области ..... 58
- Фоменко Н.В., Шперлинг М.М., Боргояков В.Ю., Епихина Т.И., Романова Е.В. Сравнительный анализ выявления ДНК боррелий и противоборрелиозных антител ..... 61
- Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А., Чапоргина Е.А., Арбатская Е.В., Петрова И.В., Савелькаева М.В., Горбунова Е.Л., Туник Т.В. Эколого-географическая характеристика обращаемости людей, пострадавших от укусов клещей в Иркутской области и за ее пределами ..... 64
- Балахонов С.В., Никитин А.Я., Андаев Е.И., Алленов А.В., Борисенко Е.А., Зверева Т.В., Гордейко Н.С., Краснощеклов В.Н., Адельшин Р.В., Борисова Т.И., Вержуцкая Ю.А., Вершинин Е.А., Сидорова Е.А. Эколого-паразитологическая характеристика совмещенных очагов инфекций, передаваемые клещами, на территории проведения саммита АТЭС (2012 г.) ..... 67
- Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И. Специфическая и неспецифическая профилактика клещевого энцефалита и иксодовых клещевых боррелиозов на Южном Урале ..... 71
- Сидорова Е.А., Карань Л.С., Борисова Т.И., Адельшин Р.В., Андаев Е.И., Трухина А.Г., Туранов А.О., Нагибина О.А., Погодина В.В., Лапа С.Э., Балахонов С.В. Генетическое разнообразие популяции вируса клещевого энцефалита на территории национального парка «Алханай» (Забайкальский край) ..... 75
- Черникова А.А., Гордеев А.В., Шаркова В.А., Хезай Т.С. Очаговые формы клещевого энцефалита у детей Приморья ..... 78
- Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Ткачев С.Е., Карань Л.С., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Сунцова О.В., Парамонов А.И., Черноиванова О.О., Ревизор А.О., Злобин В.И. Комплексная характеристика оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на территории Восточной Сибири ..... 80
- Дружинина Т.А., Баранова Н.С. Клещевой вирусный энцефалит в Ярославской области: особенности эпидемиологии, клиники, профилактики ..... 85
- Глушакова Л.И., Корабельников И.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Микрюкова Т.П., Кононова Ю.В., Коновалова

С.Н., Тупота Н.Л., Карташов М.Ю., Чаусов Е.В., Локтев В.Б., Егорова Ю.И. Выявление возбудителей заболеваний в <i>Ixodes persulcatus</i> на территории Республики Коми . . . . .	88
Ястребов В.К., Рудаков Н.В., Шпынов С.Н. Трансмиссивные клещевые природно-очаговые инфекции в Российской Федерации: тенденции эпидемического процесса, актуальные вопросы профилактики . . . . .	91
Андаев Е.И., Борисова Т.И., Сидорова Е.А., Адельшин Р.В., Никитин А.Я., Балахонов С.В. Изоляция и молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита от иксодовых клещей с острова Русский (Приморский край) . . . . .	93

#### НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Павлова Л.С., Зыкова Т.А. Особенности метаболизма у пациентов с акромегалией до и после патогенетической терапии . . . . .	97
Вартанов Т.О. Основные этапы внедрения технологии безметалловых конструкций в практику врача-стоматолога . . . . .	102

#### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хохлова Н.И., Толоконская Н.П., Василец Н.М., Проворова В.В. Математическая модель прогноза тяжелых форм острого вирусного гепатита В на основе интегральной клинической оценки эндогенной интоксикации . . . . .	104
Куркин Д.В., Волотова Е.В., Литвинов А.А., Бакулин Д.А., Озеров А.А. Исследование церебропротекторной и противогипоксической активности производных $\gamma$ -окси- и $\gamma$ -аминомасляных кислот . . . . .	107
Горбунова Е.В., Сизова И.Н., Мамчур С.Е., Жучкова Е.А., Мамчур И.Н. Показатели центральной гемодинамики как критерий эффективности обучающей программы у пациентов с протезированными клапанами сердца . . . . .	109
Попов П.В., Сыропятов Б.Я., Одегова Т.Ф. Зависимость изменений микрофлоры биоценозов и её резистентности у крыс от способа введения и длительности применения цефтриаксона . . . . .	112
Клинышкова Т.В., Самосудова И.Б., Каратюк Т.И. Результаты генотипирования вируса папилломы человека и оценки онкобелка E7 у больных с цервикальным предраком . . . . .	114
Савченко И.А., Рукиша Т.Г. Применения лиганда TSPO для коррекции изменений, вызванных воздействием ультрафиолетового излучения . . . . .	117

#### ЗДОРОВЬЕ, ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Тихонова Н.В., Приходько Е.А., Масленникова С.А., Ваземиллер О.А. Современные подходы к профилактике репродуктивного здоровья учениц старших классов г. Красноярск . . . . .	120
Алексеевская Т.И., Белых С.П. Уровень госпитализации больных с черепно-мозговой травмой, степень тяжести пострадавших и исходы лечения в зависимости от наличия алкоголя в крови . . . . .	122

#### ОБРАЗ ЖИЗНИ. ЭКОЛОГИЯ

Пашков А.П., Лукьяненко Н.В., Колядо В.Б. Особенности эпидемического процесса хронического вирусного гепатита В в крупном агропромышленном регионе (на примере Алтайского края) . . . . .	124
Веремчук Л.В., Кикун П.Ф., Симонова И.Н. Влияние эколого-гигиенических характеристик внешней среды на иммунно-метаболические показатели крови населения с заболеваниями органов дыхания . . . . .	126

#### ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ

Зыкова И.Д., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла корней и корневищ <i>Filipendula Ulmaria</i> (L) <i>Maxim</i> . . . . .	130
Спрыгин В.Г. Применение олигомерных проантоцианидинов для профилактики метаболических нарушений углеводного обмена в печени крыс при поражении этиловым спиртом . . . . .	132
Банзаракшеев В.Г. Антиоксидантная активность комплексного фитосредства при этанол-индуцированной дислипотеинемии . . . . .	135

#### СЛУЧАИ ИЗ ПРАКТИКИ

Чикинев Ю.В., Дробязгин Е.А., Беркасова Е.В., Кутепов А.В., Судовых И.Е., Коробейников А.В., Котельников А.И. Сравнительная характеристика эзофагогастро- и эзофагоколопластики при доброкачественных заболеваниях пищевода . . . . .	137
---	-----

#### ЛЕКЦИИ

Балабина Н.М. Особенности лекарственной терапии пожилого пациента в условиях терапевтического участка . . . . .	139
---	-----

#### ПЕДАГОГИКА

Калуцкий П.В., Медведева О.А., Ефремова Н.Н., Климова Л.Г., Жилиева Л.В. Рабочая тетрадь как составная часть самостоятельной работы студентов в инновационном социально-ориентированном образовательном процессе . . . . .	142
--	-----

#### ЮБИЛЕИ

Киборт Рудольф Вадимович (к 75-летию со дня рождения) . . . . .	144
---	-----

# МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ И ДРУГИЕ ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕНОСИМЫЕ КЛЕЩАМИ», ПОСВЯЩЕННАЯ 75-ЛЕТИЮ ОТКРЫТИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

## ПЕРЕДОВАЯ

© РУДАКОВ Н.В., ШПЫНОВ С.Н., САМОЙЛЕНКО И.Е., КУМΠΑН Л.В., РУДАКОВА С.А., РЕШЕТНИКОВА Т.А., АБРАМОВА Н.В., КОЛОМЕЕЦ А.Н. - 2012  
УДК: 616.993

### ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ РИККЕТСИОЗОВ И СОЧЕТАННЫХ ИНФЕКЦИЙ В РОССИИ

Николай Викторович Рудаков, Станислав Николаевич Шпынов, Ирина Евгеньевна Самойленко,  
Людмила Валерьевна Кумпан, Светлана Анатольевна Рудакова, Татьяна Александровна Решетникова,  
Наталья Валерьевна Абрамова, Анна Николаевна Коломеец  
(Омский НИИ природно-очаговых инфекций, директор – д.м.н., проф. Н.В. Рудаков)

**Резюме.** В работе представлен анализ развития и современного состояния учения о риккетсиях и риккетсиозах. Достигнутый прогресс в изучении риккетсий связан с совершенствованием методов их выявления и изоляции – использованием живых биотехнологических систем (культивированием в экспериментальных линиях клещей, чувствительных линиях эукариотических клеток) в сочетании с методами генотипирования и классическими риккетсиологическими методами. Разработка и использование новых методологических подходов к изучению риккетсий и других клещевых альфа-протеобактерий привело к существенному пересмотру представлений о генетическом разнообразии, гетерогенности антигенных и биологических свойств, экологии и вкладе в инфекционную патологию различных представителей порядка *Rickettsiales* в России.

**Ключевые слова:** риккетсии, риккетсиозы, альфа-протеобактерии, клещевой риккетсиоз, природные очаги.

### FUNDAMENTAL AND PRACTICAL ASPECTS OF STUDY OF RICKETTSIOSES AND MIXED INFECTIONS IN RUSSIA

N.V. Rudakov, S.N. Shpynov, I.E. Samoylenko, L.V. Kumpan, S.A. Rudakova, T.A. Reshetnikova,  
N.V. Abramova, A.N. Kolomeetz  
(Omsk Research Institute of Natural Foci Infections of Rospotrebnadzor)

**Summary.** The paper presents an analysis of development and current status of the doctrine about rickettsia and rickettsiosis. The progress in the study of *Rickettsia* is associated with improved methods for their detection and isolation – using live biotechnological systems (cultivation in the experimental lines of ticks-sensitive lines of eukaryotic cells) in combination with the methods of genotyping and classical rickettsial methods. The development and use of new methodological approaches to the study of tick-borne rickettsiae and other alpha-proteobacteria led to an important revision of ideas about genetic diversity, heterogeneity of antigenic and biological characteristics, ecology and contribution to the infectious pathology of various representatives of the kind *Rickettsiales* in Russia.

**Key words:** rickettsiae, rickettsioses,  $\alpha$ -Proteobacteria, tick-borne rickettsiosis, natural foci.

Термин “риккетсии”, введенный Н. da Rocha-Lima (1916) [15], объединяет обширную группу альфа-протеобактерий, тесно связанных в своей жизнедеятельности с членистоногими (клещи, вши, блохи) и обладающих рядом общих свойств:

а) являются облигатными внутриклеточными паразитами, не способными к росту на питательных средах; требуют специализированных методов изучения (риккетсиологических);

б) имеют ряд особенностей в строении, размножении, биохимических, генетических и иммунобиологических характеристиках;

в) вызываемые ими заболевания (риккетсиозы) характеризуются своеобразием клиники и эпидемиологии.

Традиционно внутриклеточные бактерии беспозвоночных переносчиков и их теплокровных хозяев являются объектом изучения риккетсиологии. В последние годы изменились представления о таксономии, значении риккетсий в инфекционной патологии, их роли как вероятных предшественников митохондрий. Указанные свойства риккетсий определяют фундаментальное зна-

чение риккетсиологии как науки, объект которой существенно отличается от объектов других микробиологических наук – вирусологии, классической бактериологии, протозоологии, микологии.

Порядок *Rickettsiales* объединяет альфа-протеобактерии семейств *Rickettsiaceae* (рода *Rickettsia* и *Orientia*) и *Anaplasmataceae* (рода *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*) [16]. Среди них особое место занимают представители рода *Rickettsia*. В составе рода традиционно выделяли две группы – клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ) и сыпного тифа (СТ). Stothard и Fuerst [33] на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S rRNA гена предлагают выделить предковую или “ancestral” группу, предшествующую разделению риккетсий на группы КПЛ и СТ.

В соответствии с критериями идентификации новых риккетсий [18], разработанными на основе определения нуклеотидных последовательностей генов, подтверждена видовая принадлежность 20 представителей рода *Rickettsia*. В настоящее время List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Rickettsia* вклю-



чает 27 видов риккетсий (<http://www.bacterio.cict.fr/qr/rickettsia.html>). За последние 20 лет этот список пополнили 14 риккетсий, которые получили официальный статус вида: *R. aeschlimannii* (1997), *R. africana* (1996), *R. asiatica* (2006), *R. felis* (2001), *R. heilongjiangensis* (2006), *R. helvetica* (1993), *R. honei* (1998), *R. hoogstraalii* (2010), *R. japonica* (1992), *R. massiliae* (1993), *R. peacockii* (1997), *R. raoultii* (2008), *R. slovacica* (1998), *R. tamurae* (2006). *R. monacensis* была описана как вид в 2002 г., но в официальном перечне пока не включена.

К риккетсиям группы СТ отнесены два вида риккетсий – *Rickettsia prowazekii* и *R. typhi*, к группе предшественников – *R. canadensis*, *R. bellii* и *Candidatus R. tarasevichiae*. Количество риккетсий группы КПЛ, имеющих статус вида, постоянно увеличивается. К ним относятся классические патогены (9 видов) – *R. akari*, *R. australis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. heilongjiangensis*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, новые патогены (7 видов) – *R. aeschlimannii*, *R. africana*, *R. slovacica*, *R. parkeri*, *R. monacensis*, *R. helvetica*, *R. raoultii*, риккетсии с недоказанной патогенностью для человека (8 видов) – *R. andeanae*, *R. asiatica*, *R. hoogstraalii*, *R. massiliae*, *R. montanensis*, *R. peacockii*, *R. rhipicephali*, *R. tamurae*, кандидаты в новые виды *Candidatus R. amblyomii*, *Candidatus R. barbariae*, *Candidatus R. cooleyi*, *Candidatus R. kellyi* (новый патоген), *Candidatus R. principis*, *Candidatus R. rioja* (новый патоген), *Candidatus R. tasmanensis*. Следовательно, к настоящему времени известно 16 видов патогенных риккетсий группы КПЛ, восемь видов с недоказанной патогенностью и как минимум семь кандидатов в новые виды, из них два с доказанной патогенностью для человека.

На территории России регистрируют заболевания двумя риккетсиозами группы КПЛ – клещевым риккетсиозом (КР) или Сибирским клещевым тифом (СКТ) в официальной регистрации (форма №1 Росстата «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») и Астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ). *R. sibirica* – возбудитель КР, переносчики – клещи рода *Dermacentor* и *Haemaphysalis*, эпидемически активные очаги распространены в Азиатской части России и в Казахстане. Классические исследования в природных очагах этой инфекции были проведены сотрудниками НИИЭМ им. Гамалеи РАМН в 40-е - 50-е годы прошлого века, в дальнейшем эти исследования продолжены при участии Омского НИИ природно-очаговых инфекций и Владивостокского НИИЭМ СО РАМН, других НИИ и ВУЗов Сибири и Дальнего Востока [3,6,7].

В Омском НИИ природно-очаговых инфекций проведен цикл работ по изучению очагов КР и экологии риккетсий группы КПЛ на эндемичных и неэндемичных в отношении этой инфекции территориях России и Казахстана [4,23,24,25,26]. Целью нашей работы была оптимизация методических и методологических подходов к изоляции и изучению представителей порядка *Rickettsiales* и выявление спектра и распространения клещевых альфа1-протеобактерий и вызываемых ими заболеваний на изучаемых территориях.

Исследования в этом отношении в Омском НИИПИ были инициированы по предложению академика И.В. Тарасевич (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) и профессора David H. Walker (США, Техасский университет, Гальвестон). В дальнейшем новые направления молекулярно-генетических исследований были реализованы в рамках международного сотрудничества НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (академик И.В. Тарасевич) и Средиземноморского университета в Марселе, Франция (профессор Didier Raoult).

Уже в первый период изучения КР возникали вопросы об отличиях возбудителя на различных территориях. В связи с этим Е.Н. Павловский указывал на существование на Дальнем Востоке России нескольких форм клещевых «сыпнотифозных лихорадок» [2].

Вторым (после КР) регистрируемым риккетсиозом группы КПЛ в России оказалась Астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ), целенаправленное изучение ко-

торой было начато сотрудниками Всесоюзного центра по риккетсиозам совместно с астраханскими коллегами в 1989-1990 гг. [8,36].

Наряду с классическим генотипом – *R. sibirica sensu stricto*, широко распространенным по нашим данным в нозоареале КР, на Дальнем Востоке РФ и в Северном Китае, в клещах *Dermacentor silvarum* выявляют генотип *R. sibirica BJ-90*. Штамм “Приморье-32/84” *R. sibirica subsp. BJ-90* выделен из клещей *D. silvarum* в нашей лаборатории Т.А. Решетниковой за шесть лет до изоляции первых китайских штаммов этой риккетсии (1990 г.) [31].

*R. heilongjiangensis* формально описан как новый вид в 2003 г. [18]. Случаи “клещевого риккетсиоза”, вызванные *R. heilongjiangensis*, выявлены ретроспективно в Хабаровском крае [21]. Реликтовый (последствие оледенений) характер распространения *H. concinna* в послеледниковой Евразии определяет ареал этих переносчиков в виде отдельных “пятен” в различных частях нозоареала КР [6]. *R. heilongjiangensis* выявлена в “пятнах” *H. concinna* в пределах нозоареала КР на Дальнем Востоке (Приморский край, клещи *H. concinna*), а также в эпидемически наиболее напряженных очагах КР в Алтайском (*H. concinna*) и Красноярском (*H. concinna*, *D. nuttalli*) краях [5,10,30].

Необходимо отметить, что штаммы *R. heilongjiangensis* были изолированы в Омском НИИ природно-очаговых инфекций значительно раньше первых «китайских» штаммов, однако они идентифицированы лишь в последние годы. Первый штамм нового вида риккетсий выделил В.К. Ястребов в 1966 г. из клещей *H. concinna*, собранных в Алтайском крае. Еще два штамма *R. heilongjiangensis*, выделенные из клещей *H. concinna*, собранных в Приморском крае в 1981 г., хранятся в нашей коллекции [5,31].

*R. helvetica* широко распространена в странах Европы в клещах *Ixodes ricinus*. С этим видом риккетсий связывают лихорадочные заболевания, сопровождающиеся поражением кровеносных сосудов и развитием перикардитов. Методами генотипирования получены данные, свидетельствующие о возможной этиологической роли *R. helvetica* в развитии острых лихорадочных заболеваний после присасывания клещей в Пермском крае [1]. Ранее риккетсии, генетически близкие к *R. helvetica*, выявлены нами в клещах *Ixodes persulcatus* в Омской области [12]. Полученные данные свидетельствуют о вероятности широкого распространения *R. helvetica* – подобного риккетсий в ареале клещей *I. persulcatus* – комплекса в России. *R. helvetica* и близкие к *R. helvetica* виды риккетсий – *R. asiatica sp.nov.* и *R. tamurae sp.nov.* выявлены в клещах родов *Ixodes* и *Amblyomma* в Японии [17,19,20].

На ряде территорий Европы установлено распространение *R. slovacica* [14,34,35]. В 2001 г. *R. slovacica* генотипирована нами в иксодовых клещах рода *Dermacentor* на двух административных территориях Европейской части России – в Воронежской области и Ставропольском крае [9]. Недавно идентифицирован штамм *R. slovacica*, выделенный в Мокроусовском районе Курганской области (Зауралье) в 1969 г. д.м.н. М.С. Шайманом из клещей *D. marginatus* [31]. Он является единственным штаммом *R. slovacica*, выделенным в России, изолирован практически одновременно с первыми штаммами, выделенными в бывшей Чехословакии. *R. slovacica* рассматривается как агент лимфоаденопатии от присасывания клеща – синдрома TIBOLA: от «tick-borne lymphadenopathy». Случаев синдрома TIBOLA в России до настоящего времени не зарегистрировано.

Патогенная для человека *R. aeschlimannii* генотипирована нами в клещах *Haemaphysalis punctata* из Алма-Атинской области Казахстана, где в предыдущие десятилетия зарегистрированы случаи “КР” [30]. В дальнейшем эта риккетсия была выявлена в Ставропольском крае в клещах *Hyalomma marginatum marginatum* [13].

Три новых, тесно генетически связанных генотипа

риккетсий (*R. sp.RpA4*, *R. sp.DnS14*, *R. sp.DnS28*), впервые описанных в Астраханской области (*R. sp.RpA4*) и в республике Алтай (*R. sp.DnS14*, *R. sp.DnS28*) Е.Б. Рыдковой с нашим участием [27], были выявлены нами в клещах рода *Dermacentor* в очагах КР и на свободных от этой инфекции территориях России и Казахстана [11,32]. Патогенность этих генотипов риккетсий для человека окончательно не установлена, однако выяснено не только широкое распространение этих риккетсий в Европе, но и их вероятная роль в возникновении синдрома TIBOLA. Девять штаммов этих генотипов риккетсий, описанных к настоящему времени как новый вид риккетсий группы КПЛ *Rickettsia raoultii sp.nov.* [22], депонировано нами во Всероссийском музее риккетсиальных культур [28].

Впервые описана *R. tarasevichiae*, отнесенная нами к группе предшественников и выявлена высокая инфицированность клещей *I. persulcatus* этой риккетсией в России [29]. Изолировано на культурах клеток Vero 14 штаммов, восемь из них депонированы во Всероссийском музее риккетсиальных культур [28].

Показано распространение в клещах *I. persulcatus* на территориях Сибири и Дальнего Востока *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*, "Schotti variant", в *H. concinna* на Дальнем Востоке – *A. bovis*, с использованием культур клеток изолирован штамм возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота – *Anaplasma sp.Omsk*. Наиболее распространенным заболеванием, вызываемым представителями семейства *Anaplasmataceae* (*Anaplasma phagocytophilum*), оказался ГАЧ, серологически верифицируемый в России в ареалах распространения клещей *Ixodes ricinus* – *Ixodes persulcatus* с помощью ИФА.

В соответствии с классическими подходами к изучению риккетсий предусмотрено их выделение на морских свинках и куриных эмбрионах, что не позволяет изучить весь спектр микроорганизмов порядка *Rickettsiales* (выявляются преимущественно патогенные риккетсии). Применение только молекулярно-генетических методов исследования, напротив, занижает выявление патогенных риккетсий. Мы считаем обязательным сочетание классических риккетсиологических и дополнительных методов с использованием живых биотехнологических систем (культуры клеток, экспериментальных линий переносчиков) с современными молекулярно-биологическими методами идентификации риккетсий.

Разработаны новые диагностические подходы, основанные на применении ИФА- и ПЦР-технологий. Использование иммуноферментного анализа на основе коммерческого диагностикума риккетсиозного Сибирика сухого для РСК позволяет почти вдвое, в сравнении с РСК, повысить эффективность верификации диагноза «клещевой риккетсиоз» за счет повышения чувствительности предложенного теста. Применение

одной схемы постановки ИФА с двумя различными конъюгатами позволяет выявлять антитела классов М и G, в отличие от РСК, которая выявляет только суммарные антитела без дифференцирования по классам иммуноглобулинов.

Разработанная нами методика ПЦР-рестрикционного анализа может быть использована для дифференциации основных видов риккетсий, выявляемых в природных очагах Западной Сибири. Применение рестрикционного анализа с использованием эндонуклеаз (*RsaI* и *PstI*) позволило четко дифференцировать две группы риккетсий: *R. sibirica* и *R. sibirica subsp. BJ-90* (патогенных для человека) от геновариантов *R. raoultii* с неустановленной патогенностью на эндемичных и неэндемичных по клещевому риккетсиозу территориях.

На основе использования указанных методов был разработан алгоритм детекции и идентификации риккетсий группы КПЛ в клиническом и полевом материале, что способствует более ранней и эффективной верификации диагнозов и более раннему и целенаправленному лечению больных инфекциями, передающимися иксодовыми клещами.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые научные данные, свидетельствующие о широком распространении в Сибири и на Дальнем Востоке новых видов арбориккетсий (риккетсий, экологически связанных с иксодовыми клещами). Установлено, что наряду с традиционно известным видом риккетсий группы КПЛ – *Rickettsia sibirica* – возбудителем клещевого риккетсиоза, в России и Казахстане с иксодовыми клещами связаны новые для науки виды риккетсий: *Rickettsia tarasevichiae*, *R. raoultii*, новые для России и указанных регионов виды: *R. slovacica*, *R. heilonjiangensis*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, а также новые представители порядка *Rickettsiales* – *Anaplasma phagocytophilum* (возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза – ГАЧ), *Ehrlichia muris* (предполагаемый агент моноцитарного эрлихиоза человека – МЭЧ), *Anaplasma sp.Omsk* и *Anaplasma bovis* (агенты анаплазмоза крупного рогатого скота). Анализ распространения риккетсий группы КПЛ показал их тесные экологические связи с определенными видами переносчиков. В целом выявлено распространение на территории России и Казахстана более 15 клещевых альфа1- протеобактерий. Выделены с помощью культур клеток Vero и клещевых моделей, идентифицированы и депонированы во Всероссийском музее риккетсиальных культур уникальные штаммы *Rickettsiales* новых генотипов.

Полученные результаты являются обоснованием необходимости организации дифференциальной лабораторной диагностики инфекций, передающихся иксодовыми клещами в условиях сочетанности природных очагов, для оптимизации этиотропной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В. и др. Микроорганизмы порядка *Rickettsiales* у таежного клеща (*Ixodes persulcatus sch.*) в Предуралья // Вестник РАМН. – 2008. – №7. – С.47-50.
2. Павловский Е.Н. Работы по паразитологии в ВИЭМ (К 50-летию Всесоюзного института экспериментальной медицины им. А.М.Горького) // Мед.паразитол. – 1941. – Т. 10. №1. – С.137-138.
3. Рудаков Н.В., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз. – Омск: ОмГМА, 2001. – 120 с.
4. Рудаков Н.В. Таксономия и экология риккетсий // Омский научный вестник. – 2006. – Т. 35. №1. Прил. – С.87-89.
5. Рудаков Н.В., Решетникова Т.А., Шпынов С.Н. М.С. Шайман – основатель Омской школы риккетсиологов // Материалы 6 межрег. научно-практ. конф «Актуальные вопросы здоровья населения Сибири: гиг. и эпид. аспекты». – Омск, 2006. – С.10-13.
6. Тарасевич И.В., Панфилова С.С., Фетисова Н.Ф.

Экологическая география риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки // Итоги науки и техники. Серия медицинская география. – М., 1977. – Т. 8. – С.6-121.

7. Тарасевич И.В., Боев Б.В., Висмэн Ч.Л. и др. Эпидемиологические и экологические аспекты риккетсиозов // Проблемы инфектологии / Под ред. С.В. Прозоровского. – М.: Медицина, 1991. – С.367-381.

8. Тарасевич И.В. Астраханская пятнистая лихорадка. – М.: Медицина, 2002. – 176 с.

9. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Тарасевич И.В. и др. Новые данные о распространении *Rickettsia slovacica* в Евразии // Природноочаговые болезни человека: Республ. сб. научных работ, посвященный 80-летию Омского НИИПИ. – Омск, 2001. – С.80-83.

10. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Первое выявление *Rickettsia heilonjiangensis* в клещах *Haemaphysalis concinna* в России // ЗНиСО. – 2003. – Т. 129. №12. – С.16-20.

11. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Самойленко И.Е. и др.

Генетическая идентификация риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, изолированных в очагах клещевого риккетсиоза // Журнал микробиологии. – 2004. – №5. – С.43-48.

12. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Выявление новых генотипов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки на юге Урала, в Сибири, на Дальнем Востоке и в Казахстане // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2005. – №1. – С.23-27.

13. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Матущенко А.А. и др. Выявление геноварианта *R. aeschlimannii* в клещах *Hyalomma marginatum marginatum*, собранных в очаге Крымской-Конго геморрагической лихорадки в Ставропольском крае // Омский научный вестник. – 2006. – Т. 35. №1. – С.101-103.

14. Brezina R.J., Rehacek J., Majorska M. Two strains of rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification // Acta virol. – 1969. – Vol. 13. – P.142-145.

15. da Rocha-Lima H. Zur Aetiologie des Fleckfiebers // Zbl. allg. Path. – 1916. – №27. – P.45-50.

16. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., et al. Reorganization of genera in families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – Vol. 51. – P.2145-2165.

17. Fournier P.E., Fujita H., Takada N., et al. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan // J Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. №6. – P.2176-81.

18. Fournier P.-E., et al. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New *Rickettsia* Isolates and Description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. №12. – P.5456-5465.

19. Fournier P.E., Takada N., Fujita H., et al. *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56 (Pt. 7). – P.1673-675.

20. Fujita H., Fournier P.E., Takada N., et al. *Rickettsia asiatica* sp. nov., isolated in Japan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56 (Pt. 10). – P.2365-2368.

21. Mediannikov O., Sidelnikov Y., Ivanov E., et al. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. №5. – P.810-817.

22. Mediannikov O., Matsumoto K., Samoylenko I., et al. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58. – P.1635-1639.

23. Rudakov N.V. Tick-borne rickettsiosis in Russia (epidemiology and current conditions of natural foci) // *Rickettsiae and Rickettsial Diseases: Proceedings of the*

V-th International Symposium. – Bratislava: VEDA, 1996. – P.216-219.

24. Rudakov N.V., Samoilenko I.V., Yakimenko V.V., et al. The re-emerging of Siberian tick typhus: field and experimental observations // Raoult D., Brougui P. eds. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium*. – Paris: Elsevier, 1999. – P.269-273.

25. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoilenko I.E., et al. Ecology and epidemiology of spotted fever group rickettsiae and new data from their study in Russia and Kazakhstan // Ann. NY Acad. Sci. – 2003. – Vol. 990. – P.12-24.

26. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Fournier P.-E., et al. Ecology and molecular epidemiology of tick-borne rickettsioses with natural foci in Russia and Kazakhstan: century of rickettsiology (emerging, reemerging rickettsioses, molecular diagnostics, and emerging veterinary rickettsioses) // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1078 – P.299-304.

27. Rydkina E., Roux V., Fetisova N., et al. New Rickettsiae in ticks collected in territories of the former Soviet Union // Emerg. Infect. Dis. – 1999. – №5. – P.811-814.

28. Samoylenko I.E., Kumpan L.V., Shpynov S.N., et al. Methods of isolation and cultivation of rickettsiae of "new genotypes" from nozoarea of the north asian tick typhus in Siberia // 4<sup>th</sup> int. conf. on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Logrono (La Rioja). – Spain, 2005. – 185 p.

29. Shpynov S., Fournier P.-E., Rudakov N., Raoult D. "Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*" in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia // Ann. NY Acad. Sci. – 2003. – Vol. 990. – P.162-172.

30. Shpynov S., Fournier P.-E., Rudakov N., et al. Detection of *Rickettsia* Closely Related to *Rickettsia aeschlimannii*, "*Rickettsia heilongjiangensis*", *Rickettsia* sp. Strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks Collected in Russia and Kazakhstan // J. Clin. Microb. – 2004. – Vol. 42. №5. – P.2221-2223.

31. Shpynov S.N., Fournier P.-E., Rudakov N.V., et al. Short report: Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2006. – Vol. 74. №3. – P.440-443.

32. Shpynov S., Fournier P.-E., Rudakov N., et al. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia // Ann. NY Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1078. – P.378-383.

33. Stothard D.R., Fuerst P.A. Evolutionary analysis of spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* using 16S rRNA gene sequences // Syst. Appl. Microbiol. – 1998. – №18. – P.52-61.

34. Tarasevich I.V., et al. Rickettsioses studies. Natural foci of rickettsioses in the Armenian Soviet Socialistic Republic // Bull. Word Hlth. Org. – 1976. – Vol. 53. №1. – P.25-30.

35. Tarasevich I.V., Makarova V.A., Plotnikova L.F. Studies of the antigenic of the newly isolated strains of Rickettsiae and their relation to spotted fever group // Folia microbiol. – 1976. – Vol. 21. №6. – P.503-504.

36. Tarasevich I.V., Makarova V.A., Fetisova N.F., et al. Studies of a "new" rickettsiosis "Astraktan" spotted fever // Eur. J. Epidemiol. – 1991. – №7. – P.294-298.

**Информация об авторах:** Рудаков Николай Викторович – д.м.н., профессор, директор ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск, Проспект Мира, 7, e-mail: rickettsia@mail.ru; Шпынов Станислав Николаевич – д.м.н., ученый секретарь, e-mail: stan63@inbox.ru; Самойленко Ирина Евгеньевна – к.м.н., вед.н.с., e-mail: irinasam59@mail.ru; Кумпан Людмила Валерьевна – к.м.н., ст.н.с.; Рудакова Светлана Анатольевна – д.м.н., гл.н.с.; Решетникова Татьяна Александровна – к.м.н., с.н.с.; Абрамова Наталья Валерьевна – врач-вирусолог ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»; Коломеец Анна Николаевна – к.м.н., врач-бактериолог Сибирского федерального окружного центра СПИД, ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора.

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ХАСНАТИНОВ М.А., ДАНЧИНОВА Г.А., ЗЛОБИН В.И., ЛЯПУНОВ А.В., АРБАТСКАЯ Е.В., ЧАПОРГИНА Е.А., АБМЭД Д., БАТАА Ж., ЦЭРЭННОВ Д., ОТГОНБААТАР Д. – 2012  
УДК 578.4

## ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В МОНГОЛИИ

Максим Анатольевич Хаснатинов<sup>1</sup>, Галина Анатольевна Данчинова<sup>1</sup>, Владимир Игоревич Злобин<sup>2</sup>, Александр Валерьевич Ляпунов<sup>1</sup>, Елена Валентиновна Арбатская<sup>1</sup>, Елена Александровна Чапоргина<sup>1</sup>, Даваажав Абмэд<sup>3</sup>, Жантсо Батаа<sup>3</sup>, Дамдиндорж Цэрэнноров<sup>4</sup>, Даидаваа Отгонбаатар<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАН, г. Иркутск, Россия, директор – д.м.н., чл.-корр. РАН, проф. Л.И. Колесникова, лаборатория трансмиссивных инфекций, руководитель – д.б.н. Г.А. Данчинова; <sup>2</sup>Иркутский государственный медицинский университет, Россия, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов; <sup>3</sup>Национальный Центр по изучению инфекционных болезней, Улан-Батор, Монголия, директор – д.м.н. Д. Нямхуу; <sup>4</sup>Национальный Центр по изучению природно-очаговых инфекций, Улан-Батор, Монголия, директор – д.м.н. Д. Отгонбаатар)

**Резюме.** В данной работе мы приводим результаты изучения основных биологических характеристик вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), циркулирующего на территории Монголии. Результаты молекулярно-генетических исследований показывают, что возбудители клещевого энцефалита в Монголии наиболее генетически близки ВКЭ из сопредельных районов Российской Федерации и относятся к Сибирскому и Дальневосточному субтипам. Вирусы КЭ, обитающие в северной Монголии, способны эффективно размножаться в клетках млекопитающих, нейровирулентны для модельных животных и обладают выраженной нейроинвазивностью. Кроме того, ВКЭ в Монголии могут вызывать смертельные случаи заболевания человека. Наибольшим риском заражения человека отличаются Селенгинский и Булганский аймаки Монголии.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, Монголия.

## TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN MONGOLIA

M.A. Khasnatinov<sup>1</sup>, G.A. Danchinova<sup>1</sup>, V.I. Zlobin<sup>2</sup>, A.V. Liapunov<sup>1</sup>, E.V. Arbatskaya<sup>1</sup>, E.A. Tchaporgina<sup>1</sup>, D. Abmed<sup>3</sup>, J. Bataa<sup>3</sup>, D. Tserennorov<sup>4</sup>, D. Otgonbaatar<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk, Russia; <sup>2</sup>Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia; <sup>3</sup>The National Center for Communicable Disease, Ulanbaatar, Mongolia; <sup>4</sup>The National Center of Infectious Diseases with Natural Foci, Ulanbaatar, Mongolia)

**Summary.** In this work we present the results of the study of main biological characteristics of TBEV in Mongolia. The genetic characteristics of Mongolian TBEV indicate that Far Eastern and Siberian subtypes are most common in Mongolia and viral populations are closely related to TBEV from neighbor regions of Russia – Buryat Republic and Irkutsk Region. TBEV isolated in Mongolia are able to effectively reproduce in mammalian cells and are both neurovirulent and neuroinvasive for model animals. Besides this the TBEV in Mongolia is proven to cause fatal encephalitis in humans. The highest risk of human infection with TBEV in Mongolia is the feature of Selenge and Bulgan aimags.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus, Mongolia.

Клещевой энцефалит (КЭ) – это инфекционное заболевание, распространенное в лесной и лесостепной зоне Северной Евразии. Возбудитель КЭ – вирус, который передается человеку при укусе иксодовых клещей. Ежегодно в мире происходит порядка 10000 новых случаев заболеваний КЭ [7].

В настоящее время на основе фенотипических и генетических различий выделяют 3 субтипа ВКЭ – дальневосточный (ДВ ВКЭ), сибирский (СИБ ВКЭ) и европейский (ЕВР ВКЭ). Основным переносчиком первых двух субтипов является таежный клещ *Ixodes persulcatus*, который распространен в лесной и лесостепной зоне Азии и Восточной Европы, вплоть до Прибалтики. Основной переносчик вирусов Европейского субтипа – клещ *I. ricinus*, обитающий в лесах Западной и Восточной Европы до Урала [8].

В Монголии ВКЭ выявлен в 80-х гг. XX века [5], с 2001 г. начата официальная регистрация заболеваемости населения КЭ, при этом в 2005-2008 гг. отмечено 75 случаев заболеваний людей. В 1998-2005 гг. охарактеризованы природные очаги КЭ в Северной Монголии, а также проведены работы по идентификации ВКЭ в клещах *I. persulcatus* [1] Однако до настоящего времени очень мало известно о биологических и патогенетических характеристиках ВКЭ, циркулирующих в природных очагах Монголии. В данной работе мы приводим результаты изучения основных биологических характеристик ВКЭ, обитающих на территории Монголии.

## Материалы и методы

**Клещи и вирусы.** Оценку численности переносчиков и отлов клещей проводили на ключевых участках, расположенных в лесной и лесостепной зоне Северной Монголии (рис. 1), по стандартной методике [2]. Идентификацию клещей производили по морфологическим признакам в соответствии с определителями фауны иксодовых клещей СССР [3,4]. Каждого клеща промывали 2 раза в 70% этаноле, 1 раз в стерильной дистиллированной воде, обсушивали на фильтровальной бумаге, суспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (рН=7,4) и центрифугировали. Зараженность клещей ВКЭ определяли с помощью иммуноферментного анализа с тест-системой «ИФА ТС АГ ВКЭ» (ФГУП «Микроген», Москва) согласно инструкции производителя. Супернатанты образцов, содержащих антиген ВКЭ, использовали для заражения монослоя клеточной линии СПЭВ (почка эмбриона свиньи) и для выделения РНК.

**Вирусы и образцы РНК.** Свойства исследованных образцов ВКЭ приведены в таблице 1.

**ОТ-ПЦР и секвенирование.** РНК выделяли из суспензий клещей и из культуральной среды с помощью наборов Рибо-Сорб (Амплисенс, Москва) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с 11 мкл раствора РНК с помощью реверта-

зы Superscript II (Invitrogen) и случайных гексануклеотидов согласно инструкции производителя. Для амплификации фрагмента белка E использовали праймеры TBEV-1089f (5'-YTTCRATGGAYGTGTGGCTTGA-3') и TBEV-1643R (5'-GCCAGATCATTRAACCAGTC-3' и ДНК полимеразу «ДиаТаг» (Амплисенс, Москва). ПЦР-фрагменты очищали с помощью электрофореза в геле 0,8% агарозы и секвенировали с использованием ПЦР-праймеров. Секвенирование проводили с помощью анализатора Beckman Coulter Genetic Sequencing System 1800 (USA) и соответствующих наборов реагентов.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Филогенетический анализ проводили по методу Maximum Parsimony. Кроме того, этот же набор последовательностей был проанализирован с использованием дистантных методов. Для расчета генетических дистанций использовали модель эволюции Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993). Для построения топологических схем использовали метод объединения ближайших соседей (neighbor-joining). Оценку достоверности реконструкции эволюционных взаимоотношений проводили с помощью бутстреп-анализа на основе 1000 повторов. Филогенетический анализ проводили с помощью инструментов программы MEGA 4.1. (Kumar, Tamura, Nei, 2004).

Репродукция в культуре клеток млекопитающих. Эффективность репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих оценивали в культуре клеток СПЭВ. Концентрацию инфекционного вируса, а также морфологию бляшек определяли с помощью титрования бляшкообразующих единиц (БОЕ/мл) согласно Gould и Clegg, 1985 [5]. Каждый эксперимент проводили в 3 независимых повторах. Для оценки варибельности результатов рассчитывали стандартную ошибку средних значений.

Оценка вирулентности на модели белых мышей. Беспородных белых мышей заражали подкожным (2000 БОЕ вируса) или внутримозговым (100 БОЕ) способом. Для каждого эксперимента использовали группу из 10 мышей и контрольную группу мышей, инфицированных чистой культуральной средой. Мышей наблюдали в течение 28 дней. При появлении признаков заболевания проводили безболезненную эвтаназию и забор материала. Для оценки варибельности результатов рассчитывали стандартную ошибку средних значений.

Этическая экспертиза. Дизайн исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН. Работы с лабораторными животными проводились в соответствии с моральными и этическими требованиями к биомедицинским исследованиям с использованием лабораторных животных.

Северной Монголии приурочены к распространению основного переносчика вируса КЭ (ВКЭ) – таежного клеща *I. persulcatus*. В этих районах проходит южная граница ареала этих клещей и, соответственно, южная граница распространения ВКЭ. Численность имаго таежных клещей на территории Монголии варьирует от 0,2 до 43 особей на флажок/км и достигает наибольших показателей в Селенгинском, Булганском и Центральном аймаках. Средняя зараженность клещей ВКЭ варьирует от 1,2% до 5,9% в разных аймаках, однако, для ряда аймаков (Центральный, Хэнтийский, Орхонский, Хубсугульский) зараженность ВКЭ установить не удалось из-за низкой численности клещей и, соответственно, малочисленных выборок.

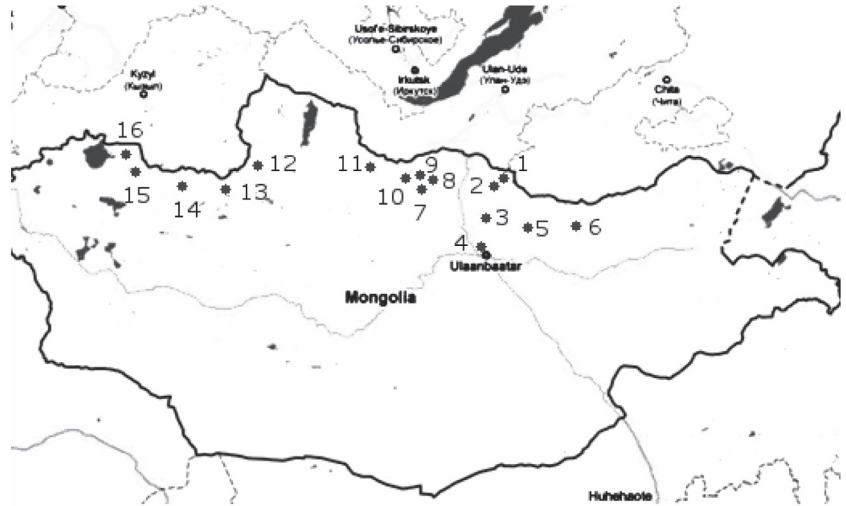


Рис. 1. Сеть ключевых участков для изучения вируса клещевого энцефалита в северной Монголии. Точки с цифрами обозначают соответствующие места учета численности и отлова клещей.

Из клещей *I. persulcatus*, отловленных на территории Монголии в 2001 г., нами были получены и охарактеризованы 2 изолята вируса КЭ – 92М и 940М. Вирус 92М изолирован из самки клеща, отловленной на территории Центрального аймага, сомон Мандал. Вирус 940М изолирован на территории сомона Худэр (Селенгинский аймак) в непосредственной близости от Российско-Монгольской границы. Концентрация инфекционного вируса в культуральной среде достигает  $4,2 \times 10^8$  (для штамма 92М) и  $3,8 \times 10^8$  (для штамма 940М) БОЕ/мл. При этом деструкция монослоя клеток в обоих случаях составляет порядка 90%. Оба вируса формируют бляшки, диаметр которых достоверно не отличается и составляет  $3,9 \pm 0,15$  для 92М и  $4,2 \pm 0,6$  мм для изолята 940М. Морфологически бляшки мутные, крупные, неправильной формы, что характерно для вирусов сибирского субтипа. Для штамма вируса 940М характерно усиленное разрушение монослоя клеток в центре бляшки (рис. 2). Также оба вируса формируют иммунный ответ у взрослых белых мышей. При заражении штаммом 92М антигемагглютинины в детектируемой концентрации появляются на 8 день после заражения, при заражении штаммом 940М – на 7 сутки. Пиковые концентрации антигемагглютининов наблюдаются на 13 и 17 день после заражения соответственно. Титры антигемагглютининов в сыворотках крови мышей, инфицированных вирусом 92М, достигают 1:320 при внутримозговом и 1:40 – при подкожном заражении. При инфицировании вирусом 940М титры антител, напротив, достигают 1:40 при внутримозговом заражении и 1:320 – при подкожном заражении. Средний титр антигемагглютининов при заражении штаммом 92М составляет  $121,6 \pm 62,8$  (внутримозговое заражение) и  $18,6 \pm 4$  (подкожное заражение), для второго штамма (940М) эти показатели составляют  $23,75 \pm 3,75$  и  $153,3 \pm 39,2$  соответственно.

Анализ нейровирулентности проводили на осно-

Таблица 1  
Характеристика образцов ВКЭ из Монголии

Образец (форма)	Источник изоляции	Год изоляции	Место изоляции (согласно рис.1)
92М (изолят)	<i>I. persulcatus</i>	2001	3
940М (изолят)	<i>I. persulcatus</i>	2001	1
283\9 (РНК)	<i>I. persulcatus</i>	2005	1
290\2 (РНК)	<i>I. persulcatus</i>	2005	1
TBEV-MN-2008	Human patient	2008	9, 10

### Результаты и обсуждение

Исследование клещей, отловленных на ключевых участках (рис.1), показало, что природные очаги КЭ в

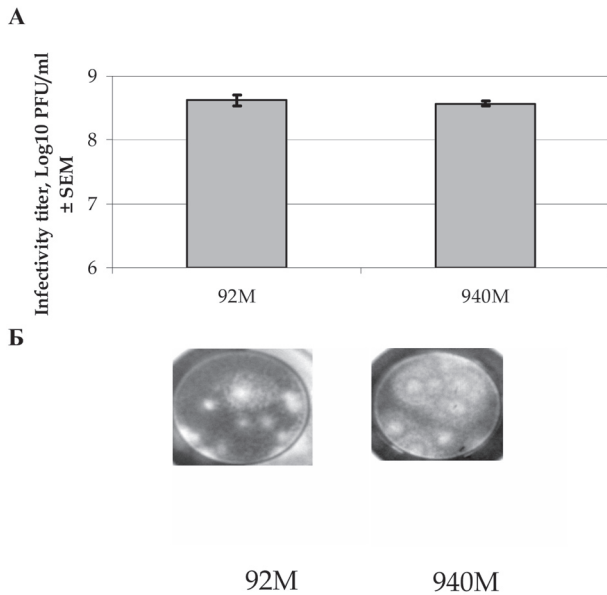


Рис. 2. Репродукция изолятов ВКЭ из Монголии в культуре клеток млекопитающих (клеточная линия почки эмбриона свиньи СПЭВ).

А) Титр вируса на 4 сутки репликации.  
Б) морфология бляшек.

ве данных только от тех животных, в сыворотке крови которых обнаружены антигеммагглютинины к ВКЭ. При внутричерепном заражении оба вируса нейровирулентны для взрослых белых мышей. Инкубационный период составляет 6-14 дней. Заболеваемость при инфицировании обоими вирусами примерно одинакова – 75% для изолята 92М и 80% для изолята 940М, однако средняя продолжительность жизни заболевших мышей существенно выше при заражении штаммом 92М (10,3±1,4 дня) чем при заражении штаммом 940М (7,75±0,4 дня). При подкожном заражении смертность достигает 22,2% при инфицировании вирусом 92М и в два раза ниже (11,1%) при заражении вирусом 940М. Продолжительность жизни заболевших мышей при этом составляет 11,5±0,5 дня при заражении штаммом 92М и 17 дней при заражении штаммом 940М.

Для обоих вирусов расшифрована полноразмерная нуклеотидная последовательность гена Е белка оболочки. Анализ нуклеотидной последовательности показал, что оба вируса проявляют наибольшее сходство последовательностям ВКЭ сибирского субтипа, изолированным в Восточной Сибири (Иркутская область), от клещей *I. persulcatus*. При этом вирус 92М формирует отдельную ветвь. Кроме того, получены нуклеотидные последовательности фрагментов гена Е для двух коллекционных образцов РНК ВКЭ из клещей *I. persulcatus* 290/2 и 283/9, отловленных в Селенгинском аймаке (участок 1, рис. 1) в 2005

г. Оба вируса также кластеризовались с изолятами из Иркутской области IR99-2f13 и IR99-2m3 (рис. 3).

В ходе изучения этиологии клещевых инфекций в Монголии в 2008 г. нами впервые получено биологическое подтверждение смерти человека от КЭ в Монголии. Образцы тканей умершего были взяты в соответствии с 40-м разделом «Закона о здоровье» Республики Монголия для подтверждения диагноза болезни и причины гибели больного. Забор выполнялся с соблюдением норм биомедицинской этики. РНК вируса КЭ была обнаружена в тканях головного мозга больного менингоэнцефалитом, пострадавшего от укуса клеща в Булганском аймаке (ключевые участки 9 и 10, рис. 1). Для образца TBEV-MN-2008 был расшифрован фрагмент гена Е ВКЭ длиной 520 н.о. Фрагмент локализован в позициях 1124-1643 генома ВКЭ (здесь и далее позиции даны по геному вируса *Vasilchenko*, GenBank № L40361) и захватывает фрагмент белка Е ВКЭ между аминокислотными остатками (а.о.) 52 и 223. Наиболее филогенетически родственным оказался вирус 740-84 (EU878282), изолированный в 1984 г. в Бичурском районе Бурятии от красно-серой полевки (*Clethrionomus rufocanus*), а также ряд изолятов дальневосточного субтипа ВКЭ (сходство 89,6%). Наименьшее сходство – менее 85% – было с изолятами Европейского субтипа (рис. 3).

В целом, нами установлено, что в Монголии циркулируют популяции возбудителей клещевого энцефалита близкородственные ВКЭ, обитающим на сопредельных территориях Российской Федерации. Вирусы клещевого энцефалита, обитающие в северной Монголии, способны эффективно размножаться в клетках млекопитающих, нейровирулентны для модельных животных и об-

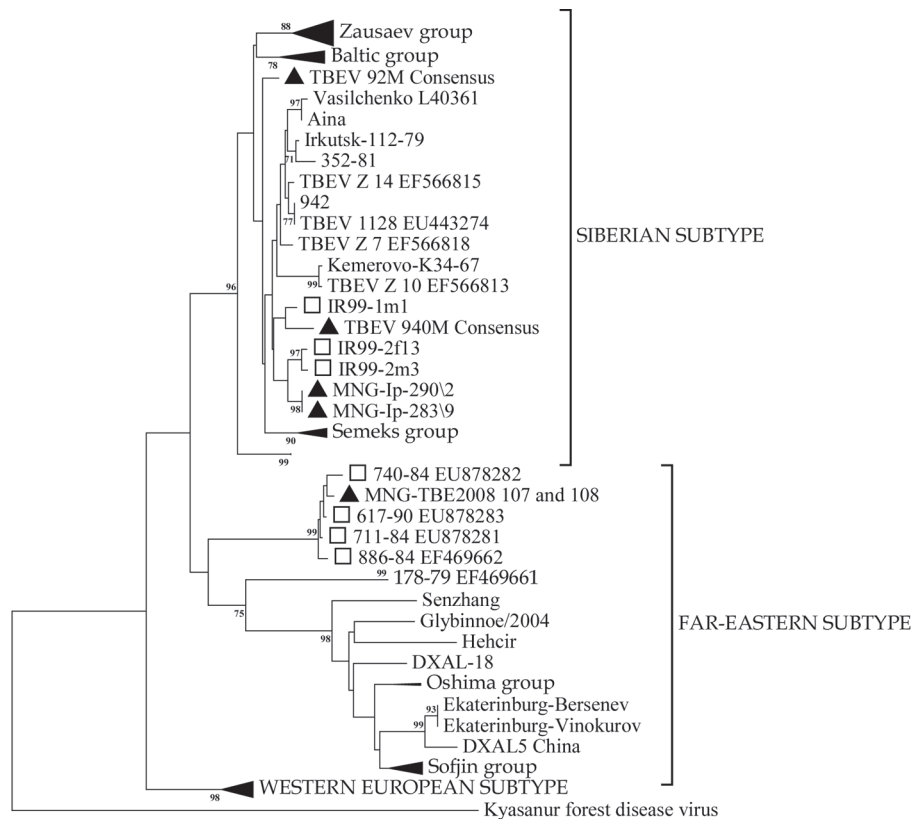


Рис. 3. Филогенетические взаимосвязи ВКЭ из Монголии (обозначены черным треугольником) и на сопредельных территориях РФ (обозначены белым квадратом). Реконструкция проведена на основе анализа фрагмента гена Е белка оболочки ВКЭ с помощью метода neighbor joining. Эволюционные дистанции рассчитывали с помощью метода Tamura-Nei 93. Достоверность реконструкции оценивали с помощью бутстреп-анализа на основе 1000 псевдовыборок.

ладают выраженной нейровирусностью. Кроме того, ВКЭ в Монголии могут вызывать смертельные случаи заболевания человека. Наибольшим риском заражения

человека отличаются Селенгинский и Булганский аймаки Монголии. С учетом интенсивного хозяйственного освоения этих районов, необходимо проведение широкого спектра профилактических мер как для местного населения, так и для туристов, посещающих эти районы.

Авторы выражают благодарность сотруднику ФГУС Роспотребнадзора в Иркутской области М.М.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Злобин В.И. и др. Современная ситуация по клещевому энцефалиту в Монголии // Материалы расширенного пленума проблемной комиссии «Клещевой энцефалит и другие вирусные энцефалиты». – М., 2003. – С.36-37.

2. Нецкий Г.И. Учет и прогноз изменений численности клещей *Ixodes persulcatus* P. Sch. и *Dermacentor pictus* Herm. в природных очагах клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки и туляремии в Западной Сибири: Метод. указания. – Омск: Омский НИИ природноочаговых инфекций, 1972. – 13 с.

3. Сердюкова Г.В. Иксодовые клещи фауны СССР. – М., Л.: Изд-во АН СССР, 1956. – 122 с.

Верхозиной (Иркутск), сотруднику Лимнологического института СО РАН Н.В. Кулаковой (Иркутск) и сотрудникам Национального Центра по изучению природноочаговых инфекций МЗ Монголии У. Unursaikhan и В. Undraa (Улан-Батор) за помощь в лабораторных исследованиях.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №08-04-90206-Монг\_а и и РФФИ №11-04-92221-Mong\_a.

4. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. Ixodinae // Фауна СССР. Паукообразные. – Т. IV (4) – Л.: Наука, 1977. – 396 с.

5. Абмэд Д., Нимадава П., Андреев В.П. и др. Исследование по арбовирусным инфекциям в МНР. Сообщение II. Изоляция вируса клещевого энцефалита в Селенгинском аймаке // Мон тезис. – 1990. – №22.

6. Gould E.A., Clegg J.C.S. Growth, titration and purification of togaviruses // B. W. J. Mahy (ed.), Virology: A Practical Approach. – IRL Press, 1985. – P.43-48.

7. Kunz C, Heinz FX. Tick-borne encephalitis // Vaccine. – 2003. – Vol. 21. – P.1-2.

8. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. // Lancet. – 2008. – Vol. 371. – P.1861-1871.

**Информация об авторах:** Хаснатинов Максим Анатольевич – ведущий научный сотрудник, к.б.н., 664025, Иркутск, а/я 525, тел. (3952) 333971; e-mail: khasnatinov@yandex.ru; Данчинова Галина Анатольевна – руководитель, д.б.н.; Злобин Владимир Игоревич – заведующий кафедрой, академик РАМН, д.м.н., профессор; Ляпунов Александр Валерьевич – научный сотрудник, к.б.н.; Арбатская Елена Валентиновна – научный сотрудник; Чапоргина Елена Александровна – старший научный сотрудник, к.б.н.; Даваажав Абмэд – руководитель группы, д.б.н.; Жантсо Бата – заведующий отделом, д.б.н.; Дамдиндорж Цэрэнноров – заместитель директора, д.м.н.; Дашдаваа Отгонбаатар – директор, д.м.н.

© ЛЕОНОВА Г.Н., ПАВЛЕНКО Е.В., МАЙСТРОВСКАЯ О.С., БЕЛИКОВ С.И., КОНДРАТОВ И.Г. – 2012  
УДК: 577.123

### ВИРУЛЕНТНОСТЬ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ С РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ИНФЕКЦИИ

Галина Николаевна Леонова<sup>1</sup>, Елена Владимировна Павленко<sup>1</sup>, Ольга Сергеевна Майстровская<sup>1</sup>, Сергей Иванович Беликов<sup>2</sup>, Илья Геннадьевич Кондратов<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток, директор – д.м.н., проф. Л.М. Сомова; <sup>2</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, директор – д.х.н., акад. РАН М.А. Грачев)

**Резюме.** На основании данных, полученных в трех сериях экспериментов, представлена характеристика 11 штаммов вируса клещевого энцефалита. Комплексные исследования, направленные на изучение молекулярной характеристики и вирулентности в частности нейроинвазивности, показали значительные различия инфекционного потенциала штаммов, изолированных от людей с очаговыми формами КЭ и от лиц с инаппарантной формой. Штаммы, вызвавшие манифестные по сравнению с инаппарантными формами инфекции, обладали выраженной нейроинвазивностью, быстрее проникали через гематоэнцефалический барьер и вызывали быструю потерю веса белых мышей с последующей их гибелью.

**Ключевые слова:** штаммы вируса клещевого энцефалита, молекулярная характеристика, нейроинвазивность, вирулентность.

### THE VIRULENCE OF STRAINS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATED FROM HUMANS WITH DIFFERENT FORMS OF INFECTION

G.N. Leonova<sup>1</sup>, E.V. Pavlenko<sup>1</sup>, O.S. Maistrovskaya<sup>1</sup>, S.I. Belikov<sup>2</sup>, I.G. Kondratov<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology SB RAMS, Vladivostok, <sup>2</sup>Limnological Institute SB RAS, Irkutsk)

**Summary.** Based on three series of experimental data, we have characterized 11 strains of tick-borne encephalitis (TBE) virus. Complex studies aimed at molecular characterization and virulence in particular of neuroinvasiveness have shown significant differences in infectious potential of the strains isolated from patients with focal forms of TBE and those with inapparent forms of TBE. Unlike inapparent forms, the strains caused clinical infections had a pronounced neuroinvasiveness and penetrated faster through blood-brain barrier causing rapid weight loss in white mice followed by their death.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus strains, molecular characteristic, neuroinvasiveness, virulence.

Исполнилось 75 лет, как был открыт вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) на Дальнем Востоке России. За этот период случаи КЭ стали регистрировать во многих странах Евразии (Китай, Германии, Австрии, Чехии и др.). Но наиболее неблагоприятная обстановка по заболеваемости этой инфекцией наблюдается ежегодно на обширной территории Российской Федерации [7]. С

первых случаев изоляции ВКЭ исследователей интересовала важнейшая биологическая характеристика вируса – вирулентность, для изучения которой до настоящего времени остается классическая модель – белая мышь. Изучали, как правило, штаммы, изолированные из иксодовых клещей и реже из мозга людей, умерших от КЭ [4]. На протяжении двух последних десятилетий наши

исследования были направлены на совершенствование способов изоляции штаммов ВКЭ от больных с разным клиническим проявлением инфекции: при манифестном (очаговые и лихорадочные формы) и бессимптомном течении (инаппарантная форма) [5]. Появилась возможность проводить всесторонние сравнительные изучения полученных нами штаммов ВКЭ, которые проявили важнейшее биологическое свойство – вирулентность для макроорганизма, вызвав ту или иную форму заболевания.

Целью настоящей работы было комплексное исследование биологической характеристики в частности вирулентности штаммов вируса клещевого энцефалита, вызвавших очаговые, лихорадочную и инаппарантную формы инфекции.

### Материалы и методы

**Штаммы вируса КЭ.** Изучены 11 штаммов ВКЭ, которые были изолированы от больных людей с инаппарантной, лихорадочной и очаговыми формами инфекции. Штаммы вируса при лихорадочной и инаппарантной формах изолировали из крови больных, а в случаях летальных исходов при очаговых формах – из мозга умерших. Из таблицы 1 следует, что изоляция этих штаммов охватывала период с 1972 по 2000 г. В работе использовали штаммы, прошедшие 2-9 пассажей через мозг 2-х суточных белых мышей.

**Лабораторные животные.** Во всех экспериментах использовали взрослых беспородных белых мышей, весом 18-20 г. На каждую точку в трех экспериментах брали по 10 животных с проведением 2-3-х кратных повторных опытов. Во всех опытах использовали одинаковую заражающую дозу вируса (100 или 1000 ТЦД<sub>50</sub>), которую вводили животным подкожно по 0,2 мл. В опытах №1 наблюдения за животными проводили на протяжении 4-х недель, №2 – до 11-14 дней и №3 – до 21 дня. Животные содержались в условиях вивария регламентируемых приказом Минздрава СССР №1179 от 10.10.1983 г. Опыты проводили в соответствии с приказами Минздрава СССР №755 от 12.09.1977 г. и №701 от 27.07.1978 г. «Об обеспечении принципов гуманного обращения с животными».

Титр вируса в биопробах определяли на культуре клеток СПЭВ по цитопатическому эффекту.

В работе использовали нуклеотидные последовательности геномов штаммов ВКЭ, депонированные в международную базу данных GenBank (табл. 1).

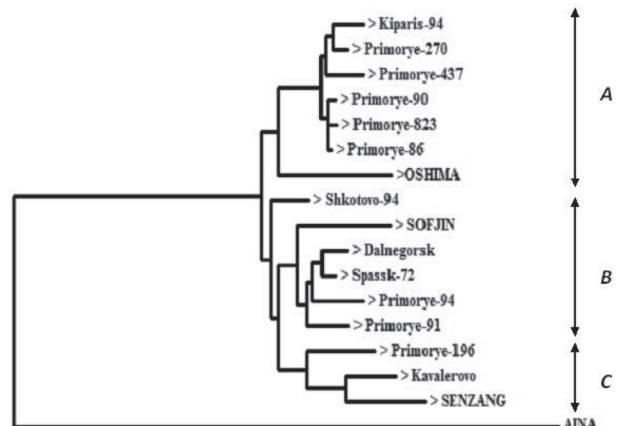
Штаммы вируса клещевого энцефалита, изолированные от больных людей с разными формами инфекции

№	Штамм	Пассаж	Номер в GeneBank	Район изоляции	Год изоляции	Объект изоляции
I группа (штаммы, вызвавшие очаговые формы КЭ)						
1	Spassk-72 (Sp-72)	VI	JQ825151	Спасский	1972	мозг умершего больного КЭ
2	Dal'negorsk	VIII	FJ402886	Дальнегорский	1973	мозг
3	Kavalerovo	V	FJ402885	Кавалеровский	1985	мозг
4	Primorye-86 (P-86)	IX	EU816455	Кировский	1986	мозг
5	Primorye-90 (P-90)	VII	FJ997899	Пригород г. Арсеньева	1990	мозг
II группа (штаммы, вызвавшие лихорадочную форму КЭ)						
1	Shkotovo-94 (Sh-94)	V	JQ825147	Шкотовский	1994	кровь
2	Kiparis-94	III	JQ825146	Надеждинский п. Кипарисово	1994	кровь
III группа (штаммы, вызвавшие инаппарантную форму КЭ)						
1	Primorye-823 (P-823)	II	JQ825164	Красноармейский	2000	кровь
2	Primorye-270 (P-270)	III	EU816452	Надеждинский район, п. Мирный	1991	кровь
3	Primorye-196 (P-196)	VII	JQ825155	Пригород Владивостока, б. Лазурная	2000	кровь
4	Primorye-437 (P-437)	VIII	JQ825162	Пригород Владивостока, б. Лазурная	1999	кровь

Выравнивание проводили с помощью пакета программ BioEdit 5.0.9 (URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>). Филогенетический анализ проводили методом объединения ближайших соседей (neighbor-joining, эволюционная модель Tamura & Nei) с помощью программ Mega 4 [11] и TreeCon [12]. Оценку достоверности реконструированной топологии древа осуществляли с помощью бутстреп-анализа на основе 1000 псевдореплик.

### Результаты и обсуждение

Проведено полногеномное секвенирование 11 штаммов ВКЭ, на основе чего построено филогенетическое древо (рис. 1). Штаммы заняли разные позиции, образуя три группы (A – Oshima-, B – Sofjin- и C – Senzhang-подобные штаммы). При выполнении данных исследо-



Примечание: A – Oshima-подобные штаммы; B – Sofjin-подобные штаммы; C – Senzhang-подобные штаммы.

Рис. 1. Филогенетическое древо штаммов вируса КЭ, взятых в исследование.

ваний нами целенаправленно были выбраны представители из этих групп, вызвавшие разные клинические формы заболевания. В группе Oshima-подобных расположились штаммы, вызвавшие не только инаппарантную форму (Primorye-270, Primorye-823, Primorye-437), но и манифестные формы КЭ (Primorye-86, Primorye-90, Kiparis-94). В группе Sofjin-подобных расположились штаммы, изолированные от людей с очаговыми формами инфекции (Dal'negorsk, Spassk-72) и лихорадочной – (Shkotovo-94), в группе Senzhang-подобные – штамм Kavalerovo, выделенный из мозга умершего, а также Primorye-196 – из крови больного с инаппарантной формой.

Таблица 1

При сравнительном изучении вирулентности штаммов нами был охарактеризован основной ее показатель – нейроринвазивность. На рис. 2 показано два параметра (выживаемость и СПЖ), полученных при подкожном заражении белых мышей разными штаммами в дозах 100 и 1000 ТЦД<sub>50</sub>. По этим параметрам нейроринвазивность штаммов I группы была более выражена по сравнению с другими штаммами. У штаммов 2 и 3 групп показатели выживаемости и СПЖ были выше.



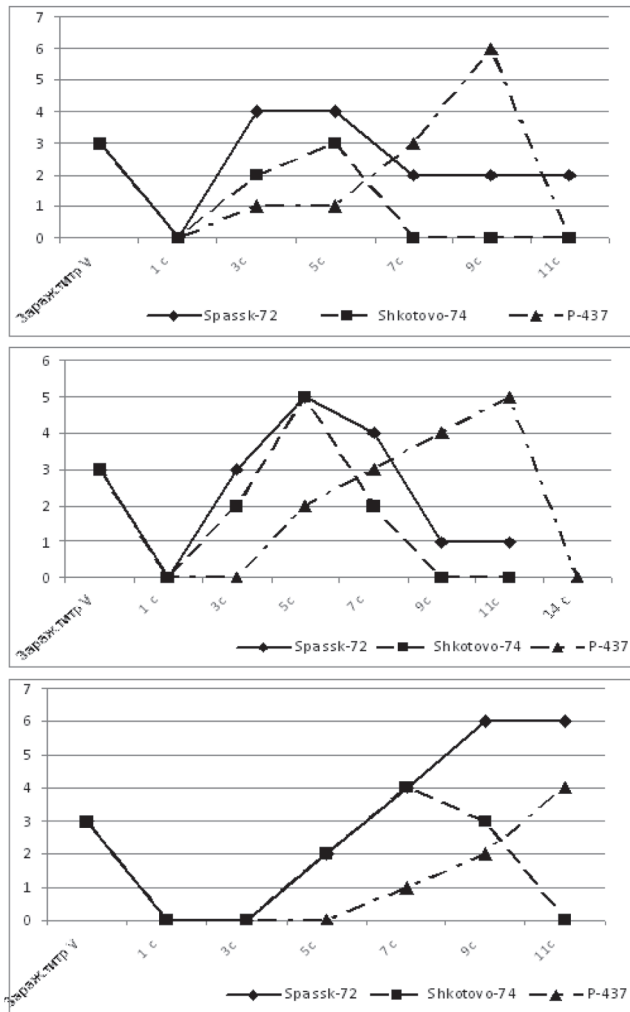


Рис. 2. Динамика накопления вируса в органах белых мышей, зараженных разными штаммами вируса КЭ (А – в крови, В – в селезенке, С – в мозге). По оси абсцисс – титр вируса в lg TCID<sub>50</sub>, по оси ординат – дни наблюдения.

Чтобы понять механизм развития инфекционного процесса в организме белых мышей, зараженных разными штаммами ВКЭ, мы провели наблюдения за динамикой накопления вируса в органах белых мышей (рис. 2; А – в крови, В – в селезенке, С – в мозге). Одинаковая заражающая доза (3 lg TCID<sub>50</sub>) для трех штаммов (Sp-72, Shkotovo-94 и P-437) показала различия в ходе развития патогенетического процесса. В крови все штаммы ВКЭ появились на 3-и сутки, но самый высокий показатель зарегистрирован для штамма Sp-72 (4 lg TCID<sub>50</sub>), а низкий – для штамма P-437 (1 lg TCID<sub>50</sub>). При этом пик вирусемии для штаммов Sp-72, Shkotovo-94 пришелся на 5 сут, для P-437 – только на 9 сут. В селезенке пик накопления штаммов Sp-72 и Shkotovo-94 пришелся также на 5 сут., а для P-437 – на 11 сут. Прохождение гематоэнцефалического барьера для штаммов Sp-72 и Shkotovo-94 наступило на 5 сут., а для штамма P-437 – на 7 сут. Пик накопления вируса в мозге (6 lg TCID<sub>50</sub>) для штамма Sp-72 наблюдали на 9-11 сут (срок гибели животных). Для Shkotovo-94 максимальный показатель (4 lg TCID<sub>50</sub>) был на 7 сут., затем титр вируса стал быстро снижаться. Штамм P-437 показал свою особенность: в мозге зараженных белых мышей он появился только на 7-е сут. (1 lg TCID<sub>50</sub>), затем титр вируса постепен-

но повышался, достигая максимума (4 lg TCID<sub>50</sub>) на 11 сут.

Получены дополнительные данные, характеризующие тяжесть инфекционного процесса по изменению показателей веса белых мышей, зараженных одной дозой (3 lg TCID<sub>50</sub>) разными штаммами ВКЭ. На рис. 3 видно, что штаммы первой группы вызвали у мышей быстрое падение веса с последующей их гибелью. Во второй группе животных, зараженных штаммом Kiparis-94, происходило заметное отставание веса по сравнению с группой контроля, а для штамма Shkotovo-94, начиная с 9-х сут. животные стали резко терять вес. Животные из группы инаппарантных штаммов также по-разному набирали вес, так у мышей, зараженных штаммом P-196, прибавка веса была замедленной, а животные, зараженные штаммом P-437, до 8-ми сут. массу не набирали, а затем постепенно стали его терять.

В ранее проведенных молекулярно-генетических исследованиях нами было показано, что штаммы, выделенные от больных с разными формами заболевания, на филогенетическом древе заняли позиции в двух крупных кластерах Oshima- и Sofjin-подобных [1]. Причем, в первом кластере доминировали штаммы, вызвавшие инаппарантную форму (82%), здесь же по 9% пришлось на штаммы с лихорадочной и очаговыми формами инфекции. Второй кластер в большинстве случаев состоял из штаммов, вызвавших манифестные формы и редко – инаппарантную форму инфекции [6]. И хотя исследователь всегда стремится получить четко ранжированные данные, следует признать, что штаммы из групп Oshima- и Sofjin-подобных в разной степени, но способны вызывать любое течение инфекции от очаговых до инаппарантных форм. В этой связи в настоящей работе нами вполне сознательно были взяты штаммы из разных генетических групп, способных вызывать очаговые, лихорадочную и инаппарантную формы инфекции.

С

В

А

Известно, что вирулентность возбудителей инфекционных болезней является одной из наиболее сложных функций, характеризующих меру патогенности. Оценку нейровирулентности штаммов можно связать со способностью их преодолевать гематоэнцефалический барьер. Большинство авторов считает, что переход вируса из кровяного русла в вещество мозга происходит путем диффузии через цитоплазму эндотелия, либо путем прохождения через эндотелиальные щели. Этот важный компонент нейровирулентности – нейроинвазивность был охарактеризован нами в эксперименте при подкожном заражении взрослых белых мышей разными заражающими дозами штаммов ВКЭ (100 и 1000 TCID<sub>50</sub>), которые более наглядно помогли рассмотреть различия штаммов по их основной характеристике – вирулентности. Причем, у штаммов,

Таблица 2

Нейроинвазивность штаммов вируса КЭ, изолированных от больных людей с разными формами инфекции

№ п/п	Штаммы	Выживаемость (%) белых мышей при подкожном заражении		Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей (дней)	
		100 TCID <sub>50</sub>	1000 TCID <sub>50</sub>	100 TCID <sub>50</sub>	1000 TCID <sub>50</sub>
I группа («Очаговые» штаммы)					
1	Sp-72	0	0	8,9	11,5
2	Dalnegorsk	30	0	14,7	7,1
3	Kavalerovo	10	0	13,1	8,1
4	P-86	80	0	24,9	16,0
5	P-90	0	0	11,1	10,3
II группа («Лихорадочные» штаммы)					
1	Shkotovo-94	80	40	26,3	16,0
2	Kiparis-94	Н.и.	10	Н.и.	15,5
III группа («Инаппарантные» штаммы)					
1	P-823	40	0	17,1	8,9
2	P-270	100	90	28,0	26,2
3	P-196	90	60	26,2	21,1
4	P-437	60	60	22,1	25,1

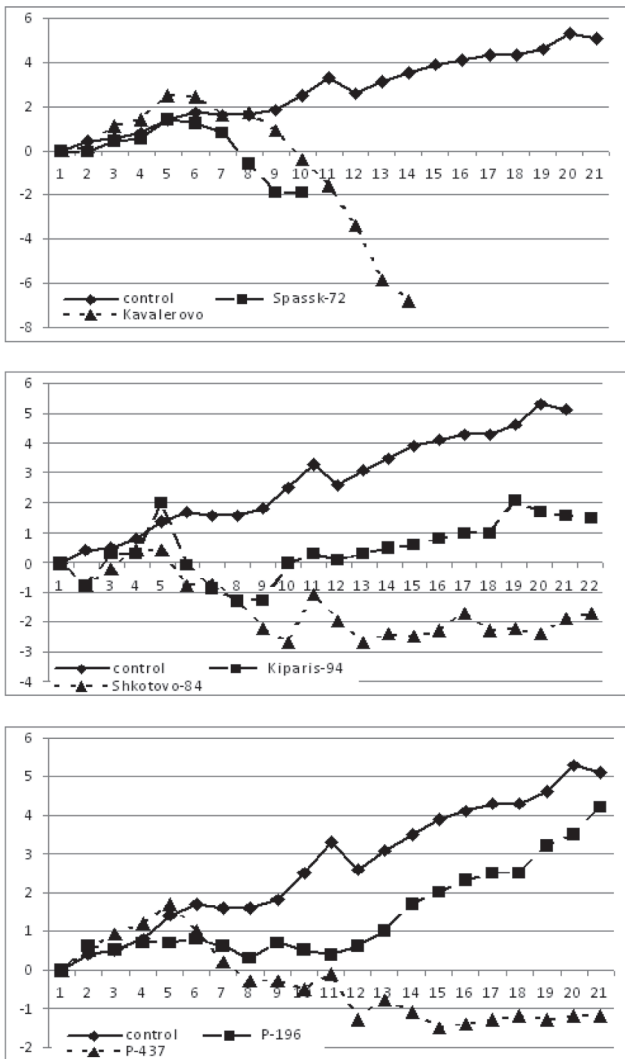


Рис. 3. Изменения показателей веса белых мышей, зараженных штаммами вируса КЭ, выделенными от больных людей (А – с очаговыми, В – лихорадочной и С – инаппарантной формами инфекции).

вызвавших инаппарантную форму, показатели (% выживших и СПЖ) были значительно выше (табл. 2). Это указывало на то, что преодоление гематоэнцефалического барьера у них затруднено. Подобные результаты были получены другими авторами при изучении вирулентности штаммов вируса лихорадки Западного Нила [9]. Жизнеспособность таких штаммов значительно ниже по сравнению с другими штаммами, которые быстро проникают в мозг экспериментальных животных. Действительно, такие штаммы мы выделяли на 2-3 сут. после укуса клеща из крови лиц, которые не заболели КЭ [5]. Примечательно то, что настоящие исследования проведены не на экспериментальных клонках вируса, с помощью которых исследователи получают подобные результаты [2], а на штаммах, выделенных непосредственно от больных людей (табл. 1). Кроме того, несмотря на то, что два штамма Р-86 и Р-90, вызвавшие у больных летальный исход, а на филогенетическом древе заняли позиции в группе Oshima-подобных штаммов, нейроинвазивные свойства у них были выражены, как у типичных вирулентных штаммов.

Убедительные данные получены в эксперименте на белых мышах по накоплению в органах разных штаммов (Sp-72, Shkotovo-94 и P-437). На фоне одинаковой и невысокой заражающей дозы ( $3,0 \lg \text{ТЦД}_{50}$ ) мы уловили различия в накоплении каждого штамма в крови, селезенке и мозге белых мышей. Прохождение гематоэнцефалического барьера для штаммов Sp-72 и Shkotovo-94

наступило на 5 сут., а для штамма P-437 – на 7 сут. Для штамма Sp-72 был характерен более активный инфекционный процесс с быстрым проникновением вируса в органы и мозг по сравнению со штаммом P-437, который достиг максимальных показателей в крови на 9 сут., а в селезенке и в мозге только на 11 сут.

Впервые для таких штаммов получены значимые дополнительные данные, которые адекватно и комплексно характеризовали тяжесть инфекционного процесса по изменению показателей веса взрослых белых мышей. Штаммы, изолированные из мозга больных с летальным исходом, у экспериментальных животных вызывали быстрое ухудшение общего состояния, что отражалось на резком снижении веса и быстром наступлении летального исхода. Штаммы, изолированные от людей с лихорадочной и инаппарантной формой, проявили менее выраженную инфекциозность и показали возможность длительного и затяжного периода болезни или выздоровления отдельных особей в группе экспериментальных животных.

Несмотря на различия клинических синдромов КЭ, генетические основы особенностей патогенеза этих близкородственных штаммов изучены пока плохо. Хотя в работе Mitzel и соавт. [10] уже содержатся доказательства того, что, в дополнение к хорошо известной роли Е белка вируса КЭ в тропизме к клеткам разных природных хозяев, белки М, NS3, NS4А и NS4В могут иметь вирусные детерминанты, ответственные за репликацию вируса. Авторы полагают, что мутации определяют не просто детерминанты репликации, но могут иметь специфические детерминанты нейроинвазивности. Значит, такие штаммы можно изучать с использованием обратной генетики для определения точной роли отдельных мутаций в хозяино-специфической репликации и патогенезе, что позволит обеспечить понимание функции этих белков в репликации вируса.

Молекулярно-генетический анализ изучаемых нами штаммов ВКЭ [8] указал на возможное снижение ферментативной активности вирусной протеазы. Выявлены две мутации, которые способны вызвать конформационные изменения белкового комплекса и привести к пространственному разобщению гидрофильного мотива белка NS2В и каталитического центра NS3 протеазы, что может изменять скорость процессинга вирусного полипротеина и влиять на патогенность вируса. Авторы полагают, что дополнительно к этому необходима также согласованность во времени работы еще и клеточной сигналы, поскольку дисбаланс в скоростях работы этих двух ферментов может приводить к образованию большого количества дефектных вирусных частиц, не содержащих вирусные РНК, т.е. не вирулентные частицы. Охарактеризованные нами три группы штаммов различаются, прежде всего, тем, что группа инаппарантных штаммов имеет пониженную скорость мутагенеза, предопределяя сниженную выживаемость такой вирусной популяции.

Таким образом, комплексные исследования, направленные на изучение вирулентности и в частности нейроинвазивности, показали значительные различия инфекционного потенциала штаммов, изолированных от людей с очаговыми формами КЭ и от лиц с инаппарантной формой. Понятно, что при попадании в кровь последних штаммов с укусом клеща вероятность выжить таких штаммов в макроорганизме не высокая. Как правило, происходит быстрая элиминация их из организма в начальном периоде инфекционного процесса. На это мы неоднократно обращали внимание, объясняя данный факт также образованием дефектных вирусных частиц [5]. Штаммы, вызвавшие лихорадочную форму инфекции у людей, могут по-разному проявить себя в макроорганизме. Кроме того, ранее нами было пока-

зано, что на развитие инфекционного процесса влияет также состояние иммунной системы [3], определяя тяжесть течения или быструю элиминацию вируса с на-

ступлением выздоровления.

Работа выполнена при поддержке гранта МНТЦ №4006.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беликов С. И., Леонова Г.Н., Кондратов И.Г. и др. Кодирующие нуклеотидные последовательности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных из крови людей без клинических проявлений инфекции // Генетика. – 2010. – Т. 46. №3. – С.356-363.
2. Карганова Г.Г. Механизмы микроэволюции вируса клещевого энцефалита: Автореф. дис ... д-ра биол.наук. – М., 2009 – 43 с.
3. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Павленко Е.В. и др. Особенности противовирусного иммунного ответа у вакцинированных и невакцинированных пациентов на примере лихорадочной формы клещевого энцефалита // Бюл. СО РАМН. – №4. – С.72-78.
4. Левкович Е.Н., Погодина В.В., Засухина Г.Д., Карпавич Л.Г. Вирусы комплекса клещевого энцефалита. – Л.: Медицина, 1967. – 245 с.
5. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Павленко Е.В. и др. Характеристика вирусной популяции клещевого энцефалита на юге Дальнего Востока России // Вопр. вирусол. – 2007. – №6. – С.13-17.
6. Леонова Г.Н., Крылова Н.В., Павленко Е.В. и др. Значение дальневосточных штаммов вируса клещевого энцефалита в инфекционной патологии // ЗНиСО. – 2012. – №1. – С.4-6.

7. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым энцефалитом и меры его профилактики в Российской Федерации // Вопр. вирусол. – 2007. – №5. – С.8-10.
8. Потапова У.В., Романова Е.В., Потапов В.В. и др. Анализ мутаций и молекулярное моделирование комплекса сериновой протеазы NS2B-NS3 вируса клещевого энцефалита // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – Т. 77. №1. Ч.1. – С.239-244.
9. Iyer A.V., Boudreaux M.J., Wakamatsu N., et al. Complete genome analysis and virulence characteristics of the Louisiana West Nile virus strain LSU-AR01 // Virus Genes. – 2009. – Vol. 38. – P.204-214.
10. Mitzela D.N., Besta S.M., Masnicka M.F., et al. Bloom Identification of genetic determinants of a tick-borne flavivirus associated with host-specific adaptation and pathogenicity // Virology. – 2008. – Vol. 381. №2. – P.268-276.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – Vol. 24 – P.1596-1599.
12. Van de Peer Y., De Wachter Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Applic. Biosci. – 1994. – Vol. 10. – P.569-570.

**Информация об авторах:** 690087, г.Владивосток, ул. Сельская 1 ФГБУ НИИЭМ СО РАМН, e-mail: galinaleon@mail.primorye.ru; galinaleon41@gmail.com, тел. (423) 2440712, Леонова Галина Николаевна – заведующий лабораторией, д.м.н., профессор; Павленко Елена Владимировна – научный сотрудник, к.м.н., e-mail: pavlena\_77@rambler.ru; Майстровская Ольга Сергеевна – младший научный сотрудник; Беликов Сергей Иванович – заведующий лабораторией, д.б.н., профессор, 664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, e-mail: sergeibelikov47@gmail.com; Кондратов Илья Геннадьевич – старший научный сотрудник, к.б.н., e-mail: igkondratov@rambler.ru

© ПЕНЬЕВСКАЯ Н.А., ВАЙТОВИЧ М.А., РУДАКОВ Н.В., РУДАКОВА С.А. – 2012  
УДК 614.4

#### МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА (НА ПРИМЕРЕ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ)

Наталья Александровна Пеньевская<sup>1</sup>, Марина Анатольевна Вайтович<sup>2</sup>,  
Николай Викторович Рудаков<sup>3</sup>, Светлана Анатольевна Рудакова<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Омская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. А.И. Новиков, <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Омской области, руководитель – А.С. Крига, <sup>3</sup>Омский НИИ природноочаговых инфекций, директор – д.м.н., проф. Н.В. Рудаков)

**Резюме.** Продемонстрировано, что влияние специфической профилактики на проявления эпидемического процесса клещевого энцефалита, в том числе в период макроциклического снижения его интенсивности, можно оценить в ходе сравнительного ретроспективного анализа многолетних данных о заболеваемости и объемах профилактических мероприятий в разных возрастных и социальных группах населения территорий, сопоставимых по уровню популяционного риска заражения, используя следующие методические приемы: анализ динамики интенсивных и экстенсивных показателей заболеваемости детей относительно аналогичных показателей взрослых; парное сравнение районов; анализ динамики структуры клинических форм; кластерный анализ.

**Ключевые слова:** клещевой энцефалит, эпидемиологическая эффективность вакцинации.

#### THE METHODOLOGY OF EVALUATION OF EPIDEMIOLOGICAL EFFICACY OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS SPECIFIC PREVENTION (ON THE EXAMPLE OF THE OMSK REGION)

N.A. Penevskaya<sup>1</sup>, M.A. Vaytovich<sup>2</sup>, N.V. Rudakov<sup>3</sup>, S.A. Rudakova<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Omsk State Medical Academy, <sup>2</sup>Omsk Scientific Research Institute of Natural Focal Infections)

**Summary.** The research shows that the influence of specific prevention on the manifestations of the epidemic process of tick-borne encephalitis (TBE), including the period of macrocyclic reduce of its intensity, can be evaluated by comparative retrospective analysis of long-term data about the incidence and volume of preventive measures in different age and social groups of the population on territories that are comparable in terms of risk of population infecting. In order to implement this kind of evaluation the following methodological techniques can be used: the analysis of intensive and extensive children morbidity indicators relative to similar indicators of adults; pair comparison of areas; the analysis of dynamics of the clinical forms' structure; the cluster analysis.

**Key words:** tick-borne encephalitis, epidemiological effectiveness of vaccination.

Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных изучению эффективности специфической профилактики клещевого энцефалита (КЭ), далеко не все из них содержат оценки лекарственных средств (ЛС) или противоэпидемических мероприятий, которые с позиций Evidence based medicine можно считать доказательными. Ряд причин данного обстоятельства и методологические аспекты оценки протективной активности ЛС против КЭ обсуждены в наших предыдущих публикациях [4,5]. Объективной проблемой получения доказательных выводов об эффективности профилактических мероприятий является цикличность проявлений эпидемического процесса. Начиная с середины 1990-х годов, на фоне 3-5-летних периодических колебаний заболеваемости КЭ, наблюдается тенденция неуклонного снижения ее уровня практически на всех территориях РФ, несмотря на отличия по объемам и характеру профилактических мероприятий. В этой связи справедливым является мнение ряда авторов об опасности переоценки значимости методов профилактики КЭ, изучаемых в течение последних 15 лет [1,2,3].

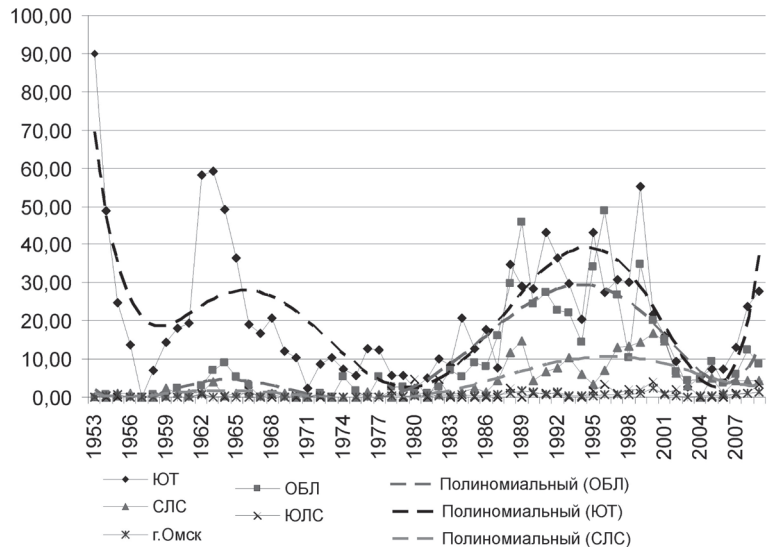
Целью настоящей работы была апробация методологических подходов к оценке эпидемиологической эффективности специфической профилактики КЭ на фоне макроциклического снижения заболеваемости.

Материалом для исследования служили официальные данные государственной статистической отчетности Управления Роспотребнадзора по Омской области за период 1995-2009 гг., результаты серологического обследования в Омском НИИПОИ вне эпидемического сезона КЭ 2713 жителей Омской области, а также архивные данные.

Установлено, что на территории Омской области за период от начала регистрации КЭ (1953 год) по настоящее время, как и по другим эндемичным областям Сибири, Урала и Приуралья, имели место два циклических подъема заболеваемости с периодом в 30 лет (рис. 1). Пик первого цикла приходился на середину 1960-х годов, пик второго цикла – на середину 1990-х годов, когда уровень заболеваемости в два раза превышал таковой в 1960-х годах (17,2‰ против 8,9‰), в основном за счет территорий, расположенных в подзонах осиново-березовых лесов (ОБЛ) и северной лесостепи (СЛС), где среднееголетние показатели выросли в 10 и 8,8 раз соответственно (28,0‰ против 2,8‰ и 8,9 против 1,1‰). Эпидемическая значимость территорий, расположенных в подзоне южной тайги (ЮТ), в период 1988-1998 гг. оставалась на уровне периода 1960-1970 гг. (среднееголетние показатели заболеваемости КЭ: 29,6‰ и 28,8‰ соответственно).

Отдельные административные районы одной ландшафтной приуроченности, как и разные ландшафтно-географические (Л-Г) подзоны, отличались друг от друга по характеру изменения эпидемической значимости в период циклического подъема 1988-1998 годов, по сравнению с аналогичным периодом 1960-1970 годов, по темпам снижения заболеваемости КЭ в 1999-2009 годах (табл. 1), а также по риску заболевания этой нейроинфекцией разных возрастных групп и тяжести проявлений КЭ.

За период 1999-2009 годов по сравнению с периодом 1995-1998 годов на фоне трехкратного увеличения охвата вакцинацией населения эндемичных районов области



Условные обозначения: ЮТ – подзона южной тайги, ОБЛ – подзона осиново-березовых лесов, СЛС – подзона северной лесостепи, ЮЛС – подзона южной лесостепи.

Рис. 1. Динамика заболеваемости КЭ в различных ландшафтно-географических подзонах Омской области за период 1953-2009 гг.

и примерно одинаковом объеме иммуноглобулинопрофилактики (ИГП) произошли заметные изменения экстенсивных и интенсивных показателей заболеваемости

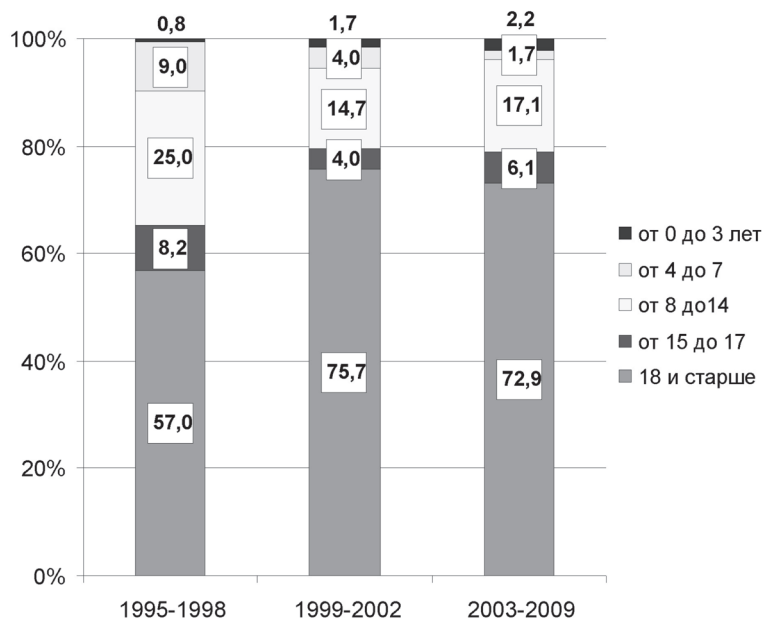


Рис. 2. Изменения возрастной структуры больных КЭ в эндемичных районах Омской области в течение 1995-2009 гг.

КЭ в группах детей 0-3, 4-7 и 8-14 лет (рис. 2 и 3).

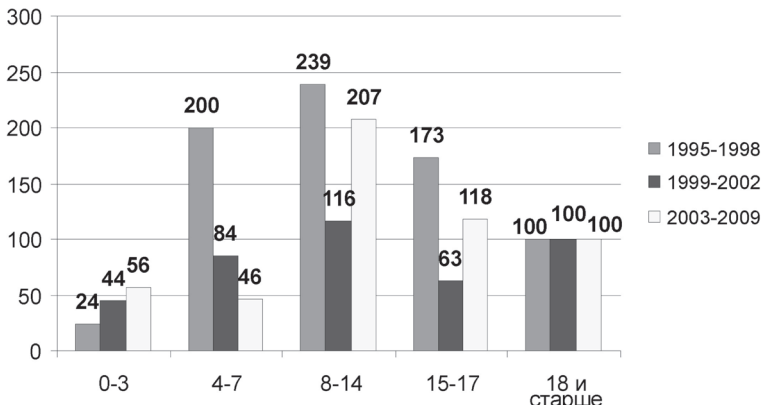
Удельный вес детей 0-3 лет (невакцинируемый контингент) в общей структуре больных КЭ вырос в 3 раза по сравнению с 1995-1998 гг. (2,2% против 0,8%), а доля детей в возрасте 4-7 лет снизилась в 5 раз (1,7% против 9,0%). Удельный вес детей 8-14 лет также снизился: с 25,0% в 1995-1998 гг. до 17,1% в 2003-2009 гг. Удельный вес подростков 15-17 лет в общей структуре больных КЭ изменился в меньшей степени (8,2% в 1995-1998 гг. и 6,1% в 2003-2008 гг.).

В период 2003-2009 гг. по сравнению с периодом 1995-1998 гг. заболеваемость КЭ детей 0-3 лет в показателях наглядности относительно заболеваемости взрослых выросла в 2,5 раза, детей 4-7 лет – снизилась в 5 раз. Интенсивные показатели заболеваемости детей 8-14 лет и подростков, хотя и снизились, продолжают превышать показатели заболеваемости взрослых. Установлено

Основные эпидемиологические характеристики природных очагов КЭ различной ландшафтной приуроченности в Омской области (среднеголетние показатели)

Л-Г под-зона	Районы	Общая заболеваемость КЭ (дети и взрослые), ‰			Среднеголетние показатели 1999-2009 гг.					
		1960-1970	1988-1998	1999-2009	Заболеваемость не вакцинированных детей 4-14 лет без ИПП, ‰	Обращаемость детей с укусами клещом, %	Вирусофорность клещей, %	Общая заболеваемость детей 0-14 лет, ‰	Привитость детей 0-14 лет, %	Охват не вакцинированных детей ИПП, %
ЮТ	Знаменский	13,4	49,6	23,5	135,5	2,3±0,3	4,7±1,2	38,9	40,0	92,2
ЮТ	Седелниковский	62,3	36,1	7,9	36,9	3,2±0,3	6,4±2,7	10,8	57,6	86,4
ЮТ	Тарский	16,5	42,2	27,2	127,7	1,9±0,1	6,5±0,5	27,5	49,5	99,8
ЮТ	Тевризский	19,1	10,4	5,3	20,9	2,0±0,2	2,0±1,6	12,9	57,0	94,3
ЮТ	Усть-Ишимский	54,2	8,2	4,7	260,2	1,3±0,2	1,8±1,2	2,2	77,6	87,3
ЮТ	Итого	28,8	29,6	17,5	102,2	2,0±0,1	6,0±0,4	20,2	55,4	91,8
ОБЛ	Большереченский	1,3	24,6	10,7	43,2	1,2±0,1	1,3±0,4	5,2	51,0	94,7
ОБЛ	Большеуковский	0,0	12,8	20,6	106,5	1,4±0,3	2,5±2,1	32,0	60,7	86,1
ОБЛ	Колосовский	0,0	31,0	6,8	42,5	1,5±0,2	3,3±1,0	13,5	46,3	91,5
ОБЛ	Муромцевский	6,8	36,4	12,8	53,7	2,3±0,2	4,6±1,1	12,1	38,6	97,5
ОБЛ	Итого	2,8	28,0	11,7	51,1	1,6±0,1	2,6±0,4	11,9	47,5	94,9
СЛС	Горьковский	1,8	11,5	2,5	10,0	1,0±0,1	Н.и.	5,2	55,2	72,1
СЛС	Крутинский	0,3	19,6	25,4	39,1	1,5±0,2	3,5±1,2	20,2	24,8	90,2
СЛС	Нижнеомский	0,3	4,3	1,4	8,0	1,3±0,1	1,9±0,8	5,6	40,1	96,0
СЛС	Саргатский	0,3	4,1	4,4	13,7	1,2±0,2	0,5±0,3	7,8	36,1	93,9
СЛС	Тюкалинский	2,4	9,4	4,6	14,4	0,4±0,1	4,3±0,7	0,0	28,7	85,7
СЛС	Итого	1,1	8,9	7,3	17,8	1,1±0,1	2,7±0,4	7,5	37,8	89,2
ЮЛС	Омский	0,2	0,8	0,8	1,6	0,2±0,03	0,6±0,2	3,0	7,8	96,1

наличие статистически значимой выраженной прямой связи между среднеголетними показателями привитости против КЭ детей 4-14 лет и доли детей 0-3 лет в структуре заболевших КЭ за период 1999-2009 гг. (коэффициент ранговой корреляции по Спирмену равен 0,86,  $p < 0,05$ ).



По оси ординат: процентное отношение интенсивного показателя заболеваемости КЭ в данной возрастной группе к аналогичному показателю у взрослых.

Рис. 3. Динамика по возрастной заболеваемости КЭ населения эндемичных районов Омской области за период 1995-2009 гг. (в показателях наглядности).

С целью оценки иммунологической эффективности вакцинации в реальных эпидемиологических условиях проведено изучение состояния популяционного иммунитета к вирусу КЭ у населения природных очагов Омской области различной ландшафтной приуроченности в 1999-2009 гг. в сравнении с «допрививочным» периодом 1960-1970 гг., когда сотрудниками Омского НИИПИ [6] проводились аналогичные исследования. Для выявления антител к вирусу КЭ в течение обоих сравниваемых периодов использовали РТГА. Оказалось, что доля населения, иммунного к вирусу КЭ, в 1999-2009 гг. во всех Л-Г подзонах статистически значимо ( $p < 0,01$ ) отличается от аналогичного показателя 1960-1970 гг. Однако среди детей доля иммунных лиц увеличилась во всех эндемичных районах (с 28,5% до 39,7% в зоне ЮТ, с 2,7% до 38,1% в зоне ОБЛ и с 5,7% до 18,6% в зоне СЛС), тогда как среди взрослых рост иммунной прослойки отмечен только в зоне ОБЛ (с 26,8% до 48,1%).

Среди взрослых жителей зоны ЮТ и СЛС, доля иммунных лиц уменьшилась (с 66,5% до 50,0% в зоне ЮТ и с 37,7% до 27,9% в зоне СЛС). Учитывая, что привитость детского населения во всех Л-Г подзонах, в том числе и в подзоне ЮТ, превышает аналогичный показатель для взрослого населения в 1,5-2 раза, есть основания полагать, что рост иммунной прослойки среди детей связан с массовой иммунизацией этого контингента. Из 112 обследованных детей в возрасте от 0 до 3 лет только у трех ( $2,7 \pm 1,5\%$ ) были обнаружены антигемагглютинины к вирусу КЭ.

Интересен тот факт, что сегодня между величинами иммунной прослойки среди детей и взрослых различия не велики ( $39,7 \pm 2,5\%$  и  $50,0 \pm 1,7\%$  в подзоне ЮТ), а в подзонах ОБЛ и СЛС – статистически не значимы ( $38,1 \pm 4,1\%$  против  $48,1 \pm 2,1\%$  и  $18,6 \pm 3,0\%$  против  $27,9 \pm 1,9\%$  соответственно). Тогда как в 1960-х годах величина иммунной прослойки среди детей была в 10 раз меньше, чем среди взрослых.

Таким образом иммунологическая эффективность вакцинации в реальных эпидемиологических условиях не вызывает сомнений.

В общей структуре заболеваний КЭ в 2003-2009 гг. по сравнению с предыдущими периодами 1995-1998 гг. и 1999-2002 гг. статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличилась доля лихорадочных форм (58,4% против 48,7% и 35,2% соответственно) (рис. 4). При этом отмечено выраженное снижение удельного веса очаговых (до 6,6% против 13,6% и 21,9% соответственно,  $p < 0,01$ ) и 2-х волновых форм (до 1,8% против 9,1% и 8,0% соответственно,  $p < 0,01$ ).

В целом среди лиц, заболевших КЭ, несмотря на вакцинацию, удельный вес лихорадочных форм был выше ( $p < 0,01$ ), чем среди невакцинированных и не получавших экстренной профилактики (68,8% против 45,1%). При этом доля менингеальных и двухволновых форм КЭ среди вакцинированных была значительно ниже ( $17,2\%$  против  $31,4\%$  и  $1,6\%$  против  $7,8\%$  соответственно,  $p < 0,01$ ). Доля очаговых форм во всех сравниваемых группах как среди детей, так и среди взрослых, статистически не отличалась и составляла около 17% среди взрослых и около 9,3% у детей до 14 лет.

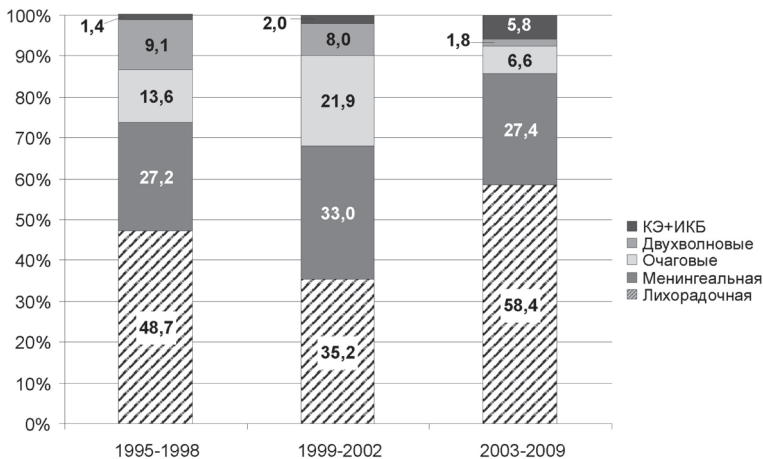


Рис. 4. Изменения структуры клинических форм КЭ на территории Омской области в 1995-2009 гг.

Частота случаев КЭ у вакцинированных в целом была в 4 раза (на 75%) ниже, чем у невакцинированных. Из всех клинических форм в наибольшей степени уменьшилась частота двухволновых (до 0) и менингеальных форм (в 7 раз, то есть на 85,7%). При этом частота возникновения лихорадочных форм снизилась в меньшей степени, только в 2,6 раза (на 61%) по сравнению с группой невакцинированных и не получавших ИГП. Это объясняется более легким течением КЭ у вакцинированных (вместо тяжелых форм развиваются лихорадочные). Частота очаговых форм КЭ среди вакцинированных снизилась на 77,5% (в 4,44 раза) по сравнению с невакцинированными.

С помощью методов формальной логики в ходе ретроспективного анализа среднесезонных показателей вирусфорности переносчиков, обращаемости населения по поводу присасывания клещей в 1999-2009 гг. и доли больных с неустановленными путями передачи инфекции, уровня эпидемической опасности в предшествующем периоде 1988-1998 годах и ландшафтно-географических характеристик, было выбрано 7 пар районов, сопоставимых по уровню популяционного риска заражения, но значительно отличающихся по заболеваемости населения КЭ в 1999-2009 гг. Сравнивали следующие районы: Знаменский и Седельниковский, Тарский и Седельниковский, Тарский и Муромцевский, Большеуковский и Колосовский, Крутинский и Колосовский, Тевризский и Усть-Ишимский,

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иерусалимский А.П. Клещевые инфекции в начале XXI века // Неврол. журн. – 2009. – №3. – С.16-21.
2. Коротков Ю.С., Шеланова Г.Н., Богданова Н.Г. Динамика заболеваемости клещевым энцефалитом в Удмуртии на протяжении полувека (1957-2007 гг.) // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова. – М., 2008. – Т. 25. – С.80-90.
3. Львов Д.К., Злобин В.И. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе // Вопр. вирусологии. – 2007. – №5. – С.26-30.
4. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (обзор

Крутинский и Тюкалинский. Установлено, что в районах с меньшими показателями заболеваемости были статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше объемы специфической профилактики: в четырех наблюдениях – и вакцинации, и ИГП; в двух – только ИГП; в одном – только вакцинации.

В качестве еще одного метода решения вопроса об эффективности вакцинации как противоэпидемического мероприятия был использован метод кластерного анализа (метод k-средних), который продемонстрировал, что более широкий охват вакцинацией населения семи северных районов, отличающихся очень высоким уровнем заболеваемости КЭ в период циклического подъема 1988-1998 гг., способствовал более выраженным темпам снижения заболеваемости (в среднем на 59%) в период циклического спада в 1999-2009 гг. по сравнению остальными эндемичными районами, где заболеваемость КЭ в 1988-1998 гг. и охват вакцинацией в 1999-2009 гг. были существенно ниже (в 4 и 1,5 раза соответственно), а темп снижения заболеваемости составил только 13,9%.

Таким образом, влияние специфической профилактики на проявления эпидемического процесса КЭ, в том числе в период макроциклического снижения его интенсивности, можно оценить в ходе сравнительного ретроспективного анализа многолетних данных о заболеваемости и объемах профилактических мероприятий в разных возрастных и социальных группах населения территорий, сопоставимых по уровню популяционного риска заражения, используя следующие методические приемы: анализ динамики интенсивных и экстенсивных показателей заболеваемости детей относительно аналогичных показателей взрослых; парное сравнение районов; анализ динамики структуры клинических форм; кластерный анализ.

Эпидемиологическая эффективность вакцинации против КЭ в период макроциклического снижения интенсивности эпидемического процесса в Омской области проявилась увеличением темпов снижения заболеваемости в административных районах с более широким охватом населения профилактикой, снижением интенсивных показателей заболеваемости детей 4-17 лет до уровня аналогичных показателей взрослых, уменьшением удельного веса детей и увеличением доли лихорадочных форм в общей структуре заболеваний.

полувекового опыта) // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – №1. – С.53-59.

5. Пеньевская Н.А. Этиотропные препараты для экстренной профилактики клещевого энцефалита: перспективные разработки и проблемы эпидемиологической оценки эффективности // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – №1. – С.39-45.

6. Пригородов В.И., Бусыгин Ф.Ф., Чудинов П.И., Нецкий Г.И. Ландшафтно-эпидемиологическое районирование Новосибирской и Омской областей по клещевому энцефалиту и омской геморрагической лихорадке // Эпидемиологическая география клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки и клещевого риккетсиоза Азии в Западной Сибири. – Омск, 1973. – С.88-105.

**Информация об авторах:** Пеньевская Наталья Александровна – д.м.н., заведующий кафедрой, e-mail: nar20052005@yandex.ru; Вайтович Марина Анатольевна – к.м.н., заведующая эпидотделом; Рудаков Николай Викторович – д.м.н., профессор, директор; Рудакова Светлана Анатольевна – д.м.н., главный научный сотрудник, заведующий лабораторией боррелиозов и паразитозов.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ НОВОСИБИРСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА И НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Наталья Николаевна Ливанова<sup>1,2</sup>, Вячеслав Юрьевич Боргояков<sup>1</sup>, Станислав Генрихович Ливанов<sup>2</sup>,  
Нина Викторовна Тикунова<sup>1</sup>, Наталия Владимировна Фоменко<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН – акад. РАН В.В. Власов, лаборатория молекулярной микробиологии, зав. – д.б.н. Н.В. Тикунова, лаборатория генной диагностики, зав. – к.м.н. Е.Д. Чикова; <sup>2</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН – д.б.н., проф. В.В. Глухов, лаборатория зоомониторинга, зав. – д.б.н., проф. Ю.С. Равкин; <sup>3</sup>ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов)

**Резюме.** Показано, что в лесопарковой зоне Новосибирского научного центра устойчиво обитают *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, при явном преобладании последнего. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI клещей двух видов из Новосибирской обл. с соответствующими опубликованными продемонстрировал высокую степень родства с последовательностями представителей этих видов, обитающими на территории Японии и Китая. Установлено, что *I. pavlovskyi* наравне с таёжным клещом участвует в поддержании циркуляции боррелий. От клещей двух видов получены первичные изоляты боррелий группы *Borrelia burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*.

**Ключевые слова:** Новосибирская область, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, численность, распределение, боррелии, изоляты, молекулярное типирование.

## CHARACTERISTIC OF NATURAL FOCI OF TICK-BORNE BORRELIOSIS IN NOVOSIBIRSK SCIENTIFIC CENTER AND NOVOSIBIRSK REGION (RUSSIA)

N.N. Livanova<sup>1,2</sup>, V.Yu. Borgoyakov<sup>1</sup>, S.G. Livanov<sup>2</sup>, N.V. Tikunova<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia; <sup>2</sup>Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia; <sup>3</sup>JSC "VECTOR-BEST", Novosibirsk, Russia)

**Summary.** We have detected *Ixodes persulcatus* and *I. pavlovskyi* in the park area of Novosibirsk scientific centre with the domination of *I. pavlovskyi*. The analysis of nucleotide gene sequence of COI gene fragments have demonstrated a high level of relationship between the gene sequence of ticks of mentioned above species distributed in Novosibirsk region, Russia, and the gene sequence published for the same species inhabiting China and Japan. We have determined that *I. pavlovskyi* along with the Taiga tick participates in circulation of *Borrelia* infections. The primary isolates of *Borrelia* belonging to groups of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *B. miyamotoi* were obtained from both species of ticks.

**Key words:** Novosibirsk region (Russia), *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, abundance, distribution, *Borrelia*, Isolates, Molecular typing.

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – группа природно-очаговых трансмиссивных инфекций, которые занимают первое место среди заболеваний, передаваемых клещами в умеренных температурных зонах северного полушария [1,9,20]. Только в Европе ежегодно описывается около 85.000 случаев клещевого боррелиоза [22]. В России в 2007 г., согласно официальной статистике Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заболеваемость клещевыми боррелиозами составила в абсолютных показателях 7234 случая или 5.05:100.000 населения. В 2008 году этот показатель вырос на 6,6%. Сибирский федеральный округ (СФО) занимает третье место по заболеваемости ИКБ среди регионов России, уступая Уральскому и Северо-Западному федеральным округам. С 1992 по 2004 гг. среднегодовой показатель заболеваемости в СФО составил 10,08 на 100 тысяч населения, Новосибирская область занимает пятое место по заболеваемости в СФО по данным инфекциям [10].

Начиная с конца 70-х годов прошлого столетия, в рамках долговременных наблюдений за природными очагами клещевого энцефалита для лесопарковой зоны ННЦ установлен видовой состав и распределение иксодовых клещей [6,11]. Несколько позже в свет вышла серия работ, в которых приведена подробная характеристика основных компонентов природных очагов иксодовых клещевых боррелиозов [8,14,21]. В 2008 г. клещах, отловленных на рассматриваемой территории, детектированы *Borrelia miyamotoi* – боррелии группы клещевых возвратных лихорадок (tick-born relapsing fever, TBRF, КВЛ) [12,13,16,17]. Вместе с тем, данные последних лет позволяют с новых позиций рассматривать вопрос о характере распределения клещей-переносчиков и возбудителей клещевых боррелиозов в лесопарковой

зоне Новосибирского научного центра (ННЦ) и прилегающих территориях. Существование 2 видов клещей *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) и *Ixodes pavlovskyi* (подвид *I. pavlovskyi occidentalis* Filip. et Pan., 1998) требует оценивать роль их симпатрии в эпидемиологической напряженности очагов клещевых боррелиозов. В частности, для природных очагов боррелиозов, поддерживаемых с участием лесного *Ixodes ricinus* (Latre. 1758) и таёжного *I. persulcatus* клещей, высказано предположение о второстепенной роли первого в качестве переносчика боррелий, а их выявление зависит от присутствия таёжного клеща [1]. Рассматривается и иная точка зрения, согласно которой боррелии могут встречаться либо у одного, либо у другого вида клеща [3]. В связи с изложенным, в настоящем сообщении приводятся первые обобщенные сведения о природных очагах клещевых боррелиозов в зоне симпатрии близкородственных видов клещей, расположенных в лесопарковой зоне Новосибирского научного центра.

### Материалы и методы

Учёты и отлов клещей проведены в мае-июне 2009-2011 гг. на территории лесопарковой зоны ННЦ и его окрестностей (83°05'-83°49' в.д. и 54°48'-54°50' с.ш.). Обследованы основные типы местообитаний (сосновые с примесью берёзы и осины, берёзово-осиновые и осиново-берёзовые леса, сосново-берёзовые и берёзово-сосновые леса на залежах, зарастающих берёзой). В Новосибирском (в пределах координат 82°58'-83°19' в.д. и 55°00'-55°02' с.ш.) и Тогучинском районах (83°21'-84°21' в.д. и 54°53'-54°53' с.ш.) обследованы осиново-берёзовые леса, берёзовые колки среди полей и залежей, осиново-берёзовые и берёзовые леса с примесью сосны, а также

берёзово-сосновые леса с включениями осинников. За весь период работ учета выполнены в 11 типах местообитаний, отработано 48 ч., по совокупности пройдено 110 км, на флаг отловлено более 3000 клещей.

В 2010-2011 гг. проведено сопоставление данных морфологического анализа клещей *I. pavlovskiyi* и *I. persulcatus* с таковыми, полученными при анализе фрагмента гена цитохром оксидазы (COI) митохондриального генома клещей. Для этого, из клещей *I. pavlovskiyi* (23 особи) и *I. persulcatus* (33) экстрагированы суммарные нуклеиновые кислоты с помощью набора «Проба НК» (ДНК-технология, Москва). ДНК клещей выявлена с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии праймеров из области гена COI. Подробное описание использованных молекулярно-генетических методов приведено [Ливанова и др. (в печати)]. Определенные последовательности гена COI внесены в базу данных GenBank под номерами: JQ823024, JQ823025, JQ867068, JQ867069, JQ867070, JQ867071, JQ867072.

Изоляция боррелий из клещей обоих видов проведена с использованием искусственной питательной среды BSK-H и набора антибиотиков (Sigma, США). Все процедуры производились с соблюдением техники безопасности [15,16]. Контроль за посевами вели визуально по окраске среды. При изменении окраски среды проводили первичную идентификацию с помощью фазово-контрастной микроскопии препаратов «раздавленной капли». Выявление ДНК боррелий проводили методом двухраундовой мультиплексной ПЦР. Для боррелий комплекса *B. burgdorferi* s. l. использованы праймеры, направленные к генам 5S и 23 S рРНК и позволяющие амплифицировать варибельный межгенный спейсер 5S-23S рРНК. Для боррелий вида *B. miyamotoi* использованы праймеры, направленные к гену *glpQ*. Подробное описание методов приведено ранее [4]. Всего исследовано 206 особей *I. pavlovskiyi* и 199 – *I. persulcatus*, получено и проанализировано 26 первичных изолятов.

### Результаты и обсуждение

Как показали исследования, на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра доминирует клещ *I. pavlovskiyi*. Доля этого вида в местообитаниях многоэтажной и коттеджной застройки (газоны, кустарники внутриквартальные светлостойные и смешанные леса верхней зоны ННЦ) достигает 98%, а средние показатели обилия – 950 особей на 1 га. По мере удаления от жилой зоны (на 15-20 км) показатели обилия *I. pavlovskiyi* снижаются в 2,5 раза, а таёжного клеща – увеличиваются с 50 до 400 особей на гектар. В окрестностях ННЦ для *I. pavlovskiyi* относительно высокие показатели учетов зарегистрированы в сосняках с примесью берёзы и осины (2200 особей на 1 га) и в берёзово-осиновых и осиново-берёзовых лесах с включениями осинников (1900). Меньше клещей этого вида в сосново-берёзовых и берёзово-сосновых лесах (900), единичные встречи клещей этого вида отмечены на залежах, зарастающих берёзой. Относительно высокое обилие таёжных клещей в окрестностях ННЦ характерно для берёзово-осиновых и осиново-берёзовых лесов (600), на зарастающих залежах *I. persulcatus* не встречен. При большей удаленности (в Тогучинском р-не) зарегистрирован только таёжный клещ, численность которого в среднем для всех обследованных местообитаний составила 2.000 особей на 1 га.

Для последовательностей фрагмента митохондриального гена COI клещей *I. pavlovskiyi* и *I. persulcatus* размером 650 п.н. сравнительный анализ показал, что они

высоко гомологичны (99-100%). При этом выявлено 7 различных вариантов нуклеотидных последовательностей, которые на основании результатов филогенетического анализа с высокой достоверностью формируют две группы (рис. 1). В первой группе последователь-

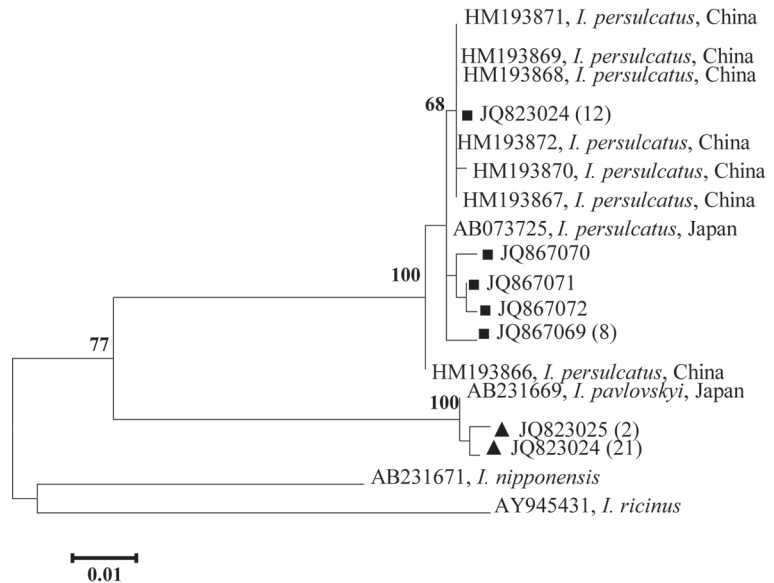


Рис. 1. Филогенетическая диаграмма нуклеотидных последовательностей фрагмента гена субъединицы I цитохром оксидазы С иксодовых клещей, отловленных в Новосибирской обл. Значения статистической достоверности приведены в Новосибирской обл. Внизу показана шкала дивергенции. Последовательности из данной работы выделены квадратами (для *I. persulcatus*) и треугольниками (для *I. pavlovskiyi*).

ности фрагмента гена COI генома митохондрий, полученные в ходе нашего исследования от *I. persulcatus*, кластеризовались с соответствующими последовательностями, ранее опубликованными для этого вида клещей. Вторая группа сформирована полученными нами для *I. pavlovskiyi*, и единственной, имеющейся в базе данных GenBank. Депонированная последовательность (GenBank AB231669) получена от потомков *I. pavlovskiyi* с о. Хоккайдо (Япония), выращенных в лабораторных условиях. К настоящему времени в базе данных GenBank депонировано восемь последовательностей соответствующего фрагмента гена COI митохондрий *I. persulcatus* с указанием места отлова клещей (GenBank ABO73725, HM193866, HM193867, HM193868, HM193869, HM193870, HM193871, HM193872). Филогенетический анализ последовательности фрагмента гена COI митохондрий *I. persulcatus*, отловленных в Новосибирской области, показал, что они ближе всего кластеризовались с таковой *I. persulcatus*, обитающих в Японии на о. Хоккайдо (GenBank ABO73725). Вместе с тем, последовательность JQ867068, обнаруженная в образцах от 10 клещей, совпала с некоторыми нуклеотидными последовательностями рассматриваемого фрагмента гена таёжных клещей с различных удаленных территорий Китая (рис. 1). В целом, анализ филогенетической диаграммы показывает, что внутри видов *I. pavlovskiyi* и *I. persulcatus*, обитающих на территории Азии, последовательности исследуемого фрагмента гена COI высоко консервативны и при проведении молекулярно-генетических исследований позволяют однозначно относить клещей к одному из указанных видов.

В ходе проведения исследования на зараженность клещей боррелиями получено 78 первичных изолятов. При микроскопическом исследовании во всех образцах зафиксированы спирохетоподобные клетки. Из них только 26 сохранили способность к росту при втором пассаже. Установление видовой принадлежности изолированных боррелий показало, что первичные изоляты *B. miyamotoi* не сохранили способность к дальнейшему



росту. Анализ 78 образцов, содержащих спирохетоподобные клетки, с использованием мультиплексной ПЦП показал, что оба вида клещей активно участвуют в циркуляции боррелий группы *B. burgdorferi* s.l. (табл. 1).

Зараженность иксодовых клещей различными видами боррелий в лесопарковой зоне ННЦ и Новосибирской области

Вид клеща	Число зараженных клещей n (%±2mp)						
	Bg	Va	Vm	Bg + Va	Bg + Vm	Va + Vm	Vm+Bg+Va
<i>I. persulcatus</i>	19 (9,5±4,2)	3 (1,5±1,8)	0	4 (2,0±1,8)	9 (4,5±3)	2 (1,0±1,4)	1 (0,5±1)
<i>I. pavlovskyi</i>	24 (11,7±4,4)	2 (1,0±1,4)	3 (1,5±1,8)	0	11 (5,3±3,2)	0	0

Примечание: Bg – *B. garinii*, Va – *B. afzelii*, Vm – *B. miyamotoi*.

Из 405 исследованных клещей 13±3,3% были заражены *B. garinii* и *B. afzelii*. Каких либо отличий в частоте встречаемости этих видов боррелий у *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* не выявлено. В первичных изолятах, полученных от таёжных клещей, *B. miyamotoi* не детектирована, в то время как частота встречаемости изолятов *B. miyamotoi* из *I. pavlovskyi* составила 1,5±1,8%. Зафиксировано одновременное присутствие боррелий различных видов в одном клеще. Частота встречаемости микстинфицированных таёжных клещей выше в сравнении с таковой, выявленной для клещей *I. pavlovskyi*. Первые сведения об участии клещей *I. pavlovskyi* в поддержании циркуляции боррелий представлены в 2001 г. [5]. В 2010 г. исследования, проведенные в окрестностях и непосредственно в г. Томске, показали, что там клещи *I. pavlovskyi* наравне с таёжными принимают участие в

передаче патогенных для человека *B. garinii* и *B. afzelii* [19].

Итак, исследования 2009-2011 гг. показали, что в настоящее время в лесопарковой зоне ННЦ и его

окрестностях устойчиво сообитают *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, при явном преобладании последнего. Высокая численность *I. pavlovskyi* зарегистрирована в растительных формациях с преобладанием сосны, подвергающихся интенсивной рекреационной нагрузке. В то же время, в Новосибирском р-не и равнинной части Тоугучинского *I. pavlovskyi* не обнаружен. Филогенетический анализ фрагмента гена COI предшественников группы *persulcatus-ricinus* показал, что внутри видов *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, обитающих на территории Азии, последовательности исследуемого фрагмента гена высоко консервативны. Оба вида клещей принимают участие не только в поддержании циркуляции боррелий группы *B. burgdorferi* s.l., но и *B. miyamotoi*. ДНК *B. miyamotoi* выявлена в крови больных с острыми лихорадочными заболеваниями, развившимися после присасывания клещей [7,13].

Исследования частично финансировались из средств междисциплинарного интеграционного проекта № 135 фундаментальных исследований СО РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

- Алексеев А.Н., Арумова Е.А., Буренкова Л.А., Чунихин С.П. Об особенностях распространения возбудителя болезни Лайма и поведения зараженных им клещей рода *Ixodes* // Паразитол. – 1993. – Т. 27. Вып. 4. – С.389-398.
- Ананьева Л.П. Иксодовые клещевые боррелиозы (Лаймская болезнь). Экология, клиническая картина и этиология // Тер. архив. – 2000. – № 5. – С.72-78.
- Арумова Е.В., Гутова В.П., Ершова А.С. и др. Болезнь Лайма в Московской области // РЭТ-инфо. – 2002. – № 41(1). – С.11-18.
- Боржяков В.Ю., Фоменко Н.В., Панов В.В., Чикова Е.Д. Исследование зараженности боррелиями таёжных клещей на территории Новосибирского научного центра СО РАН // Паразитол. – 2010. – Т. 44. Вып. 6. – С.543-556.
- Горелова Н.Б., Коренберг Э.И., Филиппова Н.А., Постик Д. Первая изоляция, патогенных для человека боррелий от клещей *Ixodes pavlovskyi* Rom. // Доклады РАН. – 2001. – Т. 378. №4. – С.1-2.
- Добротворский А.К. 1992. Распределение и многолетняя динамика численности таёжного клеща в северной лесостепи Приобья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1992. – 21 с.
- Колясникова Н.И., Махнева Я.А., Топоркова М.Г. и др. Генодиагностика спектра инфекций, передающихся иксодовыми клещами // Вестн. Уральской гос. мед. акад. – 2010. – №21. – С.187-188.
- Ливанова Н.Н., Добротворский А.К., Панов В.В., Морозова О.В. Взаимоотношения компонентов паразитарных систем иксодовых клещевых боррелиозов на юге Западной Сибири // Сибирский экологический журнал. – 2003. – Т. 10. №5. – С.581-590.
- Оберт А.С., Дроздов В.Н., Рудакова С.А. Иксодовые клещевые боррелиозы: нозогеографические и медико-экологические аспекты. – Новосибирск: Наука, 2001. – 110 с.
- Рудакова С.А. Иксодовые клещевые боррелиозы в сочетанных природных очагах трансмиссивных инфекций Западной Сибири: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук – Омск, 2007. – 40 с.
- Сапегина В.Ф., Доронцова В.А., Телегин В.И. и др. Особенности распределения *Ixodes persulcatus* в лесопарковой зоне г. Новосибирска // Паразитол. – 1985. – Т. 19. Вып. 5. – С.370-373.
- Фоменко Н.В. Гетерогенность *Borrelia* spp. в клещах *Ixodes persulcatus* // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. – Алматы, 2008. – С.227-230.
- Фоменко Н.В., Епихина Т.П., Черноусова Н.Я. Выявление *Borrelia miyamotoi* в крови людей, заболевших в весенне-летний эпидемиологический период // Молекулярная медицина. – 2010. – №3. – С.28-31.
- Фоменко Н.В., Романова Е.В., Караваева Ю.Ю. и др. Разнообразие *Borrelia burgdorferi sensu lato* в природных очагах Новосибирской области // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.93-98.
- Barbour A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes Yale // J. Biol. Med. – 1984. – Vol. 57. – P.521-527.
- Fomenko N.V., Livanova N.N., Chernousova N.Ya. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in natural foci of Novosibirsk region // Int. J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 298. – P.139-148.
- Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan // Int. Journ. Syst. Bacteriol. – 1995. – Vol. 45. – P.804-810.
- Korenberg E.I., Gorelova N.B., Kovalevskii Y.V. Ecology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russia. In: Lyme borreliosis // Biology, epidemiology and control: CAB International. – 2002. – P.175-200.
- Korenberg E.I., Nefedova V.V., Romanenko V.N., Gorelova N.B. The tick *Ixodes pavlovskyi* as a host of spirochetes pathogenic for humans and its possible role in the epizootiology and epidemiology of Borreliosis // Vector-borne zoonotic diseases. – 2010. – Vol. 10. №5. – P.453-458.
- Lindgren E., Talleklint L., Polfeldt T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus* // Env Health Perspect. – 2000. – Vol. 108. – P.119-123.
- Livanova N.N., Morozova O.V., Morozov I.V., et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from Novosibirsk Region (West Siberia, Russia) based on direct PCR // European Journal of Epidemiology. – 2003. – Vol. 18. №12. – P.1155-1158.
- Steere A.C. Lyme disease // The New England Journal of Medicine. – 2001. – Vol. 345. – P.115-125.
- Wang G., van Dam A., Schwartz I., Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications // Clin. Microbiol. Reviews. – 1999. – Vol. 12. №4. – P.633-653.

**Информация об авторах:** Ливанова Наталья Николаевна – ст.н.с., к.б.н., 630090 г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 8, тел. (383) 363-51-57, e-mail: nata-livanova@yandex.ru; Боргояков Вячеслав Юрьевич – аспирант; Ливанов Станислав Генрихович – ст.н.с., к.б.н.; Тикунова Нина Викторовна – зав.лабораторией, доцент, д.б.н.; Фоменко Наталия Владимировна – ст.н.с., к.б.н.

© МОРОЗОВА В.В., ФОМЕНКО Н.В., СТРОНИН О.В., МАТВЕЕВ А.Л., ТИКУНОВА Н.В. – 2012  
УДК 577.27

## РЕПЕРТУАР ГЕННЫХ СЕГМЕНТОВ, КОДИРУЮЩИХ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА, НАПРАВЛЕННЫЕ К АНТИГЕНАМ *BORRELIA GARINII*

Вера Витальевна Морозова<sup>1</sup>, Наталья Владимировна Фоменко<sup>1,2</sup>, Олег Владимирович Стронин<sup>3</sup>, Андрей Леонидович Матвеев<sup>1</sup>, Нина Викторовна Тикунова<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов; <sup>2</sup>ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов, <sup>3</sup>Филиал ФГПУ НПО «Микроген» МЗ РФ НПО «Вирион», Томск, директор – В.П. Морозов)

**Резюме.** В работе исследовали репертуары генных сегментов, кодирующих одноцепочечные антитела человека, направленные к антигенам *Borrelia garinii*. Антитела отбирали из комбинаторных библиотек, полученных на основе мРНК лимфоцитов периферической крови здоровых доноров (N-библиотека) и больных рассеянным склерозом (MS-библиотека). Среди специфичных к антигенам *B. garinii* антител, отобранных из MS-библиотеки, выявлены антитела, содержащие сегменты VH4-39, появляющиеся при рассеянном склерозе, и VH6, экспрессия которого в норме показана только для эмбриональных стадий развития организма. Генные сегменты, кодирующие больше трети антител, отобранных из MS-библиотеки, имели низкий процент гомологии генам зародышевой линии, в то время как гены антител, отобранных из N-библиотеки, высокогомологичны генам зародышевой линии. Методом ТИФА показано, что популяции антител, аффинно обогащенных на антигены *B. garinii*, эффективно связывались с основным белком миелина. Возможно, белки боррелий могут вызывать аутоиммунную реакцию организма, направленную против структур нервной системы, за счет механизмов молекулярной мимикрии.

**Ключевые слова:** *Borrelia garinii*, нейроборрелиоз, комбинаторная библиотека антител, рассеянный склероз.

## REPERTOIRE OF GENE SEGMENTS ENCODING HUMAN SINGLE-CHAIN ANTIBODIES SELECTED AGAINST *BORRELIA GARINII* ANTIGENS

V.V. Morozova<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>1,2</sup>, A.L. Matveev<sup>1</sup>, O.V. Stronin<sup>3</sup>, N.V. Tikunova<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, <sup>2</sup>Joint Stock Company "Vector-Best", <sup>3</sup>Federal State Unitary Company "Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines")

**Summary.** Repertoires of gene segments, coding single-chain human antibodies against *Borrelia garinii* antigens, were explored. Antibodies were selected from combinatorial libraries of single-chain antibodies (scFv), produced using mRNA from PBLs of healthy donors (N-library) and patients with multiple sclerosis (MS-library). Among gene segments from MS-library, encoding *B. garinii*-specific antibodies, VH4-39, incident for MS, and VH6, normally expressing in embryo, were identified. More than a third of gene segments encoding *B. garinii*-specific antibodies from autoimmune library possessed low homology with germ line genes, at the same time gene segments from naive library were highly homologous to germ line genes. Populations of antibodies, enriched against *B. garinii* antigens, effectively bound myelin basic protein in ELISA. Probably, borrelia proteins may cause in organism autoimmune reaction against nervous system, using molecular mimicry mechanism.

**Key words:** *Borrelia garinii*, neuroborreliosis, combinatorial antibody library, multiple sclerosis.

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) – полисистемное заболевание, при котором возможно поражение опорно-двигательного аппарата, нервной и сердечно-сосудистой систем, а также кожи [6]. Наиболее тяжелое проявление ИКБ – нейроборрелиоз, характеризующийся поражением как центральной, так и периферической нервной системы [7]. На территории России широко распространены *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii*, относящиеся к комплексу *B. burgdorferi sensu lato* [14]. Анализ клиники при ИКБ в различных регионах России указывает на преобладание неврологической симптоматики. Принято считать, что с неврологическими проявлениями ИКБ ассоциирован вид *B. garinii* [5].

Поздние поражения нервной системы при ИКБ, проявляющиеся через месяцы и годы после начала заболевания, зачастую после длительного латентного периода, включают в себя признаки поражения всех отделов нервной системы. Выделяют разные варианты его течения: прогрессирующий энцефаломиелит, хроническую радикулополиневропатию, хронический лимфоцитарный менингит, церебральный васкулит, энцефалопатию и др. [1,4]. Хроническое течение ИКБ в России изучено мало, что связано с отсутствием общепринятых критериев диагностики и доступных методов идентификации инфекции. Прогрессирующий энцефаломиелит

при ИКБ нередко имитирует рассеянный склероз (РС) [3,12]. Частота выявления энцефаломиелита при ИКБ невысока и составляет в среднем 4-5% от всех случаев нейроборрелиоза [1]. Чаще всего наблюдается медленное развитие поражения нервной системы с постепенным углублением патологического процесса, имитирующее другие нозологические формы, в частности РС и рассеянный энцефаломиелит. Известно, что у больных с хроническим нейроборрелиозом в ряде случаев в спинномозговой жидкости (СМЖ) могут определяться антитела к основному белку миелина [11]. Сходство симптоматики РС и поражений нервной системы при ИКБ затрудняют диагностику и идентификацию заболевания.

Одним из современных инструментов для исследования иммунного ответа человеческого организма на различные антигены является метод фагового дисплея антител. Этот метод подразумевает создание и использование комбинаторных библиотек Fab-фрагментов или одноцепочечных антител (оцАТ), экспонированных на поверхности нитчатых бактериофагов. Полагают, что популяция антител в такой библиотеке отражает репертуар антител в организме человека. Ранее на основе мРНК лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных РС были сконструированы, соот-

ветственно, наивная (N-) и аутоиммунная (MS-) библиотекы оцАТ человека [2,10]. Задачей данной работы было изучение популяций антител, отобранных из N- и MS-библиотек по связыванию с антигенами *B. garinii*, с целью поиска факторов, влияющих на возникновение патологических изменений нервной системы при ИКБ.

### Материалы и методы

В качестве антигена использовали инактивированную культуру *B. garinii* штамм BgVir-1, сконцентрированную до титра  $10^{11}$  кл/мл. Для наработки бактериофагов использовали штамм *Escherichia coli* TG1 F' [traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, ( $r_k$ - $m_k$ -).

Taq-полимераза производства Сибэнзим (Новосибирск, Россия), набор для секвенирования ДНК производства Applied Biosystems (США), конъюгат антител козы против IgG кролика с щелочной фосфатазой производства Sigma (США), ФСБ-Т – фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий 0,1% Tween 20.

Выделение субклеточных фракций *B. garinii* штамм BgVir-1 проводили по методу Котарски с модификациями [9]. Количество белков в препаратах определяли по методу Лоури. Чистоту полученных фракций оценивали с использованием SDS-гель-электрофореза по Лемли.

Аффинное обогащение проводили, как описано [2]. В ходе раунда аффинного обогащения в различные лунки иммунологического планшета сорбировали антигены мембранной и цитоплазматической фракций в концентрации 50 мкг/мл для первого раунда обогащения и 25 мкг/мл для второго и третьего. Степень обогащения популяций оцАТ, специфичными к антигенам *B. garinii*, оценивали методом непрямого твердофазного ИФА (ТИФА).

Для отбора оцАТ, специфичных к антигенам *B. garinii*, тестировали отдельные клоны из популяций, полученных в результате аффинного обогащения. Супернатанты, полученные при культивировании каждого клона и содержащие бактериофаги с экспонированными на поверхности оцАТ, исследовали в твердофазном ИФА по их связыванию с антигенами *B. garinii*, сорбированными в лунки иммунологического планшета в концентрации 200 нг/лунка. В качестве отрицательного контроля использовали связывание бактериофага M13K07, не несущего на поверхности антитела с антигенами *B. garinii*. Критерием отбора служило превышение сигнала оптической плотности в тестируемом клоне в 5 и более раз над сигналом, который наблюдается в отрицательном контроле.

Последовательности генов, кодирующих отобранные антитела, определяли с использованием праймеров 5'-CAGGAAACAGCTATGAC, 5'-CTATGCGGGCCCATTCATCA и набора BigDye Terminator v3.1 Cycling Sequencing Kit (Applied Biosystems). Последовательности анализировали с использованием программ SeqMap Lasergene и MEGA v. 4.1. Выведенные аминокислотные последовательности анализировали и сравнивали с имеющимися в базе данных NCBI IgBLAST.

### Результаты и обсуждение

В качестве антигенов использовали цитоплазматическую и мембранную фракции *B. garinii*, штамм BgVir-1 (подгруппа NT29), изолированный от таежных клещей, отловленных на территории Томской области. Одной из основных проблем, возникающих при работе с мультивалентными антигенами, такими как бактериальные и вирусные белковые экстракты, является проблема идентификации белков, с которыми связываются полу-

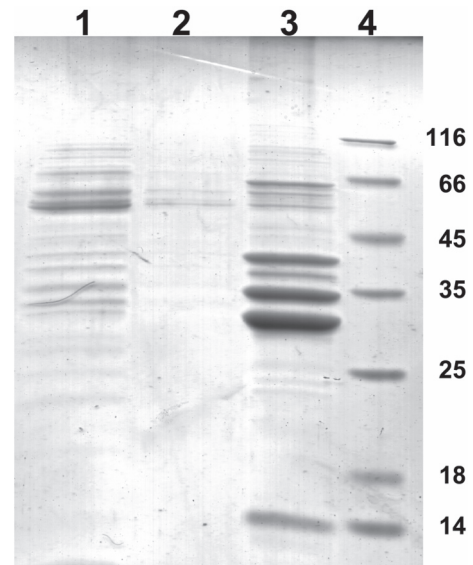


Рис. 1. Выделение субклеточных фракций *B. garinii*: 1 – цитоплазматическая фракция (концентрированная), 2 – исходная цитоплазматическая фракция, 3 – мембранная фракция, 4 – белковый маркер молекулярных масс (Fermentas, Литва).

ченные антитела. Поэтому в нашей работе применили предварительное разделение субклеточных фракций *B. garinii* (рис. 1), Оценка концентраций полученных белковых фракций по методу Лоури показала, что цитоплазматическая фракция содержала 0,18 мг/мл белков, а мембранная фракция – 2,75 мг/мл белков.

N-библиотеку и MS-библиотеку независимо обогащали клонами, продуцирующими антитела, специфически направленными к мембранной и цитоплазматической фракциям *B. garinii*. Процедура аффинного обогащения библиотеки путем повторяющихся раундов связывания антител с антигеном позволяет отбирать бактериофаги, экспонирующие антитела с predeterminedенными свойствами. В результате получили четыре популяции, обогащенные специфическими антителами: mm – популяция антител, отобранных из MS-библиотеки по связыванию с мембранной фракцией *B. garinii*; mc – популяция антител, отобранных из MS-библиотеки по связыванию с цитоплазматической фракцией; nm – популяция ан-

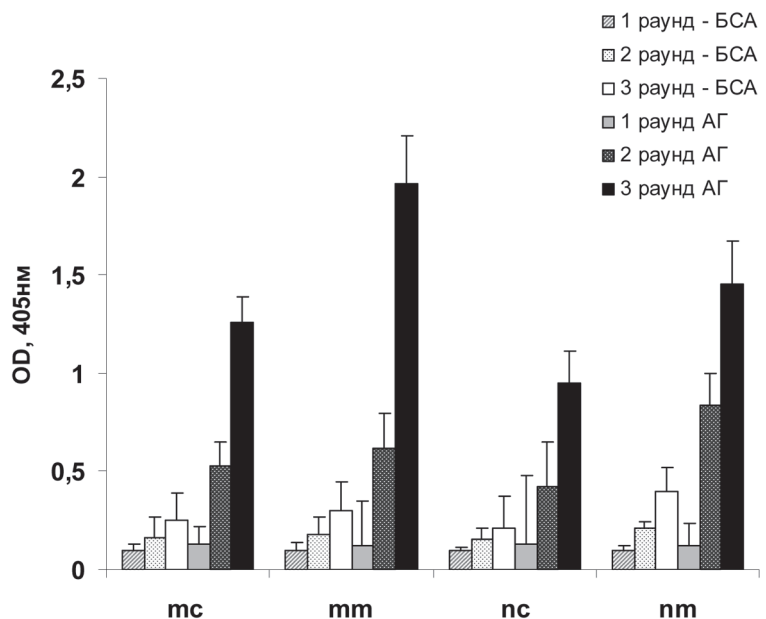


Рис. 2. Связывание обогащенных популяций из N- и MS-комбинаторных библиотек антител с цитоплазматическими и мембранными антигенами *B. garinii* в ТИФА.

Таблица 1

Характеристика генных сегментов, кодирующих варибельные домены одноцепочечных антител человека, направленных к антигенам *B. garinii*

оцАТ	Генные сегменты			Уровень гомологии генам зародышевой линии, %	Генные сегменты		Уровень гомологии генам зародышевой линии, %
	VH	DH	JH		VL	JL	
оцАТ, отобранные из MS-библиотеки по связыванию с цитоплазматическими антигенами							
mcE1 <sup>1</sup>	VH1-8*01	D4-4*01	JH6*03	94,7	KV1-5*03	KJ2*01	98,9
mcB11	VH1-3*01	D6-13*01	JH4*02	97,4	LV8-61*01	LJ7*01	98,3
<b>mcE8</b>	VH3-11*05	D2-21*02	JH6*02	<b>87,5</b>	-----	-----	
mcA1	VH3-23*04	-----	-----	92,9	LV6-57*01	LJ3*01	99
<b>mcA4<sup>2</sup></b>	VH3-23*04	D1-26*01	JH6*03	<b>92,8</b>	KV1-17*01	KJ5*01	96,4
<b>mcH5<sup>2</sup></b>	VH3-23*04	D1-26*01	JH6*03	<b>92,8</b>	LV1-44*01	LJ3*01	98,7
<b>mcH9<sup>2</sup></b>	VH3-23*04	D1-26*01	JH6*03	<b>92,8</b>	LV10-54*01	LJ7*01	95,8
mcB12	VH3-23*04	D3-10*02	JH6*03	92,4	KV3-15*01	KJ2*04	97,8
mcA3	VH3-48*02	D3-3*01	JH6*03	99,7	-----	-----	
mcB2 <sup>3*</sup>	VH3-48*03	D3-22*01	-----	<b>85,8</b>	LV3-19*01	LJ7*01	100
<b>mcB10<sup>3</sup></b>	VH3-48*03	D3-22*01	-----	<b>85,8</b>	KV3-NL5*01	KJ5*01	95,5
<b>mcF1<sup>3</sup></b>	VH3-48*03	D3-22*01	-----	<b>85,8</b>	-----	-----	
mcF5	VH3-48*03	D4-17*01	JH6*02	96,8	LV3-1*01	LJ3*01	98,9
mcG1	VH3-48*03	D4-17*01	JH6*02	96,7	-----	-----	
mcE11	VH3-72*01	D4-4*01	JH6*03	98,3	LV3-19*01	LJ3*01	99,7
mcB7 <sup>4</sup>	VH4-39*01	D3-3*02	JH4*03	90,7	-----	-----	
mcE7 <sup>4</sup>	VH4-39*01	D3-3*02	JH4*03	90,5	LV3-19*01	LJ7*01	91,9
<b>mcA10</b>	VH4-b*02	D1-26*01	JH4*02	<b>85,0</b>	LV8-61*01	LJ3*02	92,1
оцАТ, отобранные из MS-библиотеки по связыванию с антигенами мембранной фракции							
mmD6 <sup>1</sup>	VH1-8*01	D4-4*01	JH6*03	94,6	LV3-19*01	LJ3*01	96,2
mmD1	VH3-9*01	D1-7*01	JH2*01	90,5	LV6-57*01	LJ3*01	92
mmC2	VH3-23*04	D7-27*01	JH2*01	93,8	KV2-30*01	KJ5*01	98,3
mmD11	VH3-23*04	D3-22*01	JH4*03	93,4	LV7-46*01	LJ7*01	92,9
mmE8 <sup>2</sup>	VH3-23*04	D1-26*01	JH6*03	94,5	KV2-30*01	KJ5*01	97,7
mmG4	VH3-23*04	D3-16*01	JH5*01	92,6	LV8-61*01	LJ3*02	96,9
<b>mmA11<sup>3</sup></b>	VH3-48*03	D3-22*01	-----	<b>85,8</b>	KV1D-39*01	KJ1*01	93,4
mmB5 <sup>4</sup>	VH4-39*01	D3-3*02	JH4*03	90,5	LV6-57*01	LJ3*02	97,3
mmH2	VH6-1*01	D5-24*01	JH4*03	98	KV4-1*01	KJ5*01	95,5
оцАТ, отобранные из N-библиотеки по связыванию с цитоплазматическими антигенами							
<b>nmH5</b>	VH1-8*01	D2-21*02	JH6*02	<b>86,7</b>	KV3-11*01	KJ2*01	96,8
nmD7	VH1-46*02	D5-24*01	JH4*02	90,1	KV2D-28*01	KJ1*01	96,2
nmC10	VH3-7*03	D3-9*01	JH4*02	95,4	KV1-9*01	KJ5*01	96
nmB1	VH3-11*01	D3-16*01	JH5*02	93,9	KV1-17*01	KJ4*01	97,9
nmF4	VH3-11*01	D7-27*01	JH4*02	94,4	KV1D-39*01	KJ4*01	92,3
nmA4	VH3-21*01	D4-17*01	JH3*02	91,9	KV3-11*01	KJ3*01	96,2
nmD5	VH3-9*01	D5-5*01	JH6*04	97,9	KV2-30*01	KJ1*01	96,3
nmE8	VH3-23*04	D1-20*01	JH2*01	93,2	KV1D-39*01	KJ1*01	92,0
оцАТ, отобранные из N-библиотеки по связыванию с антигенами мембранной фракции							
ncB9	VH1-2*04	D5-12*01	JH6*02	99,6	KV3-15*01	KJ3*01	96,4
ncB12	VH3-9*01	D1-7*01	JH6*02	92,8	KV3-20*01	KJ4*01	95,0
ncA2	VH3-11*01	D2-8*01	JH5*01	99,6	LV3-19*01	LJ3*01	100
ncC8	VH3-13*01	D6-19*01	JH2*01	92,5	KV1-5*03	KJ3*01	90,8
<b>ncD5</b>	VH3-21*04	D6-13*01	JH5*02	<b>92,5</b>	KV1D-39*01	KJ2*01	93
ncB8	VH3-23*04	D1-26*01	JH4*03	99,6	KV1D-39*01	KJ4*01	95,0
<b>ncG3</b>	VH3-23*04	D4-4*01	JH4*02	<b>88,6</b>	V1D-39*01	KJ4*01	95,0
ncH2	VH3-23*04	D6-19*01	JH4*02	92,1	KV1-17*01	KJ4*01	94,7
ncA12	VH3-30*04	D3-3*02	JH4*02	94,8	KV1D-39*01	KJ4*02	99,3
ncC1	VH3-48*03	D5-5*01	JH4*02	96,7	IGKV1-5*03	KJ1*01	<b>88</b>
ncH10	VH3-49*04	D4-17*01	JH5*02	97,3	KV1D-39*01	KJ1*01	95,1
ncD2	VH3-66*01	D3-10*01	JH4*02	95,8	KV3-20*01	KJ2*03	96,7
ncB10	VH3-74*02	D5-12*01	JH4*03	95,3	KV3-NL5*01	KJ4*01	96,9

Примечание: жирным курсивом отмечены антитела, соответствующие которым генные сегменты и/или гиперварибельные районы, обладают уровнем гомологии с генами зародышевых линий меньше 90%; \* – было выявлено 4 идентичных данному клону с одинаковыми VH и VL доменами; VH домены АТ, отмеченные верхним индексом (1,2,3,4), встречаются в популяциях MS-библиотеки неоднократно.

тител, отобранных из N-библиотеки по связыванию с мембранной фракцией; nc – популяция антител, отобранных из N-библиотеки по связыванию с цитоплазматической фракцией. Обогащение полученных популяций антителами, специфическими к антигенам *B. garinii* подтверждали методом непрямого ТИФА (рис. 2).

Из каждой обогащенной популяции протестировали по 180 клонов на способность продуцировать оцАТ, специфичные к антигенам *B. garinii*. В результате к антигенам цитоплазматической фракции был отобран 21 положительный клон из MS-библиотеки и 13 клонов из N-библиотеки, к белкам мембранной фракции – 10 клонов из MS-библиотеки и 8 – из N-библиотеки.

Для идентификации уникальных антител, отобранных по связыванию с цитоплазматическими и мембранными антигенами *B. garinii*, определяли нуклеотидные последовательности их генов. При анализе соответствующих им аминокислотных последовательностей была установлена принадлежность варибельных доменов тяжелых и легких цепей соответствующим семействам, и степень их сходства с генами зародышевой линии (табл. 1, рис. 3).

Филогенетический анализ генных сегментов показал, что среди VH-сегментов антител, отобранных из обеих библиотек, доминируют VH3-сегменты (табл. 1). Только в популяции антител, отобранных из MS-библиотеки, были обнаружены сегменты VH4-39, характерные для антител, образующихся при РС [13], и сегменты VH6-семейства, экспрессия которого в норме обнаружена лишь на эмбриональных стадиях развития организма человека [16]. Для DH-сегментов, формирующих антитела, отобранные из N-библиотеки, было отмечено равномерное распределение по семействам, что характерно для организма в норме [15]. В то же время для DH-сегментов, формирующих антитела, отобранные из MS-библиотеки, доля DH3-семейства составила более 50%. Среди JH-сегментов, присутствующих в антителах, отобранных из MS-библиотеки, доминировал JH6 сегмент, что так-

же отличается от распределения JH-сегментов антител, отобранных из N-библиотеки. Можно предположить, что спектр генных сегментов, привлекаемых иммунной системой для образования антител, направленных к антигенам *B. garinii*, отличается в норме и при аутоиммунной патологии.

Почти все VH-домены, отобранные из N-библиотеки, обладали более чем 90%-ным сходством с генами зародышевой линии, поэтому можно предположить, что мы имеем дело с низкоаффинными антителами класса IgM. В то же время, значительное количество антител (~ 40%), отобранных из MS-библиотеки, имели низкий уровень гомологии с генами зародышевых линий,

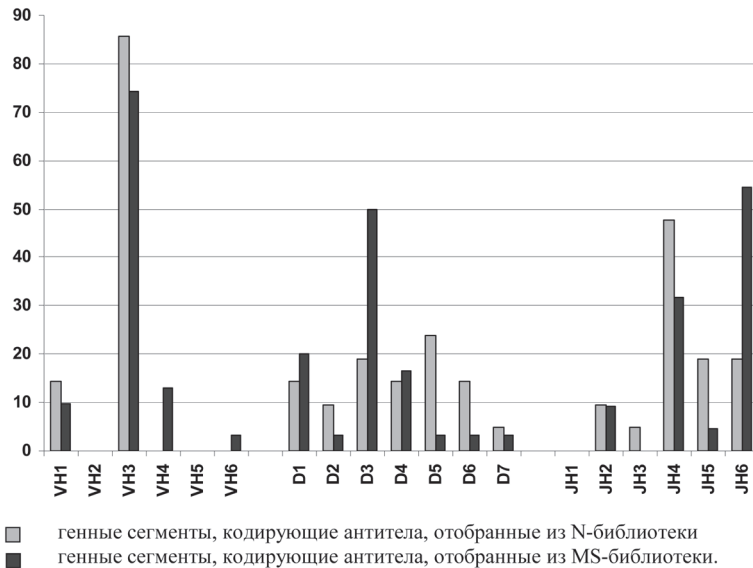


Рис. 3. Различия в представленности генных сегментов (в % от общего количества) в популяциях антител, отобранных против антигенов *B. garinii*.

причем наименьшим процентом гомологии (60-85%) обладали гипервариабельные районы VH-доменов. Вероятно, эти антитела прошли процесс аффинного созревания. Поскольку эти антитела были получены при аффинном обогащении MS-библиотеки против антигенов *B. garinii*, можно предположить, что белки боррелий способны связывать специфические аутоантитела, которые могут образовываться в ходе развития РС.

Еще одной особенностью антител, отобранных из MS-библиотеки против цитоплазматических и мембранных антигенов *B. garinii*, являлось наличие идентичных антител в mm- и mc-популяциях (табл. 1). Для антител, отобранных из N-библиотеки, такого не наблюдалось. По-видимому, часть антител, отобранных из MS-библиотеки, кросс-реактивны, то есть способны связывать эпитопы и мембранных, и цитоплазматических антигенов *B. garinii*.

Полученные популяции антител, аффинно обогащенных на антигены *B. garinii*, были проверены на связывание в тИФА с основным белком миелина (ОБМ), являющимся одной из основных мишеней аутоиммунной реакции при РС. В результате было показано, что все четыре обогащенные популяции оцАТ эффективно связывают ОБМ (рис. 4). Данный факт может свидетельствовать о наличии сходных эпитопов у ОБМ и белков

*B. garinii*, и, как следствие, белки боррелий могут вызывать аутоиммунную реакцию организма, направленную против структур нервной системы, за счет механизмов молекулярной мимикрии.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что в случае попадания антигенов боррелий в организм условно здорового человека гуморальный ответ определяется в первую очередь «наивными» антителами, кодируемыми генами, высокогомологичными генам зародышевых линий и не подвергшимся соматическому гипермутационному процессу. При взаимодействии с антигенами боррелий гуморальной системы, сформированной в ходе развития РС, к иммунному ответу привлекаются, в том числе и аутоиммунные антитела, появившиеся при этой патологии. Можно предположить, что, по крайней мере, некоторые молекулярные механизмы, участвующие как в развитии РС, так и в ряде случаев ИКБ, имеют сходную природу. Дополнительным доказательством такого предположения может служить обнаружение способности антител, специфически направленных к антигенам боррелий, к кросс-реактивному связыванию белков, присутствующих в клетках

нервной системы [8].

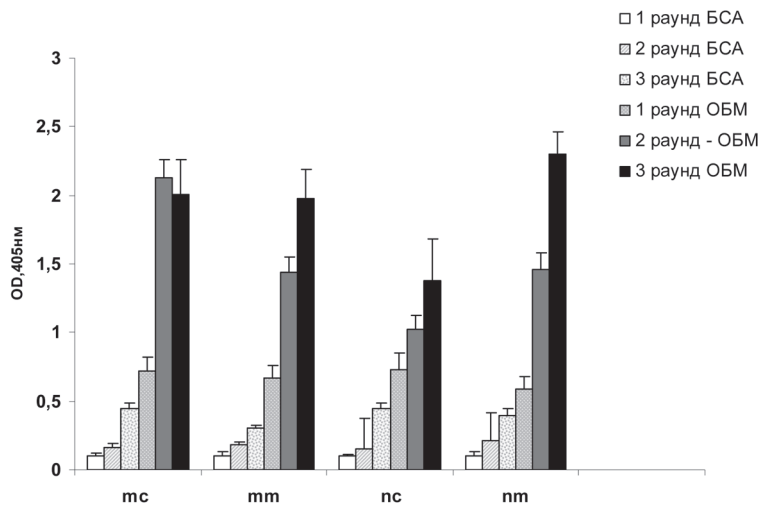


Рис. 4. Связывание популяций антител, аффинно обогащенных против антигенов *B. garinii*, с основным белком миелина в тИФА.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 11-04-01066-а и проекта № 5.25 Программы фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки – медицине» Российской академии наук.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Баранова Н.С., Спирин Н.Н., Шипова Е.Г., Степанов И.О. Поражение нервной системы на отдаленных стадиях Лайм-боррелиоза // Журнал неврологии и психиатрии. – 2010. – №2. – С.90-96.
2. Батанова Т.А., Улитин А.Б., Морозова В.В. и др. Создание и характеристика наивной комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека // Молекулярная генетика, вирусология и микробиология. – 2006. – №3. – С.35-41.
3. Вельгин С.О., Протас И.И., Понамарев В.В. и др. Клинический полиморфизм нейроборрелиоза в поздней стадии заболевания // Журнал неврологии и психиатрии. – 2006. – №3. – С.48-51.
4. Деконенко Е.П., Уманский К.Г., Вирис И.Е. Основные синдромы неврологических нарушений при Лайм-боррелиозе // Тер. арх. – 1995. – №1. – С.52-56.
5. Лесняк О.М., Истомина О.Ю., Рипкема Ш. и др.

Клинические проявления Лайм-боррелиоза на Среднем Урале и их ассоциации с геновидами *Borrelia burgdorferi* // Тер. арх. – 1997. – №5. – С.9-12.

6. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (Иксодовые клещевые боррелиозы). – СПб.: Фолиант, 2000.
7. Ackermann R., Gollmer E., Kupper B. Progressive Borrelien-Enzephalomyelitis: Chronische Manifestation der Erythema Chronicum Migrans Krankheit am Nervensystem // Dtsch Med Wochenschr. – 1985. – №110. – С.1039-1042.
8. Birner P., Gatterbauer B., Drobna D., Bernheimer H. Molecular Mimicry in Infectious Encephalitis and Neuritis: Binding of Antibodies Against Infectious Agents on Western Blots of Human Nervous Tissue // Journal of Infection. – 2000 – Vol. 41 – P.32-38.
9. Bledsoe H.A., Carroll J.A., Whelchel T.R., et al. Isolation and Partial Characterization of *Borrelia burgdorferi* Inner and Outer Membranes by Using Isopycnic Centrifugation // Journal of Bacteriology. – 1994. – Vol. 176. – P.7447-7455.

10. Gabibov A.G., Belogurov A.A., Lomakin Y.A., et al. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen // *FASEB J.* – 2011. – Vol. 25 – P.4211-4221.

11. Heller J., Holzer G., Schimrigk K. Immunological differentiation between neuroborreliosis and multiple sclerosis // *J. Neurol.* – 1990. – Vol. 237 – P.465-470.

12. Logigian E.L., Kaplan R.F., Steere A.C. Chronic neurologic manifestations of Lyme disease // *N. Engl. J. Med.* – 1990. – Vol. 323 – P.1438-1444.

13. Owens G.P., Wings K.M., Ritchie A.M. VH4 gene segments

dominate the intrathecal humoral immune response in multiple sclerosis // *J. Immunol.* – 2007 – Vol. 179 – P.6343-6351.

14. Postic D., Korenberg E., Gorelova N., et al. Borrelia burgdorferi sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates // *Res. Microbiol.* – 1997. – Vol. 148. – P.691-702.

15. Tiller T., Tsuiji M., Yurasov S. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells // *Immunity.* – 2007 – Vol. 26 – P.205-213.

16. Tonnelle C., Cuisinier A.M., Gauthier L. Fetal versus adult PreB or B cells: the human VH repertoire // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 1995 – Vol. 764 – P.231-241.

**Информация об авторах:** Морозова Вера Витальевна — к.б.н., старший научный сотрудник, 630090, г. Новосибирск, Академика Лаврентьева проспект, 8, тел. (383)-363-51-57, e-mail: morozova@niboch.nsc.ru; Фоменко Наталья Владимировна — к.б.н., научный сотрудник; Стронин Олег Владимирович, к.м.н., начальник отделения; Матвеев Андрей Леонидович — аспирант; Тикунова Нина Викторовна — д.б.н., заведующая лабораторией.

© ТЮЛЬКО Ж.С., ЯКИМЕНКО В.В. – 2012  
УДК 578.2'21

### ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, СВЯЗАННАЯ С ИХ СТРУКТУРОЙ

Жанна Сергеевна Тюлько<sup>1</sup>, Валерий Викторович Якименко<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Омская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. А.И. Новиков; кафедра физики, математики, медицинской информатики, зав. – к.ф.м.н. Ю.Б. Никитин; <sup>2</sup>Омский НИИ природно-очаговых инфекций, директор – д.м.н., проф. Н.В. Рудаков, лаборатория арбовирусных инфекций, зав. – д.б.н. В.В. Якименко)

**Резюме.** Для обнаружения корреляций при возникновении нуклеотидных замен в первичных последовательностях генома вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) был использован метод выявления связанных изменений в символьных последовательностях, основанный на подсчете взаимной информации. По результатам анализа обнаружены статистически значимые корреляции при возникновении нуклеотидных замен (как синонимичных, так и несинонимичных) на удаленных друг от друга участках генома. Сравнение известных описаний структурных элементов нуклеотидной последовательности ВКЭ с полученной схемой корреляций нуклеотидных замен показало, что наблюдаемые корреляции выявлены для одонитевых участков стеблей шпильчатых структур вирусной РНК, взаимодействующих друг с другом при образовании третичной структуры. Предложенный метод позволяет определять участки вирусной РНК, имеющие значение при формировании третичной структуры молекулы.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, связанные нуклеотидные замены, третичная структура РНК.

### THE NUCLEOTIDE SEQUENCES VARIABILITY OF GENOMES OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ASSOCIATED WITH THEIR STRUCTURE

J.S. Tjulko<sup>1</sup>, V.V. Yakimenko<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Omsk State Medical Academy; <sup>2</sup>Omsk Institute of Natural Foci Infections of Russian Federal Service for Consumer Rights and Welfare Controls)

**Summary.** For detection of correlations in nucleotide substitution occurrence in TBE-virus genome nucleotide sequences, the method of revealing of the connected changes in the symbolical sequences, based on calculation of the relative information was used. By the results of the analysis, statistically significant correlations have been found out in nucleotide substitution occurrence (both synonymous, and not synonymous) on the sites of genome, removed from each other. Comparison of known descriptions of nucleotide sequence of structural elements with the received circuit of correlations has shown, that the found out correlations are revealed for unpaired nucleotides in stalks of RNA hairpins. Such hairpins cooperate with each other in formation of tertiary RNA-structure. The presented method allows to define RNA sites, which are important in formation of tertiary structure of a molecule.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus, connected nucleotide substitution, tertiary RNA-structure.

В рамках современных представлений о генетической вариабельности вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) выделяют не менее трех основных генотипов (геновидов) вируса, два из которых имеют крайне широкое географическое распространение в северной Евразии [2]. Высокий уровень экологической пластичности широко распространенных геновидов ВКЭ предполагает существование достаточно вариабельных биологических свойств штаммов ВКЭ, что регистрируется при изучении структуры природных очагов клещевого энцефалита (КЭ). Данное сообщение ориентировано на выявление подходов к определению детерминированности биологических свойств вирусов, а именно – поиску механизмов изменений биологических свойств, связанных непосредственно с изменениями первичной структуры генома вируса, и (или) – опосредованно – с

изменениями пространственной структуры молекулы.

Применение подобных подходов становится возможным в связи с увеличением количества нуклеотидных последовательностей ВКЭ, размещаемых в банках данных и накоплением информации о мутациях в вирусном геноме и структурных особенностях организации вирусных РНК.

Нуклеокапсид вирусной частицы флавивирусов, включает в себя капсидный белок С и геномную +РНК. Он окружен липидной мембраной, содержащей М (мембранный) и Е (оболочечный) белки. Геномная РНК флавивирусов кодирует три структурных (С, М и Е) и семь неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), которые последовательно считываются в единой рамке считывания и нужны для успешного размножения вируса в клетках хозяина, хотя на сегодня

ня не все функции этих белков известны [8,11]. В 5'- и 3'-некодирующих концевых последовательностях, расположенных по бокам рамки считывания, содержатся регуляторные элементы РНК, которые, необходимые для осуществления репликации и могут участвовать в формировании вторичной структуры РНК. Существует общая схема расположения регулирующих элементов РНК флавивирусов, сохраняющихся вторичных структур РНК, консервативных и переменных участков генома [12]. Вторичная структура РНК вирусов чувствительна к возникновению мутаций. Эффекты, вызываемые появлением синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен, определяются местом их возникновения [10,11], которое может соответствовать расположению регуляторных элементов РНК, а также особенностями вторичной структуры РНК, измененной их появлением. Важность изучения не только количества различий (замен) между нуклеотидными последовательностями, но и наличия возможных связей между отдельными точечными мутациями в разных частях генома, уже была показана ранее [6]. Дальнейшее изучение таких связей, сопоставление их местоположения в вирусных РНК с положением известных консервативных структур РНК, поможет составить представление о взаимодействиях этих структур друг с другом и их роли в вирусном геноме. Выявление подобных закономерностей процесса возникновения мутаций невозможно без использования различных статистических методов [6,7].

Цель работы: обнаружение корреляций при возникновении нуклеотидных замен в кодирующих последовательностях РНК ВКЭ с последующим анализом расположения сайтов, в которых наблюдаются связанные нуклеотидные замены. А также сопоставление, полученной схемы корреляций с расположением структурных особенностей вирусных РНК и некоторых группоспецифичных мутантных сайтов.

### Материалы и методы

В работе анализировались полноразмерные нуклеотидные последовательности ВКЭ, полученные из банка данных EMBL в режиме свободного доступа (коды доступа в банке: AV062063, AV062064, AV507800, AF069066, AF253419, AF253420, AF527415, AM600965, AY169390, AY182009, AY193805, AY217093, AY323490, AY438626, DQ153877, DQ401140, DQ486861, DQ862460, DQ989336, EF469661, EF469662, EU480689, EU543649, EU670438, EU770575, EU790644, EU816450, EU816451, EU816452, EU816453, EU816454, EU816455, FJ402885, FJ402886, FJ572210, FJ906622, FJ968751, FJ997899, GQ228395, GQ266392, GU121642, GU183379, GU183380, GU183381, GU183382, GU183383, GU183384, HM055369, HM120875, HM440558, HM440559, HM440560, HM440561, HM440562, HM440563, HM535610, HM535611, HM859894, HM859895, HQ201303, HQ901366, HQ901367, JF316707, JF316708, JF819648, JN003205, JN003206, JN003207, JN003208, JN003209, JN229223, L06436, L40361, U27491, U27495, U39292).

Для выравнивания последовательностей и расчета филогенетических деревьев применялась программа Clustal X (1.8), в которой использовались методы: множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей (Multiple Alignments) со следующими значениями параметров GAP OPENING=20, DELAY DIVERGENT SEQUENCES=30%, TRANSITION WEIGHT=0.6; для расчета филогенетических деревьев (BOOTSTRAP N-J TREE), при значении параметра bootstrap replicates  $\geq 1000$ .

Компьютерных программы, для поиска корреляций, написаны на языке «Фортран».

Для обнаружения корреляций при возникновении нуклеотидных замен в первичных последовательностях генома ВКЭ был использован метод выявления связанных изменений в символьных последовательностях, основанный на подсчете взаимной информации [4,5].

Для этого в массивах выровненных последовательностей сравнивались столбцы с разными координатами, отсчитываемыми от первого нуклеотида в кодирующей части последовательности (рис. 1). Каждый столбец

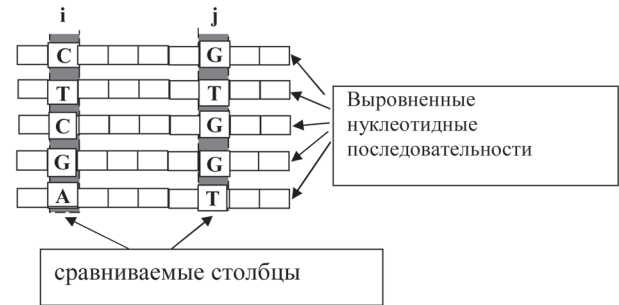


Рис. 1. Схема подсчета значений  $MJ_{ij}$  в массиве выровненных нуклеотидных последовательностей.

представляет собой символьную последовательность, которую можно сравнить с другими. В качестве меры подобия символьных последовательностей использовалось значение взаимной информации – MJ. Удвоенное значение MJ распределено как случайная величина  $\chi^2$ , поэтому можно оценить вероятность случайной взаимосвязи двух последовательностей в одном испытании и выбрать значение минимального уровня взаимной информации  $MJ_{min}=70$ , обеспечивающее для имеющейся выборки обнаружение статистически значимой взаимосвязи символьных последовательностей, с вероятностью ошибки  $p < 0,05$  [3]. Анализировалась только кодирующая часть вирусной РНК, т.к. некодирующие 5' и 3'-концевые последовательности плохо представлены в банках данных.

Таким образом, для анализируемого массива выровненных последовательностей рассчитывается набор значений  $MJ_{ij}$  ( $i, j$  – координаты первого и второго из пары сравниваемых столбцов), характеризующий возможную связь между заменами нуклеотидов в каждой позиции, с заменами во всех других позициях последовательности.

### Результаты и обсуждение

Анализ расширенной подборки полноразмерных кодирующих первичных последовательностей генома ВКЭ позволил выявить многочисленные значимые корреляции при возникновении синонимичных и несинонимичных замен нуклеотидов (более случаев 800), подтверждая данные о существовании сложных взаимодействий между различными участками вирусной РНК, полученные ранее по меньшей выборке [6]. Обнаруженные случаи корреляций распределяются неравномерно вдоль последовательности по той же самой схеме и затрагивают удаленные друг от друга части генома, кодирующие разные белки (рис. 2). Причем корреляции с наибольшими значениями MJ ( $MJ \geq 80$ ) связывают мутантные сайты, расположенные на участках, кодирующих разные гены (21 случай). Только 4 таких случая, связывают сайты, расположенные в пределах одного гена.

Имеющихся описаний вторичной структуры РНК вирусов ВКЭ недостаточно для однозначного объяснения полученной схемы корреляций. Но данные по вторичной структуре участка с координатами 1-330 нуклеотидов (далее н.) [11] (рис. 3), сопоставленные с координатами нуклеотидных замен, для которых выявлены корреляции, показали, что положение сайтов, где наблюдаются связанные замены, соответствует трем одонитевым (неспаренным) участкам стеблей шпильки РНК, обозначаемых: SL4 (140 н.), SL6 (217 н., 219 н.), и шпильке, не имеющей обозначения (299 н.). Показано наличие значимых корреляций между заменами, возникающими в позициях 140 н. и 299 н. (рис. 3).

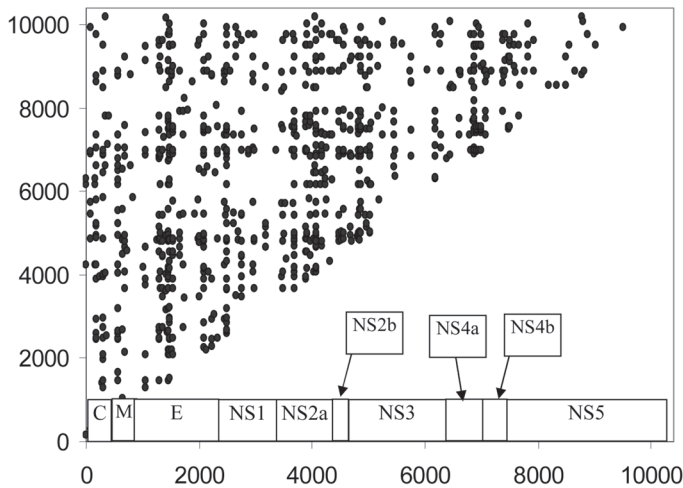


Рис. 2. Схема размещения выявленных корреляций в кодирующей части генома ВКЭ. Точками на диаграмме отмечены выявленные случаи значимых корреляций, координаты точек на рисунке соответствуют координатам, отсчитываемым от первого нуклеотида кодирующей последовательности.

Есть сведения, о том, что шпилька SL6 участвует в регуляции кинетики размножения вирусов [11], являясь энхансерным элементом, регулирующим репликацию, т.е. взаимодействует со структурами, расположенными

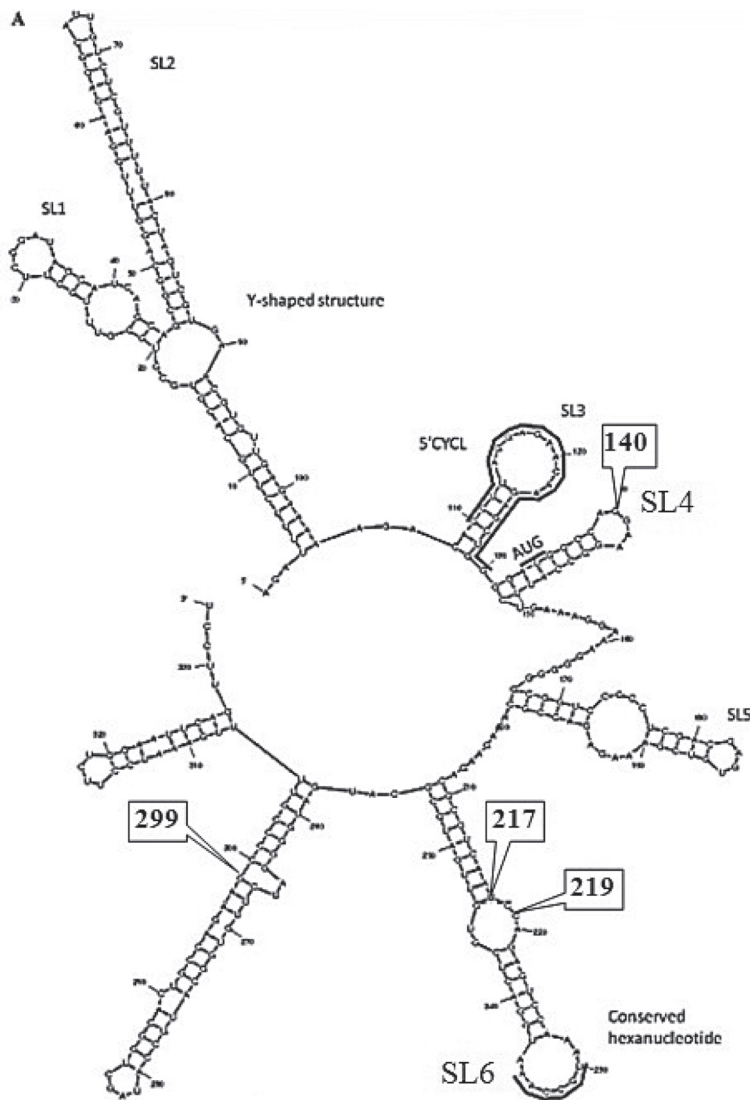


Рис. 3. Первые 333 нуклеотида генома ВКЭ. Рисунок приводится по Tuplin A., 2011 [11]. Выносками с номерами отмечены нуклеотиды, для которых обнаружены связанные замены.

в других частях РНК. Наши данные подтверждают это: выявлены корреляции замен для нуклеотидов с координатами 217 н. и 219 н. и связанных с ними заменами, возникающими в последовательностях, кодирующих структурный белок Е и неструктурные белки NS3, NS4B, NS5.

Эти данные, а также данные о местоположении связанных нуклеотидных замен в РНК хантавирусов [4,5] позволяют предположить, что выявляемые корреляции отражают картину взаимодействий, возникающих между отдельными частями вирусной РНК при формировании ее третичной структуры.

Используя такое представление о природе выявленных корреляций и полученную схему локализации связанных замен в последовательности РНК, можно объяснить возникновение некоторых группоспецифических мутаций. В работе [1], исследующей роль мутаций в изменении патогенных свойств вируса, было обнаружено 19 сайтов, мутации которых являются специфичными для групп инвазивных и высоковирулентных штаммов и могут быть связаны с изменением патогенности вируса. При этом большая часть таких мутаций, характерных для изучаемых штаммов, не приводит к существенному изменению свойств аминокислот. Мы сравнили координаты этих аминокислот, со схемой выявленных корреляций. Сравнение показало, что шесть из них включены в схему связанных замен.

Эти аминокислоты (далее а.к.) приходятся на различные гены: М- 246 а.к., NS1-917 а.к., NS3-1505 а.к., NS4B-2354 а.к. и 2438 а.к. (координаты даны по положению в полипротеине штамма Sofjin-НО). Замены, выявленные в вышеперечисленных сайтах, не вызывают существенного изменения физико-химических свойств аминокислоты [1]. Исключением является только замена в NS1-917 а.к., которая, однако не затрагивает функционально значимые участки белка. Механизм действия таких мутаций на патогенность не выяснен.

Однако можно предположить, что возникновение мутаций в этих сайтах или в сайтах, связанных с ними корреляционной схемой, может деформировать стебель шпильчатой структуры вирусной РНК и изменить картину третичных взаимодействий. Это, в свою очередь, может влиять на процессы приспособления вируса и результаты отбора в процессе адаптации и, как следствие – на патогенность. Так в опытах с адаптацией вируса клещевого энцефалита к клеткам ВНК-21 отмечалось возникновение, как несинонимичных, так и синонимичных замен, которые меняют только вторичную структуру РНК [9].

Увеличение числа анализируемых нуклеотидных последовательностей вируса ВКЭ, позволит в перспективе уточнить схему корреляций нуклеотидных замен, выявить участки последовательности, вовлекаемые в третичные взаимодействия и дифференцировать типы таких взаимодействий. Этот подход может помочь при отборе возможных вариантов третичной структуры вирусной РНК, моделирование которой является сложной задачей динамического программирования и требует одновременного учета многих факторов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беликов С.И., Леонова Г.Н., Кондратов И.Г. и др. Анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, обладающих различной вирулентностью для человека // Тихоокеанский медицинский журнал. – Владивосток, 2010. – №3. – С.23-26.
2. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии // Вопросы эко-



логии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции. – Новосибирск: Наука, 2002. – 438 с.

3. Кульбак С. Теория информации и статистика. – М.: Наука, 1967. – 220 с.

4. Тюлько Ж.С., Якименко В.В. Изучение филогенетических отношений хантавирусов с применением метода вычисления взаимной информации (на примере Хантаан-подобных вирусов) // Хантавирусы и хантавирусные инфекции. – Владивосток, 2003. – С.173-181.

5. Тюлько Ж.С., Якименко В.В. Связанные замены в малом сегменте генома хантавирусов Старого света // Вопросы вирусологии. – 2008. – №3. – С.28-34.

6. Тюлько Ж.С., Якименко В.В. К проблеме изменчивости генома вирусов клещевого энцефалита // Национальные приоритеты России. Специальный выпуск. – 2011. – №2. – С.168-170.

7. Firth A.E., Atkins J.F. A conserved predicted pseudoknot in the NS2A-encoding sequence of West Nile and Japanese encephalitis flaviviruses suggests NS1 may derive from ribosomal frameshifting // Virology Journal. – 2009. – Vol. 6. – P.1-6.

8. Grard G., Moureau G., Charrel R.N., et al. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy // Virology. – 2007. – Vol. 361. – P.80-92.

9. Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., et al. Adaptation of Tick-Borne Encephalitis Virus to BHK-21 Cells Results in the Formation of Multiple Heparan Sulfate Binding Sites in the Envelope Protein and Attenuation In Vivo // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75. №12. – P.5627-5637.

10. Marin M.S., Zanotto P.M., Gritsun T.S., Gould E.A. Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus Flavivirus // Virology. – 1995. – Vol. 206. №2. – P.1133-1139.

11. Tuplin A., Evans D.J., Buckley A., et al. Replication enhancer elements within the open reading frame of tick-borne encephalitis virus and their evolution within the Flavivirus genus // Nucleic Acids Research. – 2011. – Vol. 39. №16. – P.7034-7048.

12. Thurner C., Witwer C., Hofacker I.L., Stadler P.F. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes // Journal of General Virology. – 2004. – Vol. 85. – P.1113-1124.

**Информация об авторах:** Тюлько Жанна Сергеевна – доцент кафедры, к.б.н., 644043, ул. Ленина, 12, тел. (3812) 23-02-11, факс (3812) 23-46-32, e-mail tjs@omsk-osma.ru; Якименко Валерий Викторович – заведующий лабораторией, руководитель, д.б.н., ст.н.с., 644080, Омск, пр. Мира 7, тел. (3812) 650304, e-mail vyakimenko78@yandex.ru

© БАЙКОВ И.К., МАТВЕЕВ Л.Э., МАТВЕЕВ А.Л., ТИКУНОВА Н.В. – 2012  
УДК 578.833.2:612.017.1:575.2

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВАРИАТЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Иван Константинович Байков, Леонид Эдуардович Матвеев,  
Андрей Леонидович Матвеев, Нина Викторовна Тикунова  
(Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,  
директор – академик РАН В.В. Власов)

**Резюме.** Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих вариативные домены моноклональных антител против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита – потенциальных прототипов для конструирования терапевтических антител. Установлено, что вируснейтрализующие моноклональные антитела обладают значительным сходством вариативных доменов легких и тяжелых цепей.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, гликопротеин E, моноклональное антитело, вариативные домены иммуноглобулинов.

### COMPARATIVE ANALYSIS OF VARIABLE DOMAINS OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

I.K. Baykov, L.E. Matveev, A.L. Matveev, N.V. Tikunova  
(Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SD RAS, Novosibirsk)

**Summary.** Nucleotide sequences of the genes encoding variable domains of mouse monoclonal antibodies against tick-borne encephalitis virus glycoprotein E have been determined. These antibodies may potentially become prototypes for therapeutic antibodies construction. It was shown that virus neutralizing monoclonal antibodies have significant similarities in their variable domains.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus, glycoprotein E, monoclonal antibody, immunoglobulin variable domains.

На территории Российской Федерации одним из наиболее патогенных для человека вирусных агентов является вирус клещевого энцефалита (КЭ), который способен вызывать заболевание, приводящее к серьезным поражениям нервной системы. В настоящее время для этиотропной терапии КЭ применяют в основном сывороточный иммуноглобулин, получаемый из плазмы крови доноров, проживающих в природных очагах заболевания. Этот препарат обладает выраженным терапевтическим эффектом особенно при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания, причем введение препарата в 1-2 день после укуса обеспечивает значительно больший лечебный эффект, чем введение в последующие дни. Вместе с тем, препарат обладает определенными недостатками, в частности, он дефицитен и содержит относительно низкий уровень специфических вируснейтрализующих антител, что связано с ограниченным источником исходного материала.

В последние годы внимание исследователей и фармацевтических компаний привлекают рекомбинантные антитела, способные заместить сывороточные иммуноглобулины. Среди рекомбинантных антител на фармацевтическом рынке преобладают химерные антитела – полноразмерные иммуноглобулины, в которых к константным доменам иммуноглобулинов человека присоединены вариативные домены мышинных моноклональных антител (МКА). При конструировании химерных антител против вируса КЭ ключевым этапом является выбор МКА, чьи вариативные домены обладают высокой аффинностью и противовирусными свойствами.

Ранее были получены и охарактеризованы МКА против гликопротеина E – основного иммуногенного белка вируса КЭ [5]. Установлено, что некоторые из них способны ингибировать инфекционность вируса на культуре эукариотических клеток [4,5]. Эти антитела пред-

Характеристики МКА против гликопротеина Е вируса КЭ

МКА	Ka*, M <sup>-1</sup>	Ni,* IgPFU/0.1 мг	Семейство VH-, D-, JH- фрагментов	Семейство VL- и JL-фрагментов	Размер / суммарный заряд HCDR3
МКА14D5	2,0×10 <sup>9</sup>	5,3	IGHV1-7 IGHJ2	IGKV10-96 IGKJ1	9 / -1
МКА1B1	1,7×10 <sup>9</sup>	4,5	IGHV1-7 IGHJ2	IGKV10-96 IGKJ1	9 / -1
МКА13D6	4,0×10 <sup>7</sup>	5,4	IGHV1-7 IGHJ2	IGKV10-96 IGKJ1	9 / -1
МКА14D2	nd	–	IGHV1-18 IGHJ3	IGKV10-96 IGKJ5	11 / 0
МКА10C2	<107	–	IGHV1-18 IGHJ3	IGKV4-68 IGKJ1	11 / 0
E6B**	nd	–	IGHV6-6 IGHJ1	IGKV3-10 IGKJ2	13 / 0
4.2***	nd	1,95	IGHV1-81 IGHJ4	IGKV12-41 IGKJ1	13 / -2

Примечание: \* – по данным [5]; \*\* – согласно [4]; \*\*\* – согласно [3]; nd – не установлено; HCDR3 – третий гипервариабельный участок тяжелой цепи, размер определяли согласно базе данных IMGT (<http://www.imgt.org>).

ставляют особый интерес в качестве прототипов при создании терапевтических рекомбинантных антител против вируса КЭ. Для некоторых МКА последовательности вариабельных доменов были установлены ранее [2-4]. Тем не менее, остаётся неясным, в какой степени свойства, проявляемые антителами против гликопротеина Е вируса КЭ, зависят от структурных особенностей вариабельных доменов этих антител. Цель данного исследования – определить последовательности вариабельных доменов наиболее аффинных МКА против гликопротеина Е вируса КЭ, полученных ранее [5], а также проанализировать взаимосвязь между аминокислотными последовательностями и свойствами антител.

### Материалы и методы

В работе использовали: бактериальный штамм *Escherichia coli* XL1-blue, ферменты производства Fermentas и СибЭнзим.

Выделение РНК и синтез к ДНК осуществляли с использованием набора "RNeasy kit" ("QIAGEN", США) и набора "One-step RT-PCR kit" ("QIAGEN", США) согласно инструкции производителя. В реакции использовали олигонуклеотиды MH1\_dir: 5'CTTCCGGAATTCSARG TNMAGCTGSAGSAGTC, mouse\_IgHG1\_const\_rev: 5'G GCAAGCTTATAGACAGATGGGGTGTCTTTTGGC, mus\_kappa\_dir: 5'CCGAATTCGAYATTGTGMTSACMC ARWCTMCA, mus\_kappa\_const\_rev: 5'GGGAAGCTTGA TACAGTTGGTGCAGCATCAGC, разработанные в [6] и модифицированные нами.

Электрофоретическое фракционирование фрагментов ДНК проводили согласно стандартным методикам с использованием 6% полиакриламидного геля либо 1% агарозного геля [1].

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов. Реакция Сэнгера проводили с использованием набора "BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit" ("Applied Biosystems", США). Продукты реакции обессоливали на колонках с сорбентом Sephadex G50 ("GE healthcare", США). Анализ проводили в ЦКП «Секвенирование ДНК» СО РАН на секвенаторе ABI 3130xl.

### Результаты и обсуждение

Для проведения данного исследования были выбраны МКА14D5, МКА1B1, МКА13D6 и МКА14D2, обладающие достаточной аффинностью для того, чтобы быть использованными в качестве прототипа при конструировании терапевтических антител. МКА14D5, МКА13D6 и МКА1B1 способны нейтрализовать инфекционность вируса ЕЭ *in vitro* и связываются с эпитопом, расположенным между 375 и 471 аминокислотными остатками (а.к.о.) гликопротеина Е (табл. 1), в то время как МКА14D2 не проявляет вируснейтрализующей активности [5]. На первом этапе из гибридомных клеток, продуцирующих соответствующие антитела, выделяли суммарную РНК, которую использовали для получения комплементарной ДНК со специфических праймеров. Поскольку ранее было установлено, что все антитела относятся к IgG1/каппа изотипу [5], использовали праймеры, соответствующие началу каркасных областей VH и Vкаппа-последовательностей, а также обратные прай-

меры, комплементарные началу константных доменов IgG1-цепей и каппа-цепей антител мыши. Каждый из полученных ПЦР-фрагментов встраивали в плазмиду pUC19 по сайтам эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII, после чего были определены нуклеотидные последовательности встроенных участков для нескольких клонов каждой из полученных плазмид (номера депонированных последовательностей в базе данных GenBank GU270653.1, GU270654.1, GU270655.1, GU270656.1, GU247963.1, GU247960.1).

На основании нуклеотидных последовательностей, кодирующих вариабельные домены антител, были выведены последовательности аминокислотных остатков (рис. 1). Анализ последовательностей проводили с использованием результатов секвенирования генов, кодирующих вариабельные домены следующих МКА мыши, направленных к гликопротеину Е вируса КЭ: 10C2 [4], E6B [2] и 4.2 [3]. Результаты, представленные на рис. 1, хорошо согласуются со свойствами исследуемых антител. Так, способность антител МКА13D6, МКА14D5 и МКА1B1 связываться с одним и тем же эпитопом определяется высокой степенью гомологии вариабельных доменов этих антител. Сравнение нуклеотидных последовательностей доменов с последовательностями зародышевых V-генов мыши выявило, что вариабельные домены тяжёлых цепей антител МКА13D6, МКА14D5 и МКА1B1 кодируют последовательности, принадлежащие к семейству IGHV1 антител мыши, а соответствующие участки генов лёгких цепей относятся к семейству IGKV10, согласно классификации IMGT (<http://www.imgt.org>).

Хотя все три антитела являются вируснейтрализующими и взаимодействуют с одним и тем же эпитопом гликопротеина Е, сродство к антигену антител МКА14D5 и МКА1B1 составляет около 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>, тогда как для антитела МКА13D6 это значение приблизительно равно 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>. Согласно распространённому мнению, наибольший вклад во взаимодействие с антигеном вносит третий гипервариабельный участок тяжелой цепи (HCDR3), однако в случае МКА13D6 маловероятно, что замена Val<sub>100</sub>→Ala (нумерация согласно рис. 1) приводит к снижению сродства на два порядка. Можно предположить, что в данном случае существенный вклад во взаимодействие антител с антигеном вносят и другие гипервариабельные участки. К различиям, которые могут оказывать значительное влияние на сродство антитела, относятся замена полярного незаряженного остатка аспарагина или серина на отрицательно заряженный остаток аспартата Asn/Ser<sub>31</sub>→Asp в участке HCDR1, замена незаряженного остатка глицина на отрицательно заряженный остаток аспартата Gly<sub>58</sub>→Asp в участке HCDR2, замена отрицательно заряженного остатка глутаминовой кислоты на ароматический остаток тирозина

А)

	HCDR1		HCDR2		
VH13D6	EVKLEES	GAELAKPGASVKMSCKASGYTFI	DYWIH	VVKQRPGQGLEWIG	YINP--TTDYT [ 60]
VH14D5	..Q.QQ.	.....I.	TN.M.	.....	--S.G.. [ 60]
VH1B1	...QQ.	.....	S.M.	.....M.	--S.G.. [ 60]
VH10C2	..Q.QQ.	P.VE.....L.S.	TENT	...SH.KS.Y.	G...--DNNGG. [ 60]
VH14D2	.....P.V.	.....L.S.	TENT	...SH.KS.Y.	G...--DNNGG. [ 60]
VH4.2	Q.Q.QQ.	P.V.....	T.V.G.	...T.	E.Y.--GSGT. [ 60]
VHE6B	Q.E.L.	GG.VQ..E.M.L.V..F.S.	A.MD	..L.S.EK...VA	E.RSKSNHA. [ 60]

	HCDR2		HCDR3		
VH13D6	YINQTF	KDK-ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY	CAREG----	FALDYW	GQGTTLT [120]
VH14D5	E...R.I.	.....D.N	V.....	.....	..... [120]
VH1B1	E...R.I.	.....N.N.N	V.....	.....F.	..... [120]
VH10C2	S...K.G.	...V.....E.R.	WE--ITAT.A.	.....LV.	..... [120]
VH14D2	S...K.G.	GP...V.....E.R.	WE--ITAT.A.	.....LV.	..... [120]
VH4.2	...EK.	.....N	F.....	GEDGYI	.....V. [120]
VHE6B	S.AESV	EGR-F.ISR.D.K.SV.L.MNN.RA..TGI.	T.YGYLYWYF.VL	.....V.	[120]

VH13D6	VSS	[123]
VH14D5	...	[123]
VH1B1	...	[123]
VH10C2	...	[123]
VH14D2	...	[123]
VH4.2	...	[123]
VHE6B	...	[123]

Б)

	LCDR1		LCDR2			
VL13D6	DIVMTQSP	SSLSASLGRVITIS	RASQDIS----	NYLN	WYQQKPDGTVKLLIF	YTSKLSHS [ 60]
VL14D5	.....	.....	R-----	.....S.....Y.	...R.Q.	[ 60]
VL1B1	.....	.....	K-----	.....SI.....Y.	...T.Q.	[ 60]
VL10C2	..EL....	ALM...P.EK.MT.	S.SSV-----	S.MF	...RSSP.SW.YL..	N.A. [ 60]
VL14D2	.....	.....	.....	.....	.....	[ 60]
VL4.2	..EL....	A...V.ET..T.	GN.H-----	A	...QGKSPQ..VY	KAQT.AD [ 60]
VLE6B	..EL....	P.AV...Q.A....	KSLDSYGNSE.H	.....GQPP...YLA	N.E.	[ 60]

	LCDR3		
VL13D6	GVPSRFSGSGSDTYSLTITWNLQEDLATYFC	QH-GNTLPRTE	FGGGTKLEVKR [113]
VL14D5	.....S.....I.....	E-G.....	I.. [113]
VL1B1	.....T.....R.....I.....	E-SA.....	I.. [113]
VL10C2	..A.....S.....SSM.A.A..Y.	Q--WSS.L..	A...I.. [113]
VL14D2	.....	.....	..... [113]
VL4.2	.....Q...K.NS.QP..FGS.Y.	FWS.P.W.	.....I.. [113]
VLE6B	..L.A.....R..FT...DPV.AD.A..Y.	Q--NDDP..	S.....I.. [113]

Рис. 1. Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелых (А) и легких (Б) цепей МКА против гликопротеина Е вируса КЭ. Жирным шрифтом и рамками выделены гипервариабельные участки. Серым фоном отмечены участки, кодируемые последовательностями олигонуклеотидных праймеров. В квадратных скобках указаны номера аминокислотных остатков.

Glu<sub>61</sub> → Tyr, положительно заряженного остатка аргинина на незаряженный остаток треонина Arg<sub>65</sub> → Thr в том же участке. Вариабельные домены легких цепей МКА13D6 также содержат несколько ключевых отличий: замена положительно заряженного остатка аргинина или лизина на остаток серина Arg/Lys<sub>30</sub> → Ser в участке LCDR1, замена незаряженного остатка глутамина на положительно заряженный остаток гистидина Gln<sub>59</sub> → His в участке LCDR2 и замена отрицательно заряженного остатка глутаминовой кислоты на положительно заряженный остаток гистидина Glu<sub>94</sub> → His в третьем гипервариабельном участке.

Аминокислотная последовательность МКА14D2 обладает сходством с последовательностью МКА10C2. Оба эти МКА связываются с эпитопом, расположенным между аминокислотными остатками 78 и 176 поверхностного гликопротеина Е [5]. Это обстоятельство хо-

рошо согласуется со значительными отличиями последовательности переменных доменов этих антител от доменов антител предыдущей группы. Сравнение нуклеотидных последовательностей доменов МКА14D2 с последовательностями зародышевых V-генов мыши выявило, что вариабельный домен тяжелой цепи принадлежит к семейству IGHV1 антител мыши, а соответствующие участки генов легких цепей относятся к семейству IGKV4.

Сравнение аминокислотных последовательностей вариабельных доменов, определенных в работе [4] и в данном исследовании, с последовательностями антител Е6В и 4.2, которые были получены в работах [2,3], не выявило значительной гомологии. По-видимому, эти антитела связываются с другими эпитопами на поверхности гликопротеина Е. Вместе с тем, следует отметить, что для всех МКА, способных нейтрализовать инфекционность ви-

руса КЭ *in vitro*, включая МКА 4.2, характерно наличие отрицательного заряда у HCDR3 (табл. 1).

Таким образом, были клонированы гены, кодирующие вариабельные домены антител МКА14D2, МКА14D5, МКА13D6 и МКА1B1, и определены их нуклеотидные последовательности. Результаты сравнительного анализа указывают на то, что сходства и различия иммунобиологических свойств, проявляемых данными антителами, непосредственно связаны со степенью гомологии их вариабельных доменов.

Исследования частично финансировались из средств междисциплинарного интеграционного проекта № 141 фундаментальных исследований СО РАН, а также проекта № 01-11, поддержанного некоммерческой организацией Союз инновационно-технологических центров России.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

2. Тикунова Н.В., Николенко Г.Н., Протопопова Е.В. и др. Получение одноцепочечных антител против поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусологии. – 1999. – №1. – С.12-15.

3. Jiang W., Bonnert T.P., Venugopal K., et al. A single chain antibody fragment expressed in bacteria neutralizes tick-borne flaviviruses // *Virology*. – 1994. – Vol. 200. №1. – P.21-28.

4. Levanov L.N., Matveev L.E., Goncharova E.P., et al. Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P.5265-5271.

5. Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., et al. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses

using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype) // *Virus Res.* – 1993. – Vol. 30. №1. – P.1-16.

6. Wang Z., Raifu M., Howard M., et al. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity // *J. Immunol. Methods.* – 2000. – Vol. 233. №1-2. – P.167-177.

**Информация об авторах:** 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8, тел. (383) 3635157, e-mail: ivan\_baykov@mail.ru, tikunova@niboch.nsc.ru, Байков Иван Константинович – инженер; Матвеев Леонид Эдуардович – ведущий инженер; Матвеев Андрей Леонидович – инженер, аспирант; Тикунова Нина Викторовна – зав. лаб., д.б.н., доцент.

© БОНДАРЕНКО Е.И., ТИМОФЕЕВ Д.И., ФОМЕНКО Н.В., ЯКИМЕНКО В.В., ТАНЦЕВ А.К., РАР В.А. – 2012  
УДК: 579.61:616-078

### КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕНОСИМЫХ КЛЕЩАМИ, С ПОМОЩЬЮ ПЦР-АНАЛИЗА С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Евгений Иванович Бондаренко<sup>1</sup>, Денис Игоревич Тимофеев<sup>1</sup>, Наталия Владимировна Фоменко<sup>1</sup>, Валерий Викторович Якименко<sup>2</sup>, Алексей Константинович Танцев<sup>2</sup>, Вера Александровна Рар<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов, лаборатория ПЦР, зав. – к.б.н. М.К. Иванов; <sup>2</sup>Омский НИИ природно-очаговых инфекций, директор – д.м.н., проф. Н.В. Рудаков, лаборатория арбовирусных инфекций, зав. – д.б.н. В.В. Якименко; <sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов, лаборатория молекулярной микробиологии, зав. – д.б.н. Н.В. Тикунова)

**Резюме.** Проведен комплексный анализ клещей и образцов крови грызунов с целью выявления патогенов, передающихся клещами: возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека, а также вируса клещевого энцефалита и *Borrelia miyamotoi*. Всего с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов серии «Реал-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) исследовано 706 клещей *Ixodes* spp. из Новосибирской области и 111 образцов крови мышевидных грызунов из Омской области. Как в клещах, так и в образцах крови была обнаружена ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, а также РНК вируса клещевого энцефалита. Было показано, что ДНК/РНК хотя бы одного из исследуемых патогенов выявляется в образцах от более 60% клещей и грызунов, при этом наблюдалось одновременное инфицирование клещей и животных двумя, тремя и даже четырьмя возбудителями.

**Ключевые слова:** инфекции, переносимые клещами; возбудители клещевого энцефалита, иксодовый клещевой боррелиоз, гранулоцитарный анаплазмоз человека, моноцитарный эрлихиоз человека.

### A COMPREHENSIVE APPROACH TO REVEALING THE INFECTION CAUSATIVE AGENTS TRANSMITTED BY TICKS USING REAL-TIME PCR

E.I. Bondarenko<sup>1</sup>, D.I. Timofeev<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>1</sup>, V.V. Yakimenko<sup>2</sup>, A.K. Tancev<sup>2</sup>, V.A. Rar<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Joint-stock company «Vector-Best», Novosibirsk; <sup>2</sup>Omsk Research Institute of Natural Foci Infections, Omsk;  
<sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk)

**Summary.** *Ixodes* ticks and the blood samples of small mammals were analyzed for the presence of tick-transmitted agents of following diseases – Lyme borreliosis, human granulocytic anaplasmosis and human monocytic ehrlichiosis as well as tick-borne encephalitis virus and *Borrelia miyamotoi*. Totally, 706 *Ixodes* spp. ticks from Novosibirsk region and 111 blood samples of small mammals from Omsk region were analyzed by real-time PCR using «Real-Best» kits (Joint-stock company «Vector-Best», Novosibirsk). Both ticks and blood samples were shown to contain *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia muris* DNA as well as tick-borne encephalitis virus RNA. It was shown that more than 60% of ticks and blood samples analyzed contain DNA/RNA of at least one of the tested agents. A simultaneous infection of ticks and mammals by 2, 3 and even 4 agents was demonstrated.

**Key words:** tick-transmitted infections, agents of tick-borne encephalitis, Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, human monocytotropic ehrlichiosis.

Территория Российской Федерации входит в состав одного из наибольших в мире ареалов иксодовых клещей, простирающегося через всю Евразию. В России регистрируется порядка полумиллиона в год пострадавших от укусов клещей, однако реальное число пострадавших людей может значительно превышать имеющиеся статистические данные.

Иксодовые клещи являются переносчиками возбудителей целого ряда заболеваний человека, объединяемых термином «инфекции, переносимые клещами» (ИПК). В России систематически осуществляется лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор лишь за клещевым энцефалитом (КЭ), иксодовым

клещевым боррелиозом (ИКБ) и риккетсиозом. В то же время лабораторный контроль других ИПК, таких как, гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), лихорадка, вызванная *Borrelia miyamotoi*, и систематический эпидемиологический надзор над ними до сих пор не получили должного распространения. При этом в РФ этиология сезонных острых лихорадочных проявлений, возникающих после присасывания клещей, довольно часто (до 40% и более) остается невыясненной [1,10].

Заболевания ГАЧ и МЭЧ, объединенные в недавнем прошлом под термином «эрлихиозы человека», – острые инфекционные трансмиссивные заболевания, перено-

симые иксодовыми клещами. Возбудителями эрлихиозов являются размножающиеся в лейкоцитах внутриклеточные грам-отрицательные бактерии из семейства *Anaplasmataceae*: *Anaplasma phagocytophilum* (в случае ГАЧ), *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* (в случае МЭЧ) [5]. Клинически ГАЧ и МЭЧ почти неразличимы и имеют широкий спектр проявлений: от бессимптомной или субклинической формы до летального исхода, составляющего от 0,5% до 3,5% [12]. При своевременном диагностировании ГАЧ и МЭЧ успешно поддаются лечению с помощью доксицилина и других антибиотиков тетрациклинового ряда [5,12].

В настоящее время патогенность *Borrelia miyamotoi* для людей не общепризнана, тем не менее, работы последних лет свидетельствуют, что ДНК данных бактерий обнаруживается у больных с острыми лихорадками с присасыванием клещей в анамнезе [7,13].

Отсутствие особых патогномоничных симптомов при инфекциях, передающихся иксодовыми клещами, за исключением мигрирующей эритемы у части больных при заболевании ИКБ, определяет необходимость использования методов специфической лабораторной диагностики ИПК. Клинические признаки большинства заболеваний, переносимых клещами, могут проявиться лишь спустя длительное время. Поэтому при укусе клеща актуально проведение превентивной терапии, основанием для назначения которой является обнаружение в клеще возбудителей ИПК. Показано, что назначение соответствующих антибиотиков в первые 5 дней с момента укуса предотвращает развитие заболевания ИКБ в 95-99% случаев [3]. Наличие в анамнезе укуса клеща, зараженного одним или несколькими возбудителями ИПК, может способствовать постановке правильного диагноза заболевания и его адекватного лечения.

В связи с этим возникает острая необходимость разработки комплексного подхода для лабораторного анализа клещей, снятых с пострадавших, с целью одновременного выявления в них всех актуальных для конкретного региона возбудителей ИПК. Для решения этой задачи наиболее перспективным является выявление нуклеиновых кислот возбудителей ИПК при помощи ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ позволяет по единой методике выявлять сразу несколько маркеров в одной пробе и при этом характеризуется относительно высокой скоростью исполнения, позволяющей получить результат анализа в течение нескольких часов с момента забора пробы.

В настоящее время в ЗАО «Вектор-Бест» производятся наборы реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.», «РеалБест РНК ВКЭ» и «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*» для выявления нуклеиновых кислот (НК) возбудителей КЭ, ИКБ, ГАЧ и МЭЧ как в клинических образцах, так и в клещах при помощи ПЦР-РВ. Кроме того, идет разработка ПЦР-набора для выявления ДНК бактерий *B. miyamotoi*, также переносимых иксодовыми клещами. Цель данной работы – оценить уровень зараженности клещей и мелких лесных грызунов вышеперечисленными возбудителями ИПК в нескольких районах Омской и Новосибирской областей с использованием комплекса наборов реагентов серии «РеалБест».

### Материалы и методы

Для исследования были использованы 2 выборки клещей рода *Ixodes*, содержащие 306 и 400 особей, собранные «на флаг» в Тоугинском районе Новосибирской области в 2009 и 2011 гг. Выделение суммарной НК из суспензий клещей после их индивидуального измельчения проводили с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), как описано ранее [2]. Кроме того, исследованы образцы кро-

ви мышевидных грызунов, отловленных на двух участках в Омской области, представляющих собой лесные биотопы в Тевризском и Большешуковском районах. На первом участке в мае-июне 2011 были отловлены 57 лесных полевок рода *Myodes*, 2 полевки рода *Microtus* и одна полевая мышь *Apodemus agrarius*. На втором участке в августе 2011 были отловлены 50 полевок *Myodes* spp. и одна полевая мышь.

От каждого животного взято по 200 мкл крови. Кровь собирали в стерильные пробирки, содержащие по 30 мкл 0,5 М раствора ЭДТА, добавляли по 400 мкл буфера для лизиса (4 М гуанидин тиоционат, 0,1 М Трис-НСI pH 6,4, 0,045 М ЭДТА pH 8,0, 1,3% Тритон X-100), перемешивали и хранили при температуре +4°C. Для выделения ДНК, проводимого с помощью набора «РеалБест экстракция 100», брали по 100 мкл полученной суспензии. Для постановки ПЦР использовали по 50 мкл образца суммарной НК (при выделении из суспензии клещей) и по 10 мкл НК (при выделении из крови животных). Выявление НК микроорганизмов в клещах и крови животных проводили на амплификаторе с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «CFX» («Bio-Rad», США) с помощью наборов реагентов «РеалБест РНК ВКЭ», «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.», «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*», а также системы праймеров и зондов по выявлению участка гена *gfpQ* микроорганизма *Borrelia miyamotoi*. Для обработки результатов использовали сервисную программу «РеалБест диагностика» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). ДНК *A. phagocytophilum* и *E. muris* была также определена в образцах крови методом двухраундовой ПЦР, как описано ранее [14].

Видовую принадлежность выявленных бактерий подтверждали при помощи секвенирования полиморфных участков генома на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3100 DNA Analyser» («Applied Biosystems», США) с последующим филогенетическим анализом последовательностей ДНК с помощью программы MEGA 4.0 [15]. Сравнение установленных нуклеотидных последовательностей с данными, представленными в базе данных GenBank, проводили с помощью поисковой системы «BLAST».

### Результаты и обсуждение

Методом ПЦР-РВ с помощью наборов серии «РеалБест» на наличие НК возбудителей ИКБ, ВКЭ, ГАЧ и МЭЧ было проанализировано 306 клещей из первой выборки, собранных на территории Новосибирской области. У 190 из них (62,1% клещей) была обнаружена НК хотя бы одного из вышеперечисленных патогенов. При этом у 13,4% клещей (41 особь) была одновременно обнаружена ДНК двух или трех возбудителей ИПК (табл. 1). Наибольший вклад в инфицированность клещей вносят возбудители ИКБ. Так, ДНК *B. burgdorferi* s.l. выявлена у 55,9% клещей (171 из 306), из них, как показано на основании определения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *recA*, у 68,4% клещей была обнаружена ДНК *B. garinii*, а у 31,6% – *B. afzelii*. РНК ВКЭ обнаружена у 6,5% клещей (20 особей), ДНК *A. phagocytophilum* – у 3,6% клещей (11 особей) и ДНК *E. muris* – у 10,1% клещей (31 особь).

Полученные данные свидетельствуют о высокой зараженности исследованных клещей возбудителями ИПК, что указывает на значительный риск инфици-

Таблица 1

Выявление в клещах НК различных возбудителей ИПК методом ПЦР-РВ

Общее число клещей	Число (%) клещей, содержащих НК								
	одного возбудителя ИПК				нескольких возбудителей ИПК				
	ВКЭ	Б	А	Е	ВКЭ/Б	Б/А	Б/Е	ВКЭ/Б/Е	Б/А/Е
306	11 (3,6)	131 (42,8)	2 (0,7)	5 (1,6)	8 (2,6)	7 (2,3)	23 (7,5)	1 (0,3)	2 (0,7)

Примечание: ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; Б – *B. burgdorferi* s.l., А – *A. phagocytophilum*, Е – *E. muris*.

рования людей вследствие присасывания клещей и на вероятность развития у людей смешанных инфекций. Значения уровня инфицированности клещей различными возбудителями, полученные нами на территории Новосибирской области, не противоречат данным по РФ, опубликованным ранее [1,4,6,9,11,14].

Анализ выборки 2 из 400 клещей с помощью ПЦР-РВ на наличие ДНК *B. burgdorferi s.l.* и *B. miyamotoi* показал, что встречаемость *B. miyamotoi* составляет 2,2%. Во всех клещах, инфицированных *B. miyamotoi*, выявлена также ДНК *B. burgdorferi s.l.* Такое микст-инфицирование скорее всего обусловлено высокой встречаемостью в клещах одного микроорганизма (более 55%) и низкой встречаемостью другого (порядка 2,2%).

Для оценки возможности выявления возбудителей ИПК с помощью разработанных наборов серии "Реал-Бест" в образцах крови были исследованы образцы ДНК из крови 111 мышевидных грызунов, отловленных на двух участках Омской области. Образцы анализировали на присутствие ДНК возбудителей ИКБ, ГАЧ, МЭЧ, а также на наличие ДНК *B. miyamotoi*.

В образцах крови грызунов, отловленных на обоих участках, была обнаружена ДНК всех вышеперечисленных патогенов, однако частота выявляемости этих патогенов существенно различалась в зависимости от места

Таблица 2  
Выявление ДНК возбудителей ИПК в крови мелких грызунов

Место отлова животных	Общее число особей	Число (%) особей, содержащих ДНК			
		ВВ	ВМ	А	Е
Участок 1	60	17 (28,3)	5 (8,3)	20 (33,3)	18 (30,0)
Участок 2	51	4 (7,8)	1 (2,0)	24 (47,1)	1 (2,0)

Примечания: ВВ – *B. burgdorferi s.l.*, ВМ – *B. miyamotoi*, А – *A. phagocytophilum*, Е – *E. muris*.

отлова животных. Так, в 28-33% образцов от животных, отловленных на первом участке, была обнаружена ДНК возбудителей ИКБ, ГАЧ и МЭЧ и в 8,3% образцов – ДНК *B. miyamotoi* (табл. 2). При этом доля животных, инфицированных одновременно несколькими возбудителями, была также высока и составляла 28,3% (табл. 3). Следует подчеркнуть, что в одном образце была обнаружена ДНК всех четырех исследуемых патогенов. У 47,1% грызунов, отловленных на втором участке, была обнаружена ДНК возбудителя ГАЧ, частота выявляемости остальных патогенов была существенно ниже и составляла 7,8% в случае ДНК *B. burgdorferi s.l.* и 2% в случае ДНК *B. miyamotoi* и возбудителей МЭЧ (табл. 2). Доля микст-инфицированных животных на втором участке также была существенно ниже и составляла 7,8% (табл. 3).

Достоверность полученных результатов по выявлению возбудителей ГАЧ и МЭЧ была подтверждена проведением двухраундовой ПЦР в присутствии видоспецифичных праймеров. Сравнение двух методов показало 100% совпадение результатов в случае детекции *E. muris* и 95,4% совпадение в случае выявления ДНК *A. phagocytophilum*.

## ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьева М.В., Коренберг Э.И., Воробьева Н.Н. и др. Место заболеваний, передающихся иксодовыми клещами, в инфекционной патологии Пермской области // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2004. – №2. – С.27-29.
- Бондаренко Е.И., Тимофеев Д.И., Иванов М.К. Новый набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.*» // Новости «Вектор-Бест». – 2010. – №1 (55). – С.2-7.
- Лобзин Ю.В., Рахманова А.Г., Антонов В.С. и др.

Анализ нуклеотидных последовательностей 50 случайно выбранных положительных образцов, полученных из клещей и грызунов и содержащих ДНК *A. phagocytophilum*, *E. muris* и *B. miyamotoi*, подтвердил принадлежность детектированных микроорганизмов

Таблица 3

Выявление случаев микст-инфицированности животных

Место отлова животных	Общее число особей	Число (%) особей, содержащих одновременно ДНК							
		ВВ/ ВМ	ВВ/ А	ВВ/ Е	А/ Е	ВВ/ А/ Е	ВВ/ Е/ ВМ	ВВ/ А/ Е/ ВМ	
Участок 1	60	1 (1,7)	4 (6,7)	3 (5,0)	3 (5,0)	3 (5,0)	2 (3,3)	1 (1,7)	
Участок 2	51	1 (2,0)	2 (3,9)	-	-	1 (2,0)	-	-	

Примечания: ВВ – *B. burgdorferi s.l.*, ВМ – *B. miyamotoi*, А – *A. phagocytophilum*, Е – *E. muris*.

к данным видам. Образцы, содержащие ДНК эрлихий, показали на основании определения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gltA* наличие в этих образцах ДНК *E. muris* (отметим, что на сегодняшний день на территории РФ из двух известных возбудителей МЭЧ удалось выявить только *E. muris*).

Работ по выявлению возбудителей ИПК в крови млекопитающих на территории России значительно меньше, чем по их выявлению в клещах, что затрудняет сопоставление полученных результатов с литературными данными. Ранее показано, что частота выявляемости ДНК *A. phagocytophilum* и *E. muris* в крови мелких млекопитающих существенно различается в различных регионах и варьирует от 3,8% до 16,6% в случае детекции *A. phagocytophilum* и от 3,8% до 7% в случае детекции *E. muris* [14]. Частота выявления ДНК *B. miyamotoi* в мелких млекопитающих, отловленных на территории Новосибирской области, составляла 8% [8], что соответствует результатам, полученным в настоящей работе. Что касается *B. burgdorferi s.l.*, то ранее показано, что ДНК данных спирохет была выявлена в образцах крови у 4-13% мелких млекопитающих [8], что существенно ниже доли инфицированных животных, выявленной в данной работе на участке 1. Следует подчеркнуть, что на участке 1 животные были отловлены в мае в период пика активности таежных клещей, а на втором участке – двумя месяцами позже, и доля образцов, содержащих ДНК *B. burgdorferi s.l.*, оказалась во второй выборке в 3,6 раза меньше. Кроме того, при выявлении методом ПЦР-РВ ДНК *B. burgdorferi s.l.* у большинства положительных образцов величины *St* составляли 38-40, что соответствует единичным копиям ДНК бактерий в пробе и находится на пределе чувствительности метода ПЦР. Результаты по инфицированности грызунов боррелиями комплекса *B. burgdorferi s.l.* на участке 1 дополнительно подтверждены методом ПЦР-РВ с использованием в качестве мишеней участков генов *23S rRNA* и *recA*.

Таким образом, было показано, что наборы реагентов серии «РеалБест» для выявления НК возбудителей ИПК, могут быть использованы в лабораториях ЛПУ в качестве современного экспресс-метода для выявления в клещах опасных для человека патогенов. Результаты диагностики позволят своевременно предпринять превентивные меры для предупреждения развития целого спектра заболеваний у пострадавших. Кроме того, ПЦР-наборы, использованные в данной работе, могут быть применены для широкомасштабных эпидемиологических исследований по выявлению указанных возбудителей инфекций, передаваемых иксодовыми клещами.

Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов: Рекомендации для врачей. – СПб., 2000. [Электронный ресурс]. <http://www.epid.ru/docs/infdoc5.html>.

4. Матущенко А.А., Рудакова С.А., Коренберг Е.И. Предварительные данные эколого-эпидемиологического исследования болезни Лайма в Западной Сибири // Мед. паразит. – 1993 – №4. – С.27-29.

5. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Оберт А.С. Анаплазмозы и

эрлихиозы человека – новая проблема инфекционной патологии в России: Пособие для врачей. – Омск, 2006. – С.45.

6. Травина Н.С., Скрынник С.М., Карань Л.С. Возбудители трансмиссивных инфекций, передаваемых клещами I. *persulcatus* в Зауралье // Национальные приоритеты России. Современные аспекты природной очаговости болезней. – 2011 – № 2 (5). – С.76-77.

7. Фоменко Н.В., Епихина Т.И., Черноусова Н.Я. Выявление *Borrelia miyamotoi* в крови людей, заболевших в весенне-летний эпидемиологический период // Молекулярная медицина. – 2010. – №3. – С.28-31.

8. Фоменко Н.В. Генетическая гетерогенность *Borrelia spp.* Западной Сибири: Дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2008. – 147 с.

9. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В. и др. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых клещами в г. Томске и его пригородах // Паразитология. – 2009. – №5 (43). – С.374-388.

10. Шихин А.В., Баженова И.В., Романенко В.Н. и др.

Современная эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям в Томской области // Национальные приоритеты России. Современные аспекты природной очаговости болезней. – 2011. – №2 (5). – С.69-70.

11. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане // Мед. паразитол. – 2004. – №2. – С.10-14.

12. CDC (Center for Disease Control and Prevention) <http://www.cdc.gov/ticks/diseases/index.html>.

13. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17. №10. – P.1816-1823.

14. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., et al. Genetic diversity of Anaplasma and Ehrlichia in Asian part of Russia // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2011. – Vol. 11. №8. – P.1013-1021.

15. Tamura K., Dudley J., Nei M., et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24. №8. – P.1596-1599.

**Информация об авторах:** Бондаренко Евгений Иванович – к.м.н., научный сотрудник, 630117, г. Новосибирск-117, а/я 492, e-mail: ebondarenko@ngs.ru; Тимофеев Денис Игоревич – к.б.н., старший научный сотрудник, тел. (383) 227-68-24, e-mail: timofeev@vector-best.ru; Фоменко Наталия Владимировна – к.б.н., научный сотрудник, e-mail: nataliyaf@ngs.ru; Якименко Валерий Викторович – д.б.н., заведующий лабораторией, 644080, г. Омск, проспект Мира, 7, тел. (3812) 65-03-04, e-mail: vyakimenko78@yandex.ru; Танцев Алексей Константинович – к.б.н., научный сотрудник, тел. (3812) 65-14-77; Рар Вера Александровна – к.б.н., научный сотрудник, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, тел. (383) 363-51-37, e-mail: rarv@niboch.nsc.ru.

© БАБКИН И.В., ТИКУНОВА Н.В., ВАСЬКОВА А.А., БАБКИНА И.Н., ФОМЕНКО Н.В. – 2012  
УДК 573.6; 57.089:616-7

### СОЗДАНИЕ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК P83/100 *BORRELIA GARINII* И *BORRELIA AFZELII*

Игорь Викторович Бабкин<sup>1</sup>, Нина Викторовна Тикунова<sup>1</sup>, Анна Андреевна Васькова<sup>1</sup>, Ирина Николаевна Бабкина<sup>1</sup>, Наталья Владимировна Фоменко<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов; <sup>2</sup>ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов)

**Резюме.** Сконструированы штаммы *Escherichia coli* / pUR-p83/100-43T и *Escherichia coli* / pUR-p83/100-52T, продуцирующие рекомбинантные белки бета-галактозидаза-P83/100 *Borrelia garinii*, Tom 9105 и *B. afzelii*, Tom 4106, соответственно. Уровень продукции гибридных белков составил около 20% от суммарного клеточного белка, и большая их часть находится в растворимой форме. Методом вестерн блот анализа было подтверждено, что полученные рекомбинантные белки, в отличие от бета-галактозидазы, выявлялись сыворотками больных иксодовыми клещевыми боррелиозами и не выявлялись сыворотками здоровых доноров.

**Ключевые слова:** иксодовый клещевой боррелиоз, рекомбинантный белок, штамм-продуцент.

### GENERATION OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN P83/100 *BORRELIA GARINII* AND *BORRELIA AFZELII*

I.V. Babkin<sup>1</sup>, N.V. Tikunova<sup>1</sup>, A.A. Vas'kova<sup>1</sup>, I.N. Babkina<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk; <sup>2</sup>LTD "Vector-Best", Novosibirsk, Russia)

**Summary.** *Escherichia coli* / pUR-p83/100-43T and *Escherichia coli* / pUR-p83/100-52T strains, producing recombinant proteins beta-galactosidase-P83/100 *Borrelia garinii*, Tom 9105 and *Borrelia afzelii*, Tom 4106, respectively, have been generated. Production level of the recombinant proteins was about 20% from the total level and the most part of them was in a soluble form. It was confirmed by western blot analysis that these recombinant proteins, unlike beta-galactosidase, were developed by serum of ixodes tick-born borreliosis patients and were not developed by serum of healthy donors.

**Key words:** ixodes tick-born borreliosis, recombinant protein, producing strain.

Значительное место по уровню заболеваемости и широте распространения в Российской Федерации занимают иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ). Эпидемиологическая обстановка по заболеваемости ИКБ продолжает оставаться неблагоприятной. Проблемой является достоверная диагностика ИКБ, что связано с высоким генетическим разнообразием выявляемых на территории РФ боррелий и антигенной изменчивостью этого патогена в ходе заболевания. Для разработки надежных диагностических средств ключевым этапом является выбор и создание антигенов на основе иммунодоминантных белков боррелий, вызыва-

ющих образование антител у больных, на всех стадиях заболевания ИКБ.

Одним из иммунодоминантных белков боррелий является белок P83/100. Показано, что антитела к этому белку обнаруживаются у пациентов как на ранних стадиях ИКБ, так и на поздних стадиях заболевания [8]. Ген *p83/100* (BV0744) локализован на хромосоме, степень гомологии гена *p83/100* для разных видов боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) составляет 88,2-99,1%, причем 5'-конец гена является довольно консервативным, тогда как 3'-конец более вариабелен [9]. У разных видов комплекса *B. burgdorferi s.l.* обнару-

живаются варианты белка P83/100, различающиеся по молекулярной массе – p83, p93, p94, p97, p100, хотя молекулярные массы аминокислотных последовательностей мало различаются и составляют в среднем 79,8 кДа [9,10]. Основные антигенные детерминанты P83/100 локализованы в центральном гидрофильном районе (250-550 а.о.), который является высоко варибельным [5]. Обнаружены иммунологические отличия между разными гомологами P83/100, следствием чего является варибельность антител, специфичных к этому белку [5]. В связи с этим при создании антигенов для средств диагностики необходимо использовать белки P83/100 разных видов комплекса *B. burgdorferi s.l.*

Исследования генетического разнообразия боррелий показало, что в большинстве регионов Российской Федерации этиологию, эпидемиологию и клинические проявления ИКБ определяют *B. afzelii* и *B. garinii* [3,4,7].

Целью данной работы являлось создание штаммов *Escherichia coli*, продуцирующих рекомбинантные белки P83/100 видов *B. garinii* и *B. afzelii*.

### Материалы и методы

В работе использовали штаммы *E. coli* XL2-blu (endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15 Amy CmR] hsdR17(rK- mK+)) и VMH7118 (Δ(lac/pro) F' lacIq lacZ ΔM15 pro+ supE).

Олигонуклеотидные праймеры синтезированы на автоматическом синтезаторе ABI-394 (Applied Biosystems, США) в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

ПЦР проводили с использованием набора XL PCR Kit (Applied Biosystems, США) в 50 мкл смеси, содержащей XL PCR буфер, dNTP (200 мкМ каждого), 1,2 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, 4 е.а. полимеразы «rTth DNA Polymerase XL», 30 пкм каждого праймера и 0,4 мкг матрицы. Реакции вели с использованием технологии горячего старта в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США).

Анализ фрагментов ДНК проводили электрофорезом в 0,8% агарозном геле в буфере TAE с бромистым этидием в концентрации 0,2 мкг/мл. Выделение ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора QIAquick Gel Extraction (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Реакцию секвенирования проводили с использованием BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, США) с последующей очисткой продуктов реакции секвенирования с помощью набора DyeEx Spin Kit (Qiagen, США). Разгонку очищенных продуктов реакции секвенирования осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Каждый нуклеотид прочитывался по двум цепям. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью компьютерной программы Sequencher.

Получение рекомбинантных ДНК и трансформацию клеток *E. coli* проводили с использованием стандартных процедур [2]. Плазмидную ДНК выделяли из индивидуальных клонов *E. coli* методом щелочного лизиса [6] с нашими модификациями. Для экспрессии целевых генов соответствующие клоны *E. coli* культивировали в 5 мл среды LB с ампициллином при 37°C в течение ночи. Далее аликвоты ночных культур пересевали в свежую среду LB с ампициллином и инкубировали при 32°C 2 часа при интенсивном перемешивании. Для индукции lac-промотора добавляли изопропил бета-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 mM и продолжали культивирование при 32°C в течение 5-7 часов при интенсивном перемешивании. Экспрессию гибридного белка оценивали электрофоретически в полиакриламидном геле с SDS.

Для исследования распределения гибридных белков между растворимой и нерастворимой фракциями (тельцами включения) по 1 мл индуцированных куль-

тур центрифугировали и клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера TE. Затем клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора, центрифугировали и отбирали супернатант, содержащий растворимую фракцию белков. Осадок, содержащий нерастворимую фракцию белков, ресуспендировали в 50 мкл 8 М мочевины в TE буфере. Фракции анализировали в полиакриламидном геле с SDS, нанося одинаковые по объему аликвоты. Уровень продукции белков определяли с помощью программы Image Lab (BioRad, США).

Для вестерн блот анализа белки клеточных лизатов, разделенные электрофоретически в полиакриламидном геле с SDS, переносили на нитроцеллюлозную мембрану по методу [11]. Затем места неспецифического связывания мембраны насыщали 3% раствором бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере (ФСБР), pH 7,2 при 37°C в течение 2 часов. Все последующие этапы проводили в растворе 0,1% Tween-20-ФСБР, проводя после каждого этапа трехкратную промывку мембраны этим же раствором. Стрипы инкубировали с пулами донорских сывороток, объединенными по 6 штук, в разведении 1:20 в течение 60 минут при 37°C. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы (Sigma, США) в разведении 1:6000. В качестве хромогена использовали смесь 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфата и нитро-тетразолиевого голубого.

### Результаты и обсуждение

На территории Российской Федерации основными патогенными видами комплекса *B. burgdorferi s.l.* являются *B. garinii* и *B. afzelii* [3,4,7]. На первом этапе работы осуществили конструирование плазмид, обеспечивающих в клетках *E. coli* экспрессию генов *p83/100* двух изолятов боррелий, принадлежащих к видам *B. garinii* и *B. afzelii*. На основании анализа последовательности межгенного спейсера 5S-23S рРНК определена групповая принадлежность этих изолятов – Tom 9105 *B. garinii* подгруппы 20047 и Tom 4106 *B. afzelii* подгруппы NT28. Полноразмерные последовательности генов *p83/100* получали в ПЦР с использованием следующих праймеров, рассчитанных на основе проведенного выравнивания последовательностей гена *p83/100*, имеющихся в базе данных GenBank и полученных нами ранее [3]:

p83U67 5'-GGGTAGGATCCATGAAAAAATGTTAC  
TAATCTTTAGTTTTTTTCTTATTTCTTTGAATGGATT  
TCC,

p83L39 5'- CCCAT  
GTTCGACGATCGTGA  
GTTCGAATCCCACC  
ATCCCG.

В состав праймеров были введены сайты для эндонуклеаз рестрикции *Vam*HI и *Sal*I (выделены серым цветом) для последующего клонирования.

Полученные продукты амплификации длиной около 2000 п.н. (рис. 1) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Vam*HI и *Sal*I, очищали в агарозном геле и объединяли в реакции лигирования с ДНК векторной плазмиды pUR291, линейаризованной с помощью тех же эндонуклеаз рестрикции. Выбор в качестве экспресси-

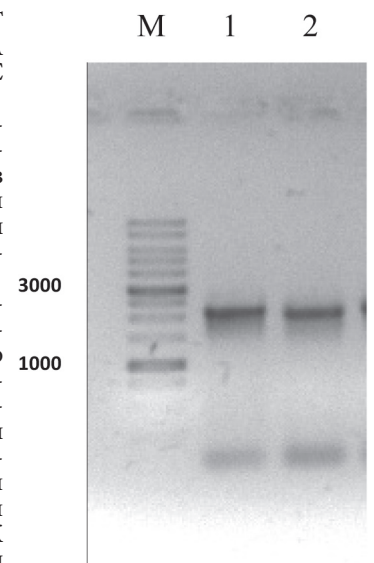


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-фрагментов гена *p83/100* *B. garinii* (1), *B. afzelii* (2). М-ДНК-маркер, длина фрагментов в п.н. приведена слева.



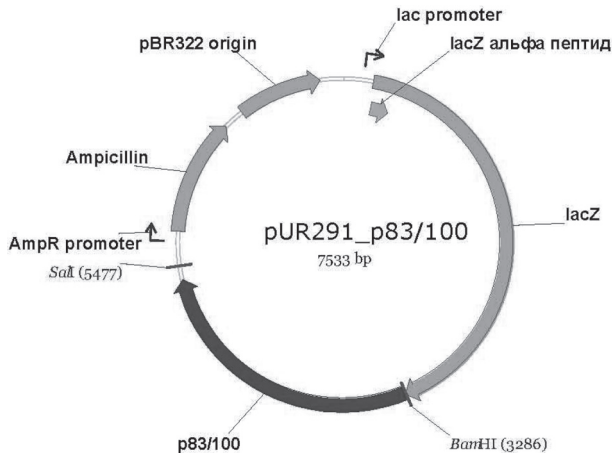


Рис. 2. Карта рекомбинантной плазмиды, содержащей последовательность гена *p83/100* боррелий.

рующего вектора плазмиды pUR291, содержащей ген бета-галактозидазы под контролем *lac*-промотора, обусловлен тем, что при встраивании чужеродных последовательностей в 3'-конец этого гена 5'-концевая область мРНК сохраняется нативной, и поэтому оптимальна для инициации трансляции. Кроме того, гибридные белки на основе бета-галактозидазы как правило сохраняют ферментативную активность и антигенные свойства, характерные для продуктов генов, входящих в состав гибридного белка, что существенно упрощает процедуру их очистки и использования.

Продуктами реакции лигирования трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL2-bl<sub>u</sub>. Полученные индивидуальные клоны анализировали на наличие в них плазмид, содержащих целевую вставку. В отобранных клонках, содержащих плазмиду со вставкой около 2190 п.н. по сайтам *Bam*HI и *Sa*I, правильность встройки подтверждали секвенированием. Для этого на основе ранее построенного нуклеотидного выравнивания различных последовательностей гена *p83/100* были рассчитаны следующие олигонуклеотидные праймеры:

Bor\_SEQ528U25 5' TCAATGGGCTGGAAAGACACA AATA 3',

Bor\_SEQ1021U26 5' CCAAAACCTGGTGATGTAAGT TCTCC 3',

Bor\_SEQ1647U26 5' TTTAGGAACGCTTCAACTTAT TGATT 3',

Bor\_SEQ1729L29 5' ACAACTAAATCTTTTTTCACGTT CATAAAT 3',

Bor\_SEQ1141L26 5' CTTTTTTTGATTTCAATTTGCT TTTTC 3',

Bor\_SEQ613L26 5' GCCACAACCTTATCTGTAACCA AACT 3',

а также последовательности праймеров, комплементарных ДНК векторной плазмиды pURSEQU20 5' GCCCGTCAAGTATCGGCGGAA 3' и

pURSEQL22 5' TCACGAGGCCCTTTCGTCTTCA 3'.

По результатам секвенирования выбрали плазмидные ДНК pUR-p83/100-43T и pUR-p83/100-52T, содержащие правильную последовательность гена P83/100 двух видов боррелий – *B. garinii*, Tom 9105 и *B. afzelii*, Tom 4106, соответственно. Карта результирующих рекомбинантных плазмид представлена на рис. 2.

Плазмидными ДНК pUR-p83/100-43T и pUR-p83/100-52T трансформировали клетки *E. coli* BMH7118.

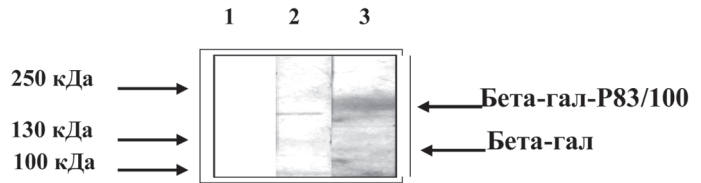


Рис. 4. Вестерн блот анализ лизатов индуцированных клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pUR-p83/100-43T, проявленных сыворотками здоровых доноров (1), клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pUR-p83/100-43T, проявленных сыворотками больных ИКБ (2), клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pUR291, проявленных сыворотками больных ИКБ (3).

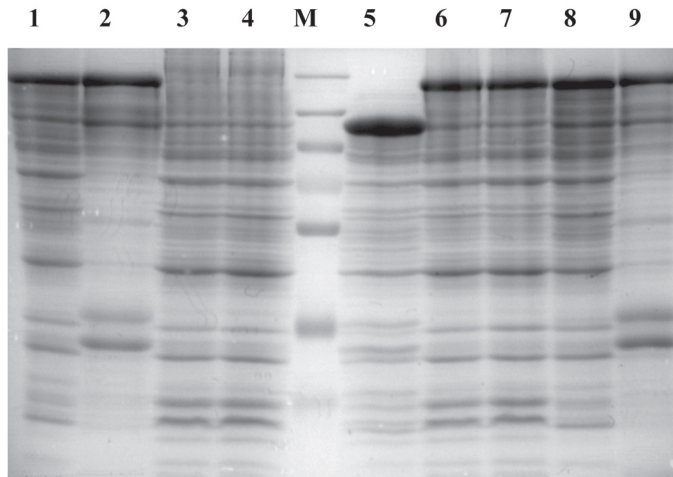


Рис. 3. Электрофореграмма в 10% полиакриламидном геле с SDS лизатов клеток *E. coli*, периплазматических и цитоплазматических фракций. Дорожки: растворимая фракция индуцированных клеток, содержащих плазмиду pUR-p83/100-43T (1); нерастворимая фракция индуцированных клеток, содержащих плазмиду pUR-p83/100-43T (2); лизат клеток, содержащих плазмиду pUR-p83/100-43T без индукции (3); лизат клеток, содержащих плазмиду pUR-p83/100-52T без индукции (4); pUR291 (5), лизат индуцированных клеток, содержащих плазмиду pUR-p83/100-43T (6); лизат индуцированных клеток, содержащих плазмиду pUR291\_p83/100\_52T (7); растворимая фракция индуцированных клеток, содержащих плазмиду pUR291\_p83/100\_52T (8), нерастворимая фракция индуцированных клеток, содержащих плазмиду pUR291\_p83/100\_52T (9). М – маркер молекулярных масс «PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder» (Ферментас, Литва).

Продукцию гибридных белков достигали индукцией *lac*-промотора с помощью ИПТГ. Индивидуальные клоны анализировали на присутствие гибридного белка электрофоретически (рис. 3). Согласно расчетам молекулярная масса гибридного белка в случае *B. garinii* должна составлять 196 кДа (1719 а.к.о.), в случае *B. afzelii* – 192 кДа (1689 а.к.о.). По результатам анализа было сделано заключение, что в обеих культурах клеток *E. coli* происходит эффективная продукция гибридного белка бета-галактозидаза-P83/100 (рис. 3) с уровнем продукции около 20% от суммарного клеточного белка.

Исследование распределения гибридных белков между растворимой и нерастворимой фракцией показало, что большая часть белка (более 90%) находится в растворимой фракции (рис. 3), принимая во внимание то, что фракция нерастворимых белков была сконцентрирована в 10 раз больше, чем фракция растворимых белков. Методом вестерн блот анализа было подтверждено, что полученные гибридные белки, в отличие от бета-галактозидазы, выявляются сыворотками больных ИКБ и не выявляются сыворотками здоровых доноров (рис. 4).

Таким образом, нами были сконструированы штаммы *Escherichia coli* / pUR-p83/100-43T и *Escherichia coli* / pUR-p83/100-52T, продуцирующие гибридные белки бета-галактозидаза-P83/100 *Borrelia garinii*, Tom 9105 и *B. afzelii*, Tom 4106, соответственно.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 11-04-01066-а и проекта №5.25 Программы фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки – медицине» Российской академии наук.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Боргояков В.Ю., Фоменко Н.В., Панов В., Чикова Е.Д. Исследование зараженности боррелиями таежных клещей в Новосибирском научном центре СО РАН // Паразитология. – 2010. – №44(6). – С.543-556.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М., 1984. – 477 с.
3. Фоменко Н.В., Сабитова Ю.В., Хаснатинов М.А. и др. Гетерогенность гена *p83/100* боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. – 2007. – №4. – С.31-37.
4. Фоменко Н.В., Стронин О.В., Сабитова Ю.В., Романова Е.В. Использование боррелий трех видов для выявления специфических антител в крови больных иксодовыми клещевыми боррелиозами // Журнал инфекционной патологии. – 2010. – Т. 17. №3. – С.143-146.
5. Anda P., Backenson P.B., Coleman J.L., et al. Epitopes shared by unrelated antigens of *Borrelia burgdorferi* // Infect. Immun. – 1994. – Vol. 62. – P.1070-1078.
6. Birnboim H., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure

for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res. – 1979 – Vol.7 – P.1513.

7. Fomenko N.V., Livanova N.N., Chernousova N.Y. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in natural foci of Novosibirsk region // Int. J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 298. S1. – P.139-148.

8. Rauer S., Kayser M., Neubert U., et al. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* for serodiagnosis of Lyme disease // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33. – P.2596-2600.

9. Rossler D., Eiffert H., Jauris-Heipke S., et al. Molecular and immunological characterization of the *p83/100* protein of various *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains // Med. Microbiol. Immunol. – 1995. – Vol. 184. – P.23-32.

10. Sigal I. Immunologic mechanisms in Lyme neuroborreliosis: the potential role of autoimmunity and molecular mimicry // S. Neurol. – 1997. – Vol. 17. – P.63-68.

11. Towbin H., Staehlin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. – P.4350.

Информация об авторах: 630090, г. Новосибирск, Академика Лаврентьева проспект, 8, раб. тел. (383)-363-51-57, e-mail: i\_babkin@mail.ru Бабкин Игорь Викторович — к.б.н., старший научный сотрудник; Тикунова Нина Викторовна — д.б.н., зав. лабораторией; Васькова Анна Андреевна — соискатель; Бабкина Ирина Николаевна — к.б.н., с.н.с.; Фоменко Наталья Владимировна — к.б.н., научный сотрудник.

© ШКОДА О.С., ЧИКОВА Е.Д., ФОМЕНКО Н.В., ВЛАСОВ В.В., ЛАКТИОНОВ П.П., РЫКОВА Е.Ю. – 2012  
УДК 616.98:579.834.144-97

### ВЗАИМОСВЯЗЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК КРОВИ С ОСОБЕННОСТЯМИ И ХАРАКТЕРОМ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ИКСОДОВЫМ КЛЕЩЕВЫМ БОРРЕЛИОЗОМ НА РАННИХ СТАДИЯХ

Ольга Сергеевна Шкода, Елена Дмитриевна Чикова, Наталья Владимировна Фоменко, Валентин Викторович Власов, Павел Петрович Лактионов, Елена Юрьевна Рыкова (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, директор – акад. РАН, проф., д.х.н. В.В. Власов)

**Резюме.** Для оценки возможности использования внеклеточных ДНК, циркулирующих в крови (цирДНК), в диагностике инфекционного процесса проведено определение их концентрации в крови 61 больного с диагнозом «иксодовый клещевой боррелиоз» (ИКБ) и 60 здоровых доноров. В крови больных выявлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов и цирДНК крови на ранней стадии ИКБ до появления специфических антител к антигенам боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. Показано, что дальнейшее возрастание концентрации цирДНК крови при развитии гуморального иммунного ответа ассоциировано с появлением высоких титров антиборрелиозных антител и повышением уровня противовоспалительных цитокинов. Полученные данные говорят о перспективности дальнейшего изучения цирДНК крови в качестве дополнительного диагностического критерия при ИКБ.

**Ключевые слова:** иксодовый клещевой боррелиоз, циркулирующие ДНК крови, иммунный ответ, цитокины, специфические антитела.

### CIRCULATING DNA AND IMMUNE RESPONSE CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH EARLY STAGES OF TICK-BORNE BORRELIOSIS

O.S. Shkoda, E.D. Chikova, N.V. Fomenko, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov, E.Y. Rykova (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS)

**Summary.** To assess the possibility of using circulating DNA diagnostic potential in tick-borne borreliosis, 61 patients and 60 healthy donors have been surveyed. With the purpose of establishment of immune response characteristics cytokine profile and antibodies level, specific to *Borrelia burgdorferi* s.l. antigens were analyzed. At an early stage of tick-borne borreliosis induction of pro-inflammatory cytokines secretion and increase in csb-cirDNA concentration were revealed before the development of specific antibodies. Further increase in csb-cirDNA concentration was significantly associated with the appearance of high titers of antibodies specific to *Borrelia burgdorferi* s.l. and with anti-inflammatory cytokines secretion increase. The data obtained indicate that further study of the cirDNA concentration is promising to evaluate its applicability as the additional diagnostic criterion of tick-borne borreliosis.

**Key words:** Tick-borne borreliosis, circulating DNA of blood, immune response, cytokines, specific antibodies.

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – природно-очаговые трансмиссивные заболевания, занимающие по широте распространения одно из первых мест среди природно-очаговых инфекций в России. Возбудители ИКБ – спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.), – передаются человеку клещами рода *Ixodes*.

Боррелии обладают способностью к длительной персистенции в организме человека, что может вызывать осложнения, в том числе аутоиммунного характера. Поэтому актуальным является выявление факторов, пригодных для ранней диагностики и разработки подходов эффективного лечения. Одним из критериев по-

становки диагноза ИКБ является воспалительная реакция кожи в месте укуса клеща – мигрирующая эритема (МЭ), однако встречаются безэритемные формы ИКБ, диагностика которых затруднена. В таких случаях важно проведение лабораторных исследований, позволяющих подтвердить диагноз путем выявления специфических антител к антигенам боррелий или непосредственно ДНК боррелий в крови или моче больных ИКБ. Ранее было показано, что внеклеточные ДНК, циркулирующие в крови (цирДНК), присутствуют в норме в невысоких концентрациях, тогда как их количество и состав изменяются при онкологических и аутоиммунных патологиях [6]. Считается также, что одним из важных факторов в патогенезе данной инфекции является, помимо повреждающего действия эндо и экзотоксинов боррелий, характер иммунного ответа организма, определяющийся опосредованным действием инфекции [2].

В настоящей работе проведен анализ изменения концентрации цирДНК и цитокинового профиля в норме и при различных формах ИКБ с целью оценки возможности их дальнейшего использования в качестве дополнительных диагностических маркеров.

### Материалы и методы

В исследование включены образцы крови 60 здоровых лиц, отрицавших факт присасывания клеща в анамнезе за последние 3 года для определения концентрации цирДНК крови, 40 здоровых доноров для определения уровня цитокинов и 61 больной, пострадавший от укуса клеща и поступивший в Городскую инфекционную клинику больницы №1 (ГИКБ №1) г. Новосибирска с признаками инфекционного заболевания и последующим диагнозом ИКБ. Все больные подписали протокол добровольного информированного согласия на участие в исследовании. Диагноз ИКБ был поставлен на основании анамнеза (присасывание клеща), клинических симптомов, наличия МЭ и по результатам лабораторных тестов (выявление антител классов IgG и IgM к АГ боррелий). Определение титра антител классов IgG и IgM к антигенам боррелий и концентрации цитокинов (IL-10, IL-6, IL-4, αФНО, γИНФ, рецепторного антагониста ИЛ-1 (IL-1 Ra)) проводилось методом ИФА с использованием коммерческих наборов («Вектор-Бест», Новосибирск). Учет результатов производили на иммуноферментном анализаторе «Multiskan». Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочных кривых с помощью компьютерной программы.

Венозную кровь собирали в пробирки «Vacuette»-К3EDTA «Greiner bio-one» с 0,5 М ЭДТА (Австрия) и разделяли на плазму и клетки крови. Фракцию цирДНК, связанных с клеточной поверхностью (скп-цирДНК), получали последовательной обработкой клеток 5 мМ фосфатным буфером, содержащим ЭДТА (ФБ-ЭДТА), и 0,125 % раствором трипсина, как описано ранее [3]. ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 3 мл ФБ-ЭДТА и 1 мл трипсиновой фракции с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). Концентрация цирДНК крови определяли с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени, специфичной к фрагментам повторяющихся последовательностей LINE-1 как описано ранее

[4]. Выявление ДНК боррелий проводилось методом ПЦР с праймерами к межгенному спейсеру 5S-23S рРНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s.l. и гену OspA.

Статистическая обработка результатов осуществлялась общепринятыми методами статистики пакета Statistica 6.0, MedCalc. Результаты представлены в виде средней и средней квадратичной ошибки. Статистическая значимость полученных данных определялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

В общей группе больных ИКБ (эритемная форма – 80,3%, безэритемная форма – 19,7%) отмечается увеличение уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, γ-ИНФ, α-ФНО) по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Ранее показано, что у взрослых больных эритемной формой ИКБ в фазу разгара кожных проявлений наблюдается повышение уровня γ-ИНФ в 2 раза, а у детей в 1-ю неделю заболевания происходит также значительное увеличение уровня IL-6 и α-ФНО [5,1]. Подобная тенденция указывает на преобладание клеточного иммунного ответа на ранних стадиях любого инфекционного процесса, в том числе, ИКБ. Напротив, уровень двух противовоспалительных цитокинов (IL-10 и IL-4) в группе больных ИКБ оказался статистически значимо ниже, чем у здоровых людей (табл. 1). В других исследованиях показано повышение уровня этих

Таблица 1

Концентрация цирДНК (нг/мл) и цитокинов (пг/мл) в крови больных с различными формами ИКБ и здоровых лиц

Исследуемые показатели	Здоровые	ИКБ (n=61)	ИКБ эритемная форма (n=49)	ИКБ безэритемная форма (n=12)	АГ «-» (n=32)	АГ «+» ↑↑ (n=19)
IL-1 Ra	398,1±30,9	531,2±45*	487,93±44	707,85±132,9**	476,1±35,8	642,4±105,3*
IL-4	1,9±0,26	1,18±0,44*	1,28±0,54	0,8±0,52	0,59±0,22	1,5±0,7***
γ-ИНФ	1±0,18	19,8±2*	20,05±2,2	19,13±5,25	20,52±3,04	16,8±3,2
α-ФНО	0,8±0,14	3,26±0,81*	2,21±0,68	6,91±2,9	4,05±1,31	3,27±1,2
IL-10	9,8±1,3	5,27±2,05*	5,18±2,37	5,6±4	4,56±2,1	8,87±5,5***
IL-6	0,06±0,01	14,57±2,1*	9,59±0,79	20,38±9,5	9,8±0,96	11,6±4,2
цирДНК	2,7 ± 2,5	9,9±2,6*	4,3±0,69	7,9±2,4	3,9 ± 0,01	5,78±1,7
Скп-цирДНК	13,4 ± 0,41	98,5±14,5*	68,3±11,4	157,28±38,6**	55,4 ± 14,2*	176,1±1,49*

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой больных с эритемной формой боррелиоза; \*\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой больных без выявленных АГ к АГ боррелий.

цитокинов в динамике и последующая индукция ими гуморального иммунитета на ранних стадиях заболевания [5]. Такие различия могут быть следствием неоднородности исследованной нами группы больных ИКБ по сроку тестирования от момента инфицирования и как следствие, различным уровнем развития гуморального ответа. В связи с этим больные ИКБ разделены на группы с высоким титром (2,0-12,0 о.е.) антител (n=19), низким титром (1,1-2,0 о.е.) антител (n=10) и отсутствием (титр менее 1,1 о.е.) антител (n=32) к АГ боррелий классов М или/и G. Сравнительный анализ показал, что первоначальное снижение концентрации IL-10 и IL-4 в плазме крови по сравнению с контролем далее изменяется на возрастание в ряду: больные без антиборрелиозных антител – с низким уровнем антител – с высоким уровнем антител (4,56±2,1 – 5,31±2,3 – 8,87±5,5 для IL-10 и 0,59±0,22 – 0,67±0,24 – 1,5±0,7 для IL-4).

Кроме того, в общей группе больных ИКБ происходит статистически значимое увеличение концентрации в крови IL-1 Ra, выступающего в качестве антагониста основного провоспалительного цитокина IL-1. При этом более высокая концентрация наблюдается в группе больных с высоким уровнем антиборрелиозных антител по сравнению с группой без антител (табл. 1). Эти результаты согласуются с более ранними данными о

том, что у детей с общеинфекционным синдромом ИКБ наблюдается увеличение концентрации IL-1 Ra [1]. В настоящей работе также выявлена статистически значимо более высокая концентрация IL-1 Ra в группе больных с безэритемной формой ИКБ относительно больных с эритемной формой (табл. 1).

Таким образом, в общей группе больных ИКБ отмечено преобладание провоспалительных цитокинов (IL-6,  $\gamma$ -ИНФ,  $\alpha$ -ФНО) над противовоспалительными (IL-10, IL-4, IL-1 Ra). На ранней стадии развития ИКБ, предшествующей появлению специфических антиборрелиозных антител, наблюдается пониженная концентрация противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10, тогда как увеличение их концентрации ассоциировано с развитием высокого уровня специфических антител.

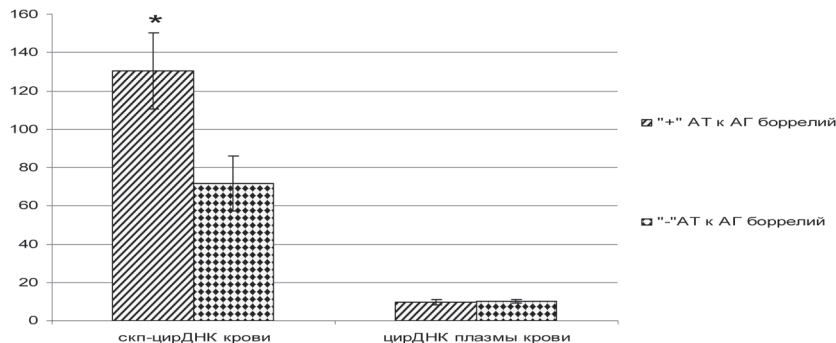


Рис. 1. Концентрация сирДНК в крови больных с ИКБ (нг/мл), \* -  $p < 0,05$  критерий Манна-Уитни.

В общей группе больных с диагнозом ИКБ выявлено статистически значимое увеличение концентрации сирДНК плазмы и сирДНК по сравнению со здоровыми лицами (табл. 1). Показано статистически значимо увеличение концентрации как сирДНК, так и уровня сирДНК плазмы крови у больных с безэритемной формой ИКБ по сравнению с эритемной формой ИКБ, что говорит об ассоциации увеличения

сирДНК с отсутствием неспецифической воспалительной реакции местного характера. Обнаружено, что среднее значение концентрации сирДНК в группе больных с ИКБ, имеющих специфические антитела к АГ боррелий ( $n=29$ ), существенно превышает значение концентрации у больных без выявленных антител ( $n=32$ ) ( $p < 0,05$ ) (рис. 1) и возрастает в ряду: больные без антиборрелиозных антител – с низким уровнем антител – с высоким уровнем антител ( $55,4 \pm 14,2 - 83,2 \pm 26,8 - 176,1 \pm 12,49$ ). По количеству сирДНК плазмы крови не выявлено статистически значимых различий между этими группами. Согласно полученным данным, развитие специфического гуморального иммунного ответа на боррелиозную инфекцию ассоциировано с увеличением концентрации сирДНК.

В настоящей работе впервые показано статистически значимое увеличение концентрации сирДНК крови при развитии ИКБ. На первом этапе развития болезни наблюдается повышение уровня провоспалительных цитокинов (IL-6,  $\gamma$ -ИНФ,  $\alpha$ -ФНО) и концентрации сирДНК в крови. Развитие специфического гуморального иммунного ответа характеризуется повышением титра специфических антител, ростом уровня противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-4, IL-1 Ra) и дальнейшим повышением концентрации сирДНК в крови. Выявлена ассоциация повышения концентрации IL-1 Ra и сирДНК в крови с отсутствием неспецифической воспалительной реакции (МЭ) при ИКБ. Полученные данные говорят о перспективности дальнейшего изучения сирДНК крови как дополнительного фактора, применимого для диагностики, и, возможно, принимающего участие в патогенезе ИКБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01066-а, проектом № 5.25 Программы 21 фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки – медицине».

## ЛИТЕРАТУРА

- Бедарева Т.Ю., Попонникова Т.В., Галиева Т.Ю., Вахрамеева Т.Н. Клинико-патогенетические особенности острого периода инфекций, передающихся иксодовыми клещами, у детей // Вестник Уральской государственной медицинской академии. – 2010. – №21. – С.50-59.
- Коренберг Э.И., Крючечников В.Н. Иксодовые клещевые боррелиозы – новая группа заболеваний человека // Журнал микробиологии. – 1996. – №4. – С.104-107.
- Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Хоффман А-Л. и др. Циркулирующие внеклеточные ДНК и РНК крови в диагно-

стике онкопатологий молочной железы // Биомед. химия. – 2008. – Т. 54. – С.94-1013.

4. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., et al. Concentration and distribution of single-copy  $\beta$ -actin gene and LINE-1 repetitive elements in blood of lung cancer patients // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. / Ed. P. Gahan. – 2011. – Part 2. – P.41-45.

5. Simakova A.I. Ixodic tick borreliosis in primorsky region // Pacific Medical Journal. – 2005. – №1 – P.68-71.

6. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers // Curr. Mol. Med. – 2010. – Vol. 10 – P.142-165.

Информация об авторах: Шкода Ольга Сергеевна – аспирант, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова 25/4, АНО «Центр новых медицинских технологий в Академгородке», лаборатория генной диагностики, тел. (383)330-76-66, e-mail: olgashkoda@sibmail.ru; Чикова Елена Дмитриевна – заведующая лабораторией, к.м.н.; Фоменко Наталья Владимировна – сотрудник лаборатории, к.б.н.; Лактионов Павел Петрович – заведующий группой, к.б.н.; Рыкова Елена Юрьевна – сотрудник группы, д.б.н.; Власов Валентин Викторович – директор института, д.х.н., профессор, академик РАН.

© ТКАЧЕВ С.Е., БОРГОЯКОВ В.Ю., ЛИВАНОВА Н.Н., ПАНОВ В.В. – 2012  
УДК 578; 578.2'21; 578.8; 578.06; 578.4; 616-036.22

## ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТИПОВ И ПОДТИПОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА

Сергей Евгеньевич Ткачев<sup>1</sup>, Вячеслав Юрьевич Боргояков<sup>1</sup>,  
Наталья Николаевна Ливанова<sup>1,2</sup>, Виктор Васильевич Панов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, директор – академик РАН В.В. Власов, лаборатория молекулярной микробиологии, зав. – д.б.н. Н.В. Тикунова;

<sup>2</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск, директор – д.б.н., проф. В.В. Глухов,

**Резюме.** Проведено выявление РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и генотипирование положительных образцов из клещей рода *Ixodes*, собранных на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра и прилегающих территорий в 2007-2010 гг. Показано, что на указанных территориях выявляется преимущественно сибирский (подтипы Заусаев, Васильченко и подтип, неописанный ранее) генотип и, в единичных случаях, дальневосточный и западноевропейский генетические типы ВКЭ.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, генотипы ВКЭ, подтипы сибирского генотипа.

#### THE OCCURRENCE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS GENOTYPES AND SUBGENOTYPES ON THE TERRITORY OF NOVOSIBIRSK SCIENTIFIC CENTER

S.E. Tkachev<sup>1</sup>, V.Yu. Borgoyakov<sup>1</sup>, N.N. Livanova<sup>1,2</sup>, V.V. Panov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia)

**Summary.** TBEV RNA detection and positive samples genotyping were performed for *Ixodes* family ticks on the territory of Novosibirsk scientific center and its suburbs in 2007-2010. It was shown that Siberian genotype (with three subgenotypes) was mainly revealed on these territories and in single cases Far-Eastern and Western genotypes were found.

**Key words:** tick-borne encephalitis, TBEV genotypes, subgenotypes of Siberian genotype.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к семейству флавивирусов, вызывает тяжелое инфекционное заболевание, поражающее центральную нервную систему человека. Заболевание характеризуется различной тяжестью клинических проявлений, в том числе развитием в ряде случаев очаговых форм, высокой частотой остаточных явлений в виде парезов и параличей, а также летальности, достигающей 30% [5].

В настоящее время, большинство исследователей выделяют для ВКЭ 3 основных генетических типа: дальневосточный (с прототипным штаммом Софьин), западноевропейский или западный (прототипный штамм Найдорф) и сибирский или урало-сибирский (с прототипными штаммами Васильченко и Заусаев) [3,4,6,10,12,13]. Также, за последние годы были выявлены и охарактеризованы возможные новые генотипы ВКЭ – генотип, представленный одиночным штаммом 178-79, и генотип, представленный группой штаммов, сходных со штаммом 886-84. Оба этих штамма были изолированы на территории Иркутской области и отвечают критериям выделения в самостоятельные генотипы, установленным на основании степени геномных отличий [1,2,9].

Следует отметить, что деление вируса на генетические типы с привязкой к географическому месту выделения изолятов и штаммов ВКЭ является условным, так как в различных регионах встречаются различные генетические типы ВКЭ, причем в одном и том же регионе возможно выявление нескольких генотипов вируса, как, например, на территории Западной Сибири [3,11,17].

Целью данной работы являлось исследование генетического разнообразия ВКЭ в образцах индивидуальных иксодовых клещей, собранных на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра СО РАН (ННЦ СО РАН).

#### Материалы и методы

**Сбор образцов.** Голодных имаго клещей рода *Ixodes* собирали флажированием с растительности в природном очаге лесопарковой зоны Новосибирского научного центра в эпидемиологические сезоны 2007-2010 гг. Также проводили сбор образцов клещей с людей, обращающихся по поводу укуса в Пункт вакцинопрофилактики ЦКБ СО РАН и Центра новых медицинских технологий в эпидсезоны 2009-2010 гг.

**Выделение суммарных РНК.** Суммарные нуклеиновые кислоты из иксодовых клещей выделяли с использованием наборов "Проба НК" («ДНК-технология», Москва) согласно инструкциям производителя.

**Обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция.** Получение кДНК, соответствующих фрагментам

генома ВКЭ, проводили методом обратной транскрипции (ОТ) с применением наборов "РевертаЛ" в соответствии с инструкциями изготовителя ("АмплиСенс", ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ). В качестве матрицы использовали образцы суммарных нуклеиновых кислот, выделенных из клещей. Двухраундовую полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с праймерами, соответствующими 3'-концу гена E (позиции 2199-2219 и 2214-2238 н.о.) и 5'-концу гена NS1 (позиции 2402-2424 и 2517-2539 н.о.) ВКЭ.

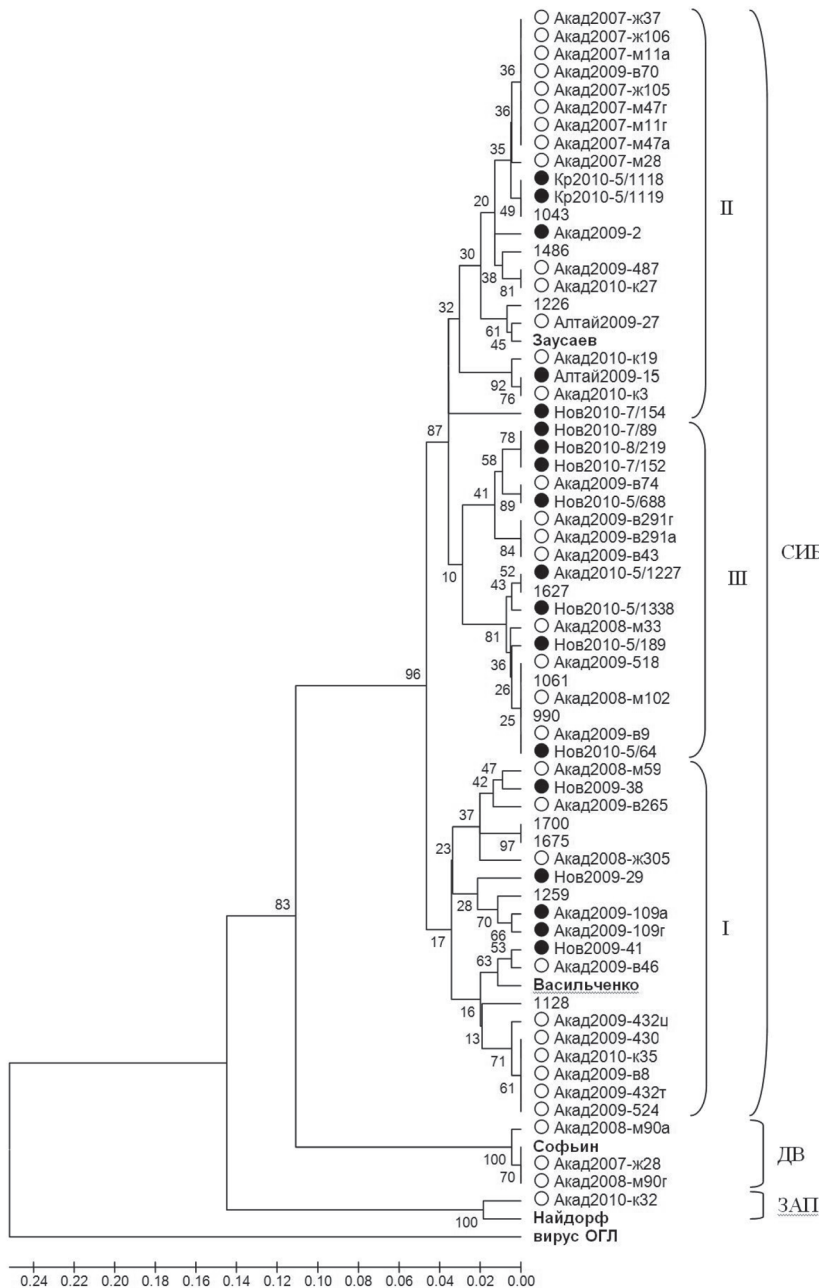
**Определение нуклеотидных последовательностей и молекулярно-генетический анализ.** Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР, соответствующих фрагментам генома ВКЭ, проводили с помощью наборов BigDye Terminators Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, США) с применением автоматического анализатора ДНК модели ABI 310 (Applied Biosystems, США) в Центре секвенирования ДНК СО РАН. Выравнивание полученных последовательностей осуществляли с использованием программы ClustalW [15]. Поиск гомологии полученных нуклеотидных последовательностей с уже известными последовательностями фрагментов геномов ВКЭ проводили с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Для сравнения использовали последовательности генов E и NS1 штаммов ВКЭ, относящихся к различным генетическим типам, из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 5 [14,16]. Оценку достоверности построенных филогенетических деревьев осуществляли с помощью бутстрэп-анализа, индекс, которого был посчитан при общем числе повторов 1000.

#### Результаты и обсуждение

Было проведено выявление вирусных РНК и генотипирование положительных образцов из индивидуальных клещей рода *Ixodes*, собранных либо флажированием в 2007-2010 гг., либо с людей, обратившихся по поводу укуса в Пункт вакцинопрофилактики ЦКБ СО РАН и ЦНМТ в 2009-2010 гг., на территории лесопарковой зоны Академгородка и прилегающих территорий.

Положительные по ВКЭ образцы выявляли методом двухраундовой ПЦР с праймерами, соответствующими фрагментам генов E-NS1, причем вирус обнаруживали как в самках, так и самцах иксодовых клещей. Затем, для ряда образцов, выделенных на различных территориях, были определены нуклеотидные последовательности ПЦР-фрагментов длиной 341 п.н.:

1) Ботанический сад, окрестности ННЦ, смешанный березово-осиновый лес: Акад2007-м11а; Акад2007-м11г;



СИБ – сибирский генотип ВКЭ; ДВ – дальневосточный генотип ВКЭ; ЗАП – западноевропейский генотип ВКЭ. I – подтип Васильченко; II – подтип Заусаев; III – подтип, неопи- санный ранее.

Белым кругом отмечены образцы ВКЭ из индивидуальных клещей, собранных флаги- рованием; черным кругом отмечены образцы ВКЭ из индивидуальных клещей, собранных после укусов людей. Жирным выделены прототипные штаммы и внешняя группа – вирус омской геморрагической лихорадки (ОГЛ).

Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основании нуклеотидных последовательностей фрагментов генов E и NS1 ВКЭ методом UPGMA.

Акад2007-м28; Акад2007-м33; Акад2007-м47а; Акад2007- м47г; Акад2008-ж305; Акад2008-м59; Акад2008-м102; Акад2008-м90а; Акад2008-м90г; Акад2009-487; Акад2009- 518; Акад2009-524; Акад2010-к3; Акад2010-к19; Акад2010-к27; Акад2010-к32; Акад2010-к35;

2) Пойма реки Шадриха, 8 км к юго-востоку от ННЦ, сосновый лес: Акад2009-430; Акад2009-432г; Акад2009- 432ц;

3) Смешанный березово-осиновый лес за Институтом Катализа СО РАН, окрестности ННЦ: Акад2007-ж28; Акад2007-ж37; Акад2007-ж105; Акад2007-ж106;

4) Новосибирский район, окрестности села Жеребцово, 25 км к северо-востоку от ННЦ, смешан- ный березово-осиновый лес: Акад2009-в265; Акад2009- в291а; Акад2009-в291г;

5) Тогучинский район, окрест- ности села Усть-Каменка, 53 км к северо-востоку от ННЦ, смешанный березово-осиновый лес: Акад2009-в8; Акад2009-в9; Акад2009-в43; Акад2009-в46; Акад2009-в70; Акад2009-в74.

6) Садовое общество “Ключи”: Акад2010-5/1227;

7) Шлюзы: Нов2010-5/1338;

8) Матвеевка: Нов2010-5/189;

9) Садовые общества в Верхней Зоне ННЦ: Акад2009-109а, Акад2009- 109г;

10) г. Искитим: Нов2009-38;

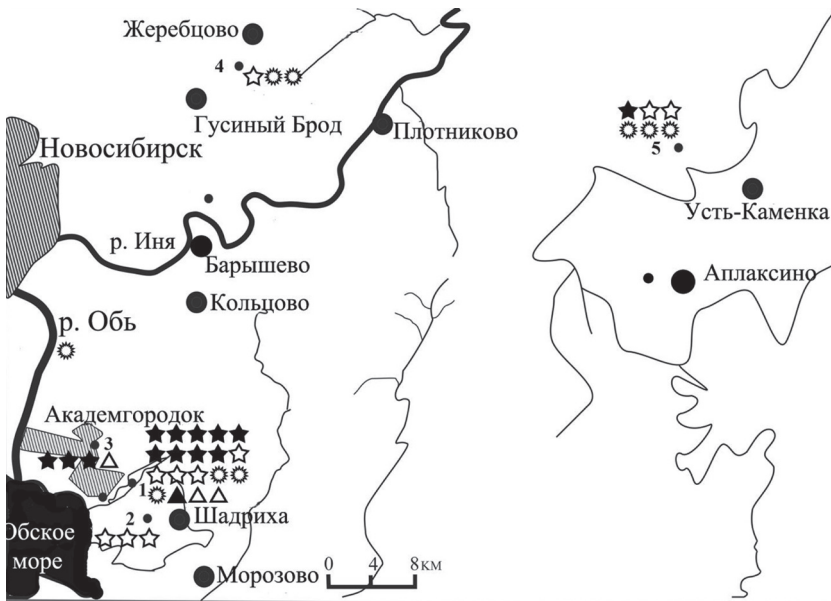
11) пос. Краснообск: Нов2009-29;

12) г. Бердск: Нов2009-41.

Анализ последовательностей, со- ответствующих вариантам вируса, выявленным в индивидуальных клещ- ах, показал доминирование ВКЭ, от- носящихся к сибирскому генетическо- му типу с уровнем гомологии 89-98% последовательностям прототипных штаммов Васильченко и Заусаев на территории ННЦ; также, сибирский генотип выявлялся в иксодовых клещ- ах, собранных с людей после укуса в окрестностях города Новосибирска.

Далее проводили филогенетиче- ский анализ полученных последо- вательностей. Для сравнения были использованы нуклеотидные последо- вательности данного фрагмента генома для ряда штаммов ВКЭ, иссле- дованных ранее, выделенных методом биопробы на указанной территории в 1981-2001 гг. (штаммы 990 (номер JN542607 в базе данных GenBank), 1043 (JN542610), 1061 (JN542614), 1128 (JN542619), 1226 (JN542627), 1259 (JN542629), 1486 (JN542640), 1627 (JN542652), 1675 (JN542656), 1700 (JN542660), относящиеся к различ- ным подтипам сибирского генотипа ВКЭ) [7,8]. Методом UPGMA было показано, что исследуемые вариан- ты ВКЭ, относящиеся к сибирскому генотипу, разделяются на 3 подтипа – подтипы Васильченко (I), Заусаев (II) и подтип, неопи- санный ранее (III) (рис. 1), что было описано ранее и для коллекции штаммов ВКЭ, собранных на территории ННЦ в 1981-2011 гг. [7,8]. Также, два образца ВКЭ, выяв- ленные в индивидуальных иксодовых клещ- ах с территории лесопарковой зоны Новосибирского научного цен- тра, относились к дальневосточному генотипу и один – к западноевропей- скому. Ранее нами было показано, что в крови больных, госпитализированных после укусов клещами с различ- ными формами клещевого энцефалита, несмотря на до- минирование сибирского генотипа в клещ- ах, выявлялся дальневосточный генотип ВКЭ [18], что, вероятно, мо- жет быть связано с особенностями патогенеза различ- ных вирусных вариантов.

Интересен факт единичного обнаружения за послед- ние несколько лет западноевропейского генотипа ВКЭ на территории Академгородка. Ранее данный генотип в Западной Сибири был найден на территории Алтая [9], и, по всей видимости, может встречаться и на других территориях, либо заноситься на них в силу активно- го перемещения населения в результате туристической деятельности.



Сибирский генотип:   
 ★ подтип Заусаев   
 ☆ подтип Васильченко   
 ☆ подтип, неописанный ранее   
 ▲ Дальневосточный генотип   
 ▲ Западный генотип

Рис. 2. Встречаемость различных генотипов и подтипов ВКЭ на территории Новосибирского научного центра и его окрестностях.

Таким образом, с учетом места сбора выявленных положительных генотипированных образцов ВКЭ, была построена схема встречаемости различных генотипов ВКЭ на территории Новосибирского научного центра и его окрестностях (рис. 2).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М. и др. Генетическая вариабельность и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов // Вопросы вирусологии. – 2009. – Т. 54. №3. – С.33-42.
2. Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М. и др. Молекулярная эпидемиология вируса клещевого энцефалита географическая вариабельность, определяемая методом молекулярной гибридизации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. – Т. 46. №3. – С.27-39.
3. Злобин В.И., Беликов С.И., Джиоев Ю.П. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 272 с.
4. Злобин В.И., Демина Т.В., Беликов С.И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа уровней гомологии фрагмента гена белка оболочки // Вопросы вирусологии. – 2001. – Т. 46. №1. – С.17-22.
5. Львов Д.К. Медицинская вирусология: руководство. – М.: МИА, 2008. – 656 с.
6. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С. и др. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и

антигенная характеристика штаммов // Вопросы вирусологии. – 2004. – Т. 49. №4. – С.20-25.

7. Ткачев С.Е., Бахвалова В.В., Панов В.В. и др. Исследование генетической структуры популяции вируса клещевого энцефалита, выявляемого на территории лесопарковой зоны Новосибирского научного центра: Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе. Вып. 30 серии "Интеграционные проекты СО РАН" / Под ред. В.В. Власова, В.Е. Репина. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. – 395 с.

8. Ткачев С.Е., Панов В.В., Бахвалова В.Н. Исследования генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в районе г. Новосибирска // Журнал инфекционной патологии. – 2010. – Т. 17. №3. – С.131-133.

9. Demina T.V., Dzhioev Y.P., Verkhozina M.M., et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes // J. Med. Virol. – 2010. – Vol. 82. №6. – P.965-976.

10. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of TBEV from Europe and Asia // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80. – P.179-185.

11. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., et al. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis // Journal of Virology. – 2003. – Vol. 77. №1. – P.25-36.

12. Hayasaka D., Ivanov L., Leonova G.N., et al. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia // J. Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P.1319-1328.

13. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariva H., et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80. – P.3127-3135.

14. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. – 2004. – №5. – P.150-163.

15. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23. – P.2947-2948.

16. Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. №10. – P.2731-2739.

17. Ternovoi V.A., Kurzhukov G.P., Sokolov Y.V., et al. Tick-borne encephalitis with Hemorrhagic Syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999 // Emerging Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 9. №6. – P.743-746.

18. Tkachev S.E., Fomenko N.V., Rar V.A., et al. PCR-detection and molecular-genetic analysis of tick-transmitted pathogens in patients of Novosibirsk region, Russia // International Journal of Medical Microbiology. – 2008. – Vol. 298 S1. – P.365-367.

**Информация об авторах:** Ткачев Сергей Евгеньевич – м.н.с. лаборатории, 630090 г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 8; тел. (383) 363-51-37; e-mail: tkachev@niboch.nsc.ru; Боргояков Вячеслав Юрьевич – аспирант; Ливанова Наталья Николаевна – к.б.н., с.н.с.; Виктор Васильевич Панов – к.б.н., с.н.с.

**ЭКСТРАКЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ КЛЕЩЕЙ: ПРОБЛЕМЫ И ВОЗМОЖНОСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ**Денис Игоревич Тимофеев<sup>1</sup>, Наталья Владимировна Фоменко<sup>1</sup>,  
Михаил Константинович Иванов<sup>1,2</sup>

(1)ЗАО “Вектор-Бест” г. Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов, лаборатория ПЦР, зав. – к.б.н. М.К. Иванов; (2)Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, директор – акад. РАН, д.б.н. Н.А. Колчанов, лаборатория структуры генома, зав. – д.б.н., проф. Г.М. Дымщиц)

**Резюме.** Цель работы – разработка и апробация методики оценки качества выделения нуклеиновых кислот (НК) из иксодовых клещей, основанная на определении консервативных участков митохондриальной ДНК клещей при помощи ПЦР с детекцией в реальном времени. Показано, что учет результатов амплификации ДНК клещей в качестве эндогенного контроля позволяет более эффективно отслеживать погрешности при выделении НК из клещей, чем применение экзогенного внутреннего контроля. Без применения эндогенного контроля ошибки анализа могут приводить к неконтролируемому снижению выявляемости НК патогенов, переносимых клещами. Показано повышение чувствительности и воспроизводимости выявления НК в клещах при использовании для их измельчения электромеханических гомогенизаторов.

**Ключевые слова:** клещевые инфекции, ПЦР-анализ, контроль качества, валидация, митохондриальная ДНК.

**EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS FROM TICKS: PROBLEMS AND POSSIBILITY OF STANDARTIZATION**D.I. Timofeev<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>1</sup>, M.K. Ivanov<sup>1,2</sup>

(1)Joint-stock company “Vector-Best”, Novosibirsk; (2)Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk)

**Summary.** The aim of this work is the development and testing of the methodology for assessing the quality of nucleic acids (NA) extraction from ixodidae ticks based on the semi-quantitative determination of the conservative regions of a tick genome by real-time PCR. It has been shown that the amplification of mitochondrial DNA of the tick as a means for the endogenous control enables a more efficient evaluation of the quality of the performed PCR analysis and allows one to keep a better track of its errors than the use of exogenous internal amplification control. Without the endogenous control, the analysis errors can lead to the uncontrolled underdetection of the infectious agents transmitted by ticks. An increase in the sensitivity and reproducibility of the tick NA detection is observed when electro-mechanical homogenizers are employed for tick grinding.

**Key words:** tick-borne infections, PCR analysis, quality control, validation, mitochondrial DNA

Клещи являются носителями широкого спектра микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания человека. Из них в России наиболее широко распространены клещевой энцефалит и иксодовый клещевой боррелиоз. Диагностика клещевых инфекций при укусе клеща предполагает выявление инфекционного агента не только у пострадавшего, но и (если имеется такая возможность) у снятого с него клеща. Обнаружение того или иного патогена при анализе клеща не обязательно указывает на инфицирование укушенного, и, тем более, на заболевание, но как минимум является основанием для превентивной терапии, а наличие в анамнезе укуса инфицированным клещом в дальнейшем может облегчить постановку диагноза и назначение лечения.

Методы лабораторной диагностики, используемые для выявления маркеров патогенных микроорганизмов в клещах, разнообразны. В последнее десятилетие с этой целью широко применяется выявление нуклеиновых кислот (НК) патогенов с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ). К ее основным достоинствам применительно к анализу клещей можно отнести: высокую чувствительность и специфичность, возможность применения внутреннего контроля эффективности анализа, универсальность методики в отношении инфекционных агентов различной природы.

К факторам, ответственным за риск развития заболевания после укуса человека клещом, относят иммунный статус больного, вид, штамм патогена и его дозу, полученную больным. Учитывая разнообразие этих факторов, затруднительно определить клинически значимые нагрузки возбудителей клещевых инфекций. В этой связи, независимо от используемой методики, при выявлении инфекционных агентов в клещах требуется сочетание максимальной чувствительности и высокой надежности анализа. Это требование в случае

ПЦР-анализа предполагает необходимость надежного контроля качества экстракции НК из клеща. Такая экстракция включает отмывки от загрязняющих веществ, используемых при удалении присосавшегося клеща, измельчение клеща, лизис биоматериала, многоступенчатую очистку НК от примесей. Иногда клещ претерпевает длительное хранение перед анализом. Наиболее распространены трудоемкие методики экстракции, предполагающие измельчение клеща пестиком в открытых пробирках, обладающие низкой пропускной способностью и чреватые риском кросс-контаминации. Не исключены потери материала за счет деградации НК, неэффективной методики их экстракции, ошибок лаборанта и т.п. Необходимость стандартизации методик выделения НК из клещей обсуждается [1-4], но такая стандартизация до сих пор не применяется в клинической диагностике.

Целью настоящей работы являлась разработка и апробация методики оценки качества пробоподготовки при выделении НК из иксодовых клещей, основанная на полуколичественном определении консервативных участков генома клещей при помощи ПЦР-РВ.

**Материалы и методы**

**Биологический материал.** Материалом для исследования служили:

1) Клещи (нимфы и имаго), собранные в окрестностях г. Новосибирска весной-летом 2009-2011 гг. Выборка включала клещей двух видов: *Ixodes persulcatus* и *I. pavlovskyi*, разделение на виды не производилось. Перед анализом клещи хранились при температуре (+2 – -8)°C до 1 суток; при температуре (-18 – 30)°C до 1 месяца. НК из суспензий клещей анализировалась немедленно, суспензии клещей хранили при температуре (-18 – 30)°C не более 2 недель, при температуре -68°C и



ниже – длительно.

2) Клещи, заведомо инфицированные и заведомо неинфицированные ВКЭ, полученные из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова. Выборка включала 96 клещей (из них 27 незараженных) следующих видов: *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. pavlovskiyi*, *Dermacentor reticulatus*, *D. nuttali*, *D. marginatus*.

**Выделение НК из клещей и выявление РНК ВКЭ.** Подготовку клещей к анализу проводили согласно инструкции по применению набора “РеалБест РНК ВКЭ” (ЗАО “Вектор-Бест”, Новосибирск). Гомогенизацию индивидуальных клещей родов *Ixodes* и *Dermacentor* или их пулов проводили одним из трех методов в предварительно охлажденном до температуры (+2 – -8)°С растворе для подготовки образцов (РПО) производства ЗАО “Вектор-Бест”. Метод 1 (ручной с применением жидкого азота) и Метод 2 (ручной без применения жидкого азота), предполагающие гомогенизацию клещей пестиками в открытых пробирках, соответствовали инструкции по применению набора “РеалБест РНК ВКЭ” (ЗАО “Вектор-Бест”). Метод 3 заключался в измельчении клещей в закрытых пробирках при помощи гомогенизатора MagNa Lyser (Roche Diagnostics, Швейцария) в комплекте с набором для измельчения образцов «MagNa Lyser Green Beads». Клеща помещали в пробирку, в которую добавляли 250 мкл РПО. Гомогенизацию проводили при скорости 6000-7000 об./мин и в течение 1,5 мин. Отбирали 100 мкл суспензии для выделения НК и проведения анализа. Выделение НК из суспензий индивидуальных клещей и их пулов проводили с использованием набора реагентов «РеалБест Экстракция 100» (ЗАО “Вектор-Бест”, Новосибирск) согласно инструкции производителя. Выявление РНК вируса клещевого энцефалита в суспензиях клещей проводили с использованием набора «РеалБест РНК ВКЭ», согласно инструкции производителя. Для учета потерь НК при экстракции и ингибирования НК использовали внутренний контрольный образец (ВКО), входящий в состав набора для выделения НК. ОТ-ПЦР и детекцию результатов амплификации в реальном времени проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США).

**Олигонуклеотидные праймеры и зонд,** использованные для детекции митохондриальной ДНК (мтДНК) клещей: прямой праймер 5'-АТАСТСТАГГГАТАААСАГСГААТАА, обратный праймер 5'-GTCTGAACTCAGATCATGTAGGA, зонд 5'(R6G)-AGTTTGCGACC(T-BHQ1)CGATGTTGGATTAGGATTCTT-р. Флуоресцентно меченый зонд и олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ЗАО “Вектор-Бест”. Для дизайна праймеров и зонда к консервативному участку мтДНК, использовали все полные последовательности мтДНК выбранных видов иксодовых клещей (см. Результаты и обсуждение), доступные в GenBank. Дизайн праймеров и зондов выполняли с помощью пакета программ, доступного online на [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com), выравнивание осуществляли с помощью программы “MEGA 4.0” [5].

Мастер микс” (ЗАО “Вектор-Бест”), включающий лиофильно высушенные готовые реакционные смеси в микроцентрифужных пробирках объемом 0,2 мл. В пробирки вносили по 25 мкл раствора для элюции НК, содержащего прямой и обратный праймеры до конечной концентрации 25 пмоль, а также флуоресцентно меченый зонд до конечной концентрации 10 пмоль. К реакционной смеси добавляли 25 мкл раствора НК, выделенных из клеща с помощью набора «РеалБест Экстракция 100». ПЦР и детекцию результатов амплификации в реальном времени проводили на термоциклере CFX96. Температурный профиль реакции: прогрев 1 мин – 94°С, далее 50 раундов: 10 секунд – 94°С, 20 секунд – 60°С.

## Результаты и обсуждение

**Разработка и валидация системы детекции мтДНК иксодовых клещей.** Применение ДНК клеща в качестве эндогенного контроля предполагает использование в качестве аналитического сигнала значения порогового цикла (Ct), вычисленного для каждого индивидуально образца. Отклонение этого значения от некоторой ожидаемой величины может эффективно учитываться при подтверждении достоверности анализа, если оно вызвано именно погрешностями анализа, а не иными факторами (эффективность ПЦР, зависимость сигнала от варианта нуклеотидной последовательности мишени и т.п.).

На основании литературных данных нами был составлен список наиболее эпидемиологически значимых видов клещей, встречающихся на территории России, и выбраны 10 основных видов клещей, нападающих на человека и домашних животных: *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. pavlovskiyi*, *D. reticulatus*, *D. nuttali*, *D. silvarum*, *D. marginatus*, *H. marinatum*, *H. concinna* и *R. sanguineus*. На основании анализа нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank, был выбран фрагмент гена 16S рРНК, позволяющий дифференцировать иксодовых клещей от аргасовых клещей и других членистоногих, и подобраны праймеры, зонд и условия амплификации. За счет оптимизации состава реакционной смеси и условий амплификации была достигнута наработка одного специфического ампликона, линейность в широком диапазоне и близкая к 100% эффективность амплификации. Для оценки линейного диапазона измерения мтДНК клещей был использован контрольный стандартный образец на основе клонированного фрагмента мтДНК *I. persulcatus* размером 327 п.н., из которого были приготовлены 5 восьмикратных разведений в ТЕ-буферном растворе. Зависимость значения Ct от логарифма концентрации ДНК в исследуемых пробах была линейной с эффективностью 98,4% и коэффициентом вариации от 3,4% до 4,4% в диапазоне значений Ct от 19,5 до 33,1 (что примерно соответствует количествам от 105 до 20 копий на пробирку). Амплификация на мтДНК всех проанализированных видов клещей также происходила с эффективностью,

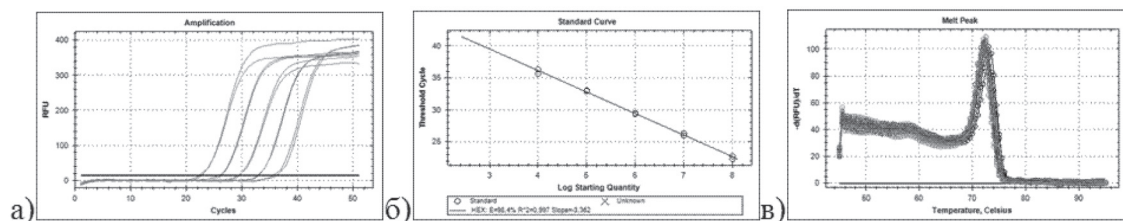


Рис. 1. а) кривые накопления флуоресценции при амплификации клонированного фрагмента мтДНК *I. persulcatus* в последовательных 8 кратных разведениях. б) соответствующая калибровочная кривая (lg x0, ct). в) Анализ кривой плавления продукта амплификации мтДНК разных видов клещей в присутствии 1:2000 SYTO13 после амплификации с праймерами IxF1 и IxR2.

Выявление мтДНК клещей. Для выявления фрагмента мтДНК клещей использовали набор “РеалБест

близкой к 100% в указанном диапазоне значений Ct (не ниже 96,8%) (рис. 1).

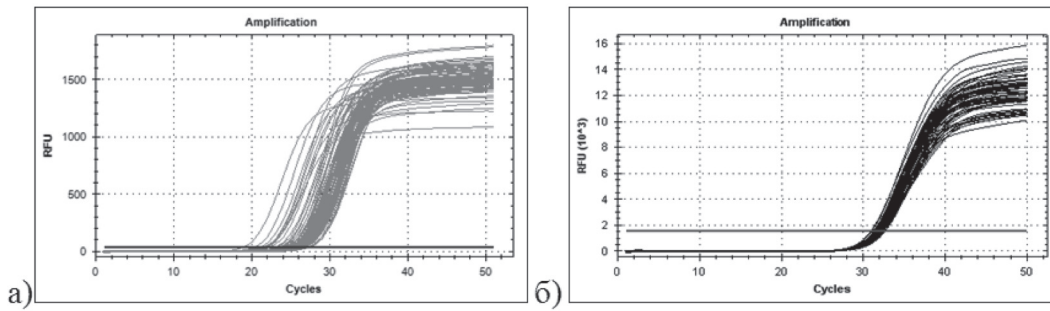


Рис. 2. а) кривые накопления флуоресценции при амплификации фрагмента мтДНК *I. persulcatus* в суспензиях 48 индивидуальных клещей *I. persulcatus* (самцы и самки); б) кривые накопления флуоресценции при амплификации ВКО, полученные при анализе той же выборки суспензий.

**Вариации значений Ct при анализе индивидуальных клещей и их пулов.** Для оценки различий значений Ct при выявлении фрагмента мтДНК мы проанализировали 240 индивидуальных не напитавшихся имаго клещей сопоставимых размеров. Выделение проводилось ручным методом с гомогенизацией по методу 1. Значения Ct варьировали от 16,2 до 24,2, при этом коэффициент вариации значения Ct ВКО был невысок (2,3%). (рис. 2а, 2б).

Существенные различия между значениями Ct индивидуальных клещей затрудняют использование результатов их анализа в качестве контрольных точек при сравнении эффективности разных методик пробоподготовки. Нами был проведен анализ амплификации мтДНК из пулов близких по размерам не напитавшихся имаго клещей (по 4 пула из 10, 7 и 3 клещей). Результаты выявления мтДНК между пулами из 10 клещей различались не существенно ( $\Delta Ct \leq 1,2$ ). С использованием разработанной методики (контрольная точка для оценки эффективности метода – значение Ct мтДНК для пула из 10 клещей) нами были оптимизированы метод 2 и метод 3 гомогенизации клещей и отброшены их неэффективные варианты.

**Возможность отслеживать ошибки пробоподготовки.** Аналитическим сигналом, по которому можно судить об успешности или не успешности экстракции НК из клеща, может являться значение Ct амплификации мтДНК этого клеща. Но наблюдаемые различия значений Ct при детекции фрагмента мтДНК могут быть вызваны разными причинами:

- влиянием на эффективность амплификации различий в последовательности ДНК-мишени;
- влиянием на эффективность амплификации ингибиторов полимеразных реакций, содержащихся в пробе;
- разным количеством попавшего в реакционную смесь нуклеотидного материала (недеградированный устак мишени).

Исходя из консервативности выбранных мишеней, наблюдаемые различия в значениях Ct в большинстве случаев должны быть связаны не с генетическими различиями в мишени, а с неэффективной экстракцией и могут быть следствием попадания в пробу ингибиторов либо потерями нуклеотидного материала.

Для проверки возможного влияния ингибиторов ОТ и ПЦР клещевого материала на результат амплификации была оценена эффективность амплификации мтДНК и ВКО в 12 индивидуальных клещах *I. persulcatus* и трех заметно более крупных *D. reticulatus*, а также в четырех препаратах НК из пулов по 10 не напитавшихся имаго самок *I. persulcatus* (3 последовательных 10 кратных разведения), а также не напитавшихся имаго клещей, к которым добавляли 5 или 10 мкл цельной крови человека (для моделирования возможных искажений анализа, связанных с анализом напитавшихся клещей). В случае содержания существенного количества ингибиторов, влияющих на эффективность амплификации в исходных препаратах, при их разведении наблюдалось бы заметное нарушение линейности, связанное с разбавлением ингибито-

ров. Однако такого эффекта ни в одном случае не было выявлено. Нельзя исключить возможность ингибирования реакции в отдельных случаях [4,6], но в этом случае погрешность анализа может быть выявлена при помощи ВКО.

Для выявления вклада человеческого фактора в эффективность анализа была использована “слепая” выборка клещей в 96 особей, из которых часть была заведомо инфицирована ВКЭ. Выделение НК из клещей выполняли независимо с использованием одних и тех же реактивов четыре лаборанта с разным опытом работы. Полученные препараты НК анализировали, определяя значения Ct РНК ВКЭ, клещевой мтДНК и ВКО. Средние значения Ct для РНК ВКЭ и клещевой мтДНК существенно отличались между лаборантами, в то время как Ct ВКО существенно не менялся (табл. 1).

Таблица 1  
Различия результатов анализа мтДНК клещей и РНК ВКЭ, выполненного разными лаборантами. Анализировались выборки по 24 клеща

Лаборант	Ct ВКО (ср.)	Ct мтДНК клещей (ср.)	Ct РНК ВКЭ (ср. для положительных образцов)
Опытный, №1	29,1	18,4	21,2
Опытный, №2	28,5	18,9	22,3
Опытный, №3	29,9	19,2	24,6
Неопытный	30,2	21,2	26,1

Таким образом, применение эндогенного контроля выявило серьезнейший вклад человеческого фактора в конечную эффективность анализа НК в клещах. Для исключения этого фактора уместно использование электромеханических гомогенизаторов. Нами было проведено сравнение качества выделения ДНК ручным способом (метод 2) и с применением гомогенизатора MagNA Lyser и набора “MagNa Lyser Green Beads”. Сравнительный анализ автоматического измельчения и ручной методики показал преимущество использования MagNA Lyser. При ручном измельчении отмечено менее эффективное выделение клещевой мтДНК и большая вариация значений Ct по сравнению с электромеханическим измельчением. Эффективность выявления ВКО при этом варьировала незначительно, что свидетельствует, в первую очередь, о неполном высвобождении НК из части клещей при их “ручном” измельчении (табл. 2).

Таблица 2  
Различия результатов анализа мтДНК клещей и ВКО, выполненного разными лаборантами и MagNA Lyser. Анализировались выборки по 12 самцов клещей

	Ct ВКО (ср.)	Ct ВКО, коэф. вариации, %	Ct мтДНК клещей (ср.)	Ct мтДНК клещей, коэф. вариации (%)
Лаборант №1	28,1	1,4	20,0	4,5
Лаборант №2	28,3	1,4	22,8	2,0
Лаборант №3	28,9	1,5	20,9	3,6
MagNA Lyser	28,4	1,4	19,8	1,9

Наблюдаемые различия значений Ct, вызванные разным количеством попавшего в реакционную смесь нуклеотидного материала, могут быть следствием не только ошибок анализа (деградация НК, недостаточная

гомогенизация), но и естественными различиями в размерах анализируемых клещей, и, соответственно, в количестве содержащихся в их составе НК. С использованием MagNA Lyser нами была выделена НК из 20 ненапитавшихся самок и 20 самцов *I. persulcatus*. Линейные размеры самок и самок отличались примерно в два раза. Полученные значения Ct мтДНК ожидаемо разделились на непересекающиеся группы, для самок значения Ct в среднем отличались от значений Ct для самцов на 1,8, вариация внутри групп была низкой (3,4% для самок и 1,6% для самцов). Следовательно, различия в значениях Ct индивидуальных клещей близкого размера (всегда заключающиеся в смещении в большую сторону от ожидаемых) в значительной степени обусловлены именно ошибками анализа.

Таким образом, нами показано, что при анализе клещей недостаточная квалификация исполнителя или неоптимальный протокол анализа могут приводить к снижению эффективности анализа и повышенному риску получения ложноотрицательного результата. Значительная доля ошибок при анализе клеща связана

с эффективностью его измельчения, что в особенности актуально для ручной гомогенизации, которая является "узким местом" всего анализа и наиболее подвержена вариациям эффективности, связанным с человеческим фактором. Без применения эндогенного контроля (в качестве которого предложена амплификация фрагментов ДНК самого клеща) такие ошибки в принципе не могут быть выявлены. Подобный контроль может также служить полезным инструментом для оптимизации протоколов выделения НК из клещей. Однако современная методологическая база для внедрения подобных эндогенных контролей в клинико-диагностическую практику недостаточна. Прежде всего, неочевидны критерии выбора порогового цикла для "отсечки" (*cut-off*) невалидных отрицательных результатов анализа. Поэтому на текущий момент при лабораторном анализе клещей для их надежного измельчения желательно отдавать предпочтение электромеханическим гомогенизаторам перед "ручными" методиками и уделять серьезное внимание обучению лаборантов, непосредственно выполняющих анализ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Halos L., Jamal T., Vial L., et al. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks // Vet. Res. – 2004. – Vol. 35 – P.709-713.
2. Hubbard M.J., Cann K.J., Wright D.J. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks // Exp. Appl. Acarol. – 1995. – Vol. 19. – P.473-478.
3. Hill C.A., Gutierrez J.A. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks // Med. Vet. Entomol. – 2003. – Vol.17. – P.224-227.
4. Mauel M.J., Carlton S.J., Mather T.N. Polymerase chain

reaction detection efficiency of the human granulocytic ehrlichiosis agent (Rickettsiaceae: Ehrlichieae) in ticks (Acari: Ixodidae) is dependent on the DNA extraction method // J. Med. Entomol. – 1999. – Vol. 36. – P.649-652.

5. Tamura K., Dudley J., Nei M., et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24. №8. P.1596-1599.

6. Schwartz I., Varde S., Nadelman R.B., et al. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1997. – Vol. 56. – P.339-342.

**Информация об авторах:** Тимофеев Денис Игоревич – к.б.н., 630128, г.Новосибирск, ул. Пасечная, 3, тел. (383) 227-68-24, e-mail: timofeev@vector-best.ru; Фоменко Наталья Владимировна – к.б.н., e-mail: nataliyaf@ngs.ru; Иванов Михаил Константинович – к.б.н., e-mail: ivanovmk@vector-best.ru

© КОВАЛЕВ С.Ю., МУХАЧЕВА Т.А., КОКОРЕВ В.С., БЕЛЯЕВА И.В. – 2012  
УДК 578.5

#### РЕФЕРЕНСНЫЙ ШТАММ СОФЬИН ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ПРОБЛЕМА ЕГО АУТЕНТИЧНОСТИ

Сергей Юрьевич Ковалев<sup>1</sup>, Татьяна Александровна Мухачева<sup>1</sup>,  
Валерий Серафимович Кокорев<sup>2</sup>, Ирина Вениаминовна Беляева<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Уральский федеральный университет, ректор – проф. В.А. Кокшаров; <sup>2</sup>Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций, директор – д.м.н., проф. Н.П. Глинских)

**Резюме.** В GenBank зарегистрированы несколько последовательностей генома или его фрагментов референсного штамма вируса клещевого энцефалита Софьин с существенными отличиями между собой. Мы секвенировали геном штамма Софьин из коллекции вирусов, а также ген E двух вакцинных штаммов. Филогенетическим анализом установлено, что последовательности из GenBank принадлежат трем независимым группам штаммов. Ретроспективный анализ показал аутентичность одной из них. Впервые нами была определена полная последовательность генома аутентичного штамма Софьин. Две другие группы, предположительно, появились в результате кросс-контаминации или лабораторной ошибки. Высокая вероятность контаминации требует введения нового стандарта работы вирусологических лабораторий с обязательной генетической идентификацией всех коллекционных штаммов.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, ретроспективный анализ, подлинность, коллекционный штамм, лабораторная ошибка.

#### TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS: REFERENCE STRAIN SOFJIN AND PROBLEM OF ITS AUTHENTICITY

S.Y. Kovalev<sup>1</sup>, T.A. Mukhacheva<sup>1</sup>, V.S. Kokorev<sup>2</sup>, I.V. Belyaeva<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Ural Federal University; <sup>2</sup>Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections)

**Summary.** GenBank has recorded several sequences associated with the reference TBEV Sofjin strain with significant differences between each other. We have sequenced the complete genome of the Sofjin strain from a virus collection and a gene E of the two vaccine Sofjin strains. According to the phylogenetic analysis, we concluded that the GenBank sequences belong to three independent groups of Sofjin strains. Retrospective analysis showed the authenticity of one of them. For the first time, we have determined a complete genome sequence of the authentic TBEV strain Sofjin. Two other groups of strains named Sofjin were probably the result of cross-contamination or laboratory error. The high probability of contamination

requires the introduction of a new standard for virological laboratories, with the obligatory genetic identification of all collection strains.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus, retrospective analysis, authenticity, collection strain, laboratory error.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) был открыт в 1937 году на Дальнем Востоке России [1]. Данный вирус относится роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и широко распространен в Евразии. Согласно современной классификации, ВКЭ подразделяется на три субтипа – Европейский (ВКЭ-Ев), Сибирский (ВКЭ-Сиб) и Дальневосточный (ВКЭ-Дв) [5]. Первой научной экспедицией, возглавляемой проф. Л.А. Зильбером, было выделено 30 штаммов ВКЭ, однако сохранилось только два из них: Софьин и Обор-4 [3]. Штамм Софьин, выделенный недалеко от оз. Ханка (Приморский край) из головного мозга молодой женщины, погибшей от очаговой формы КЭ [15], многократно пассирован на мышах и в культурах клеток, а также депонирован во многие вирусные коллекции мира. Кроме того, этот штамм на протяжении десятков лет является основой производства инактивированной вакцины КЭ на территории России. По этим причинам Софьин стал первым штаммом ВКЭ, чей геном был секвенирован [2,10]. Фрагменты его нуклеотидной последовательности размещены в GenBank под номерами X03870 и X07755 [2,11,14]. Спустя 13 лет геном этого штамма был повторно секвенирован группой японских ученых, но из-за существенных генетических различий штамм был назван Sofjin-НО AB062064 [7]. Наконец, в 2011 году еще одна полная геномная последовательность штамма Софьин была размещена в GenBank под названием Sofjin-Ru JN229223. Помимо последовательностей генома независимыми научными группами были определены нуклеотидные последовательности отдельных фрагментов. Сравнительный генетический анализ этих последовательностей между собой на уровне целого генома или его фрагментов обнаружил существенные различия, которые могут превышать таковые, наблюдаемые между отдельными штаммами ВКЭ в пределах субтипа. Таким образом, сложилась парадоксальная ситуация, при которой сразу несколько штаммов претендуют на роль референсного.

Цель работы. разобраться в возникшей проблеме, понять причины ее появления и установить подлинность штамма Софьин.

### Материалы и методы

**Штаммы вирусов.** В данном исследовании был взят следующий вирусологический материал: 1) штамм Софьин из вирусной коллекции Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (ЕНИИВИ), названный далее SofjinKSY. Этот штамм был получен в 1974 году из Всесоюзной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Ивановского (Москва). 2) штамм Софьин из инактивированной вакцины КЭ (номер партии С45-7 К3354, год выпуска – 1999) производства ФГУП НПО «Вирион» (Томск, Россия), названный Sofjin VT1999. 3) штамм Софьин из инактивированной вакцины КЭ (номер партии С705, год выпуска 2001) производства НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов (Москва), названный SofjinVM2001.

**Выделение РНК, обратная транскрипция, амплификация и секвенирова-**

**ние генома.** Вирусная РНК была выделена при помощи набора реагентов Рибо-преп (Интерлабсервис, Москва). Обратная транскрипция проводилась с помощью наборов Реверта (Интерлабсервис) и Mint RACE cDNA (Евроген, Москва), согласно протоколу производителя. Для амплификации полного генома SofjinKSY и гена E на основе множественного выравнивания геномных последовательностей ВКЭ-Дв было разработано 13 и 2 пары вырожденных праймеров (нуклеотидные последовательности доступны по запросу). Продукты амплификации были очищены с помощью набора DNA-sorb (Интерлабсервис) и секвенированы на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США). Последовательности полного генома штамма SofjinKSY и гена E вакцинных штаммов были депонированы в GenBank под следующими номерами: JF819648, JF819650 и JF81965.

**Филогенетический анализ.** Полная впервые определенная последовательность генома штамма Софьин (чья фрагменты представлены в GenBank под номерами X03870 и X07755) была взята из статьи и названа далее Sofjin-P. Выравнивание, филогенетический анализ и построение древ проводили с помощью программы Mega v.5.0.

### Результаты и обсуждение

Мы провели полногеномное секвенирование штамма Софьин из коллекции Екатеринбургского НИИ ви-

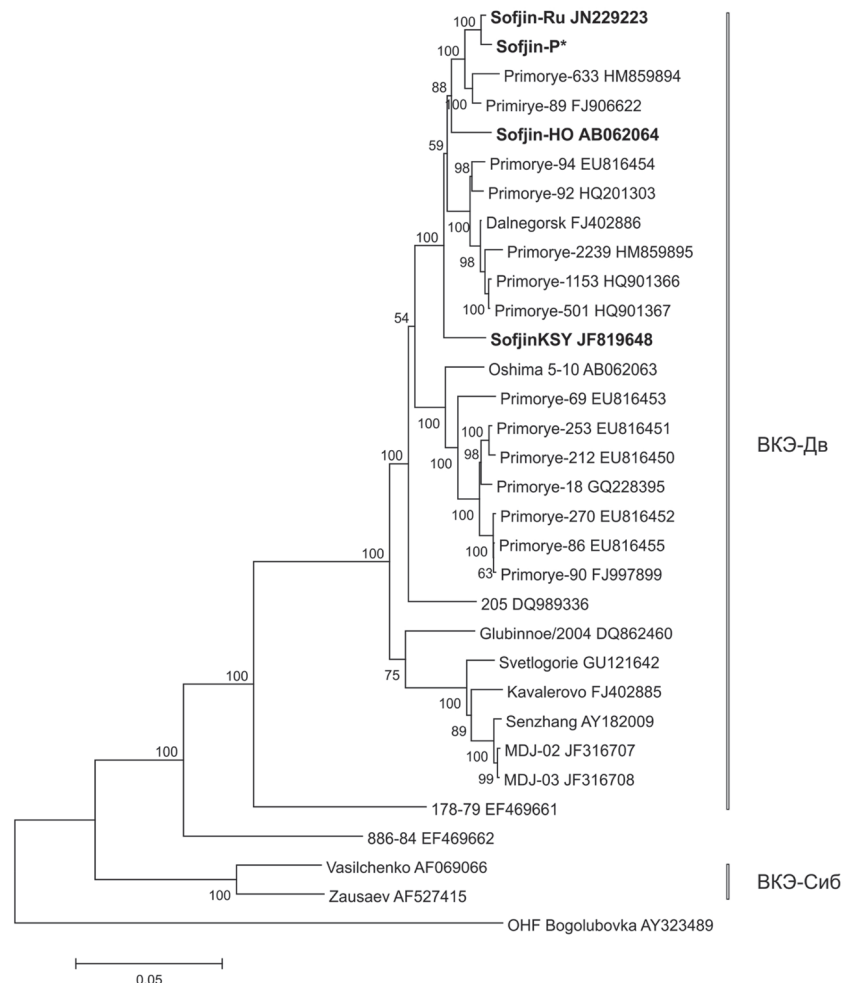


Рис. 1. Филогенетическое древо штаммов ВКЭ-Дв, построенное на основе нуклеотидной последовательности, кодирующей полипротеин (метод Maximum Likelihood).

русных инфекций (SofjinKSY). Геном штамма SofjinKSY состоит из 131 н.п. 5'-нетранслируемого региона (5'-НТР), 10,245 н.п. открытой рамки считывания (ОРС), содержащей 10 вирусных белок-кодирующих участков и 327 н.п. 3'-НТР.

Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей полипротеина штамма SofjinKSY со штаммами Sofjin-НО и Sofjin-Р выявило идентичность 97,2% (98,9% по а.о.) и 97,2% (98,3%), соответственно. Так как различия между штаммами Софжин сравнимы с таковыми между отдельными штаммами ВКЭ-Дв (рис. 1), мы пришли к заключению, что штамм SofjinKSY является уникальным и не родственен другим штаммам Софжин. В то же время, 99,5% (99,3%) идентичность последовательностей штаммов Sofjin-Р и Sofjin-Ru указывает на их общее происхождение, поэтому эти два штамма будут именоваться далее Sofjin-Р/Sofjin-Ru.

Филогенетический анализ (рис. 1) показал, что SofjinKSY, Sofjin-Р/Sofjin-Ru и Sofjin-НО являются неродственными штаммами ВКЭ-Дв. Филогенетические деревья, построенные для генов трех структурных и семи неструктурных белков, подтверждают вышесказанное (данные не приведены).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена Е штамма SofjinKSY и двух вакцинных штаммов с последовательностями ВКЭ-Дв, представленных в GenBank, обнаружил три филогенетически обособленные группы, включающие штаммы Софжин (рис. 2А). Штаммы SofjinKGG, SofjinKSY, SofjinVT1999 и SofjinVT2001 образуют первую группу штаммов Софжин, связанных общим происхождением. Вторая группа представлена только одним штаммом Sofjin-НО. Наконец, третья группа включает штамм Sofjin-Р, его производный штамм – химера ВКЭ/Денге вирус FJ828987 (в дальнейшем Sofjin-Р-Chimera) и Sofjin-Ru. Сравнительный анализ последовательностей гена Е штаммов, принадлежащих различным группам, показал значительные генетические различия (рис. 2А, Б).

В анализ фрагмента гена NS5 (1026 н.п.), помимо вышеназванных штаммов, был включен Sofjin AF013399 (в дальнейшем SofjinCDC), хранящийся в коллекции арбовирусов Центра по контролю и предупреждению заболеваний (США). SofjinCDC был идентичен на 99,9% штамму SofjinKSY, что говорит о его принадлежности первой группе штаммов Софжин. Идентичность фрагмента гена NS5 штаммов Sofjin-НО, Sofjin-Р и SofjinKSY (SofjinCDC) составила около 97,9%.

Таким образом, на основе сравнительного анализа различных участков генома мы приходим к однозначному выводу о том, что последовательности штамма Софжин, размещенные в GenBank, принадлежат трем самостоятельным группам штаммов ВКЭ-Дв. Столь выраженная генетическая дивергенция могла возникнуть вследствие двух причин. Первая – они происходят от одного штамма Софжин, выделенного в 1937 году, а их генетические различия вызваны микроэволюционными процессами вследствие многочисленных пассажей. Вторая причина – они не имеют общего происхождения, а являются самостоятельными штаммами, ошибочно отнесенными к штамму Софжин вследствие кросс-контаминации или в результате лабораторной ошибки.

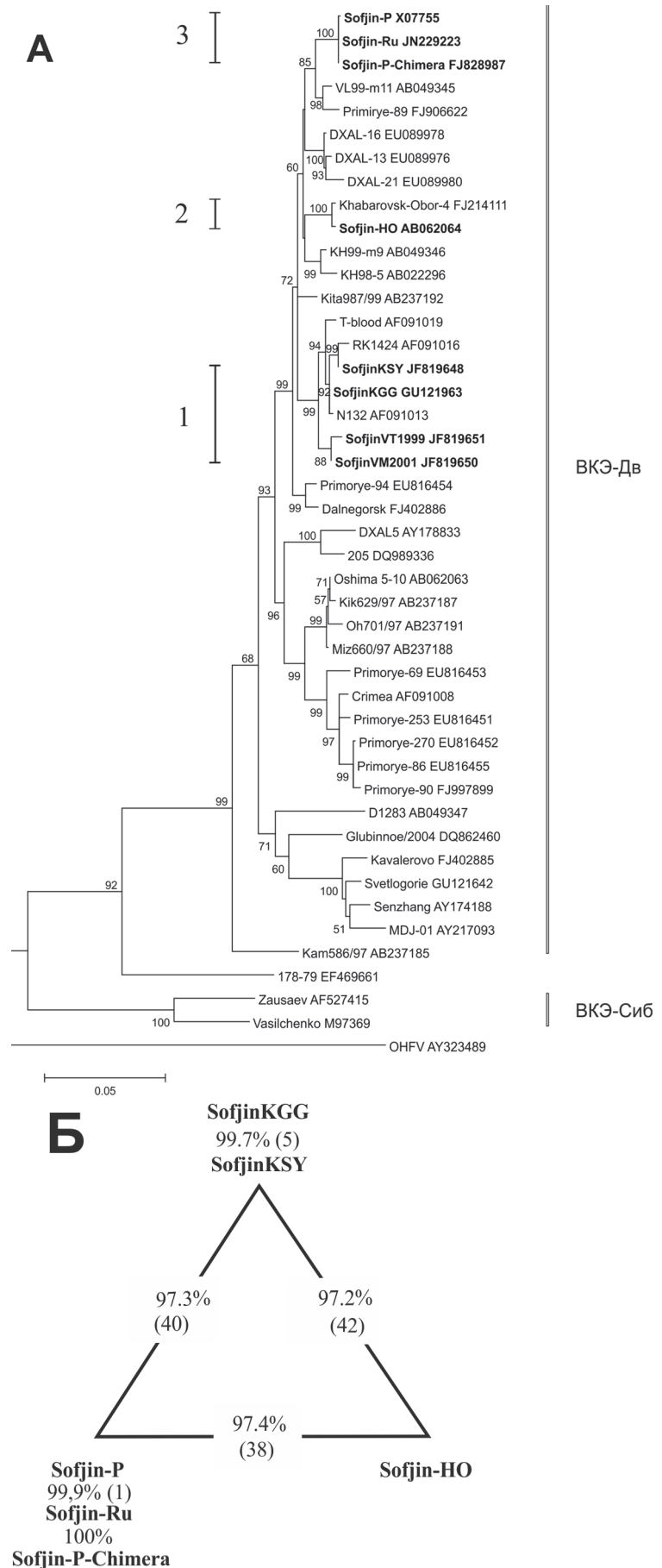


Рис. 2. Филогенетический анализ гена Е штаммов ВКЭ-Дв. А. Филогенетическое древо (метод Maximum Likelihood). Б. Попарные значения идентичности последовательностей штаммов Софжин в процентах, в скобках – число нуклеотидных замен.

Для проверки первого предположения мы исследовали последовательности гена E штаммов SofjinVT1999 и Sofjin VM2001 из вакцины КЭ. Несмотря на высокую генетическую вариабельность вследствие многочисленных пассажей (14 и 19 замен по сравнению со штаммом SofjinKGG), вакцинные штаммы сохраняют равноудаленность по числу нуклеотидных замен от штаммов Sofjin-P/Sofjin-Ru и Sofjin-НО, как и исходный штамм SofjinKGG. Таким образом, длительное пассирование не приводит к значительным изменениям филогенетических отношений между штаммами ВКЭ.

Согласно второй гипотезе, наиболее вероятным объяснением является контаминация аутентичного штамма Софжин посторонним штаммом ВКЭ-Дв с последующим вытеснением первого (кросс-контаминация). Кроме того, лабораторная ошибка, т.е. случайная подмена одного штамма другим, не может быть исключена. Подобные случаи в отношении вирусов комплекса клещевого энцефалита описаны в литературе.

Естественно, возникает важный вопрос о подлинности одного из трех штаммов Софжин, выделенного в 1937 году.

К сожалению, нам не удалось проследить начальный этап истории штамма Sofjin-НО. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности гена E показывает, что штамм Sofjin-НО идентичен на 99,7% штамму Khabarovsk-Obor-4 FJ214111 (рис. 2А). Khabarovsk-Obor-4 (Обор-4) был выделен экспедицией Зильбера в 1937 году, долгое время наряду со штаммом Софжин имел статус прототипного и активно использовался в вирусологических исследованиях и производстве вакцины. Таким образом, штамм Sofjin-НО является штаммом Khabarovsk-Obor-4, ошибочно отнесенным к штамму Софжин.

Sofjin-P является первым из всех штаммов ВКЭ, фрагмент генома которого был определен. Важно отметить, что он был взят для секвенирования как лабораторный, а не коллекционный штамм, т.е. не был получен по официальному запросу из коллекции вирусов. Фрагмент генома ВКЭ штамма Sofjin-P-Chimera почти полностью идентичен Sofjin-P (рис. 2Б). Принимая во

внимание филогенетическую близость (рис. 1), одно и то же место хранения и секвенирования генома штаммов Sofjin-P и Sofjin-Ru, мы сделали заключение, что Sofjin-Ru является штаммом Sofjin-P, чей геном был ресеквенирован через 25 лет.

Особого внимания заслуживает первая группа штаммов Софжин. Прежде всего, важно отметить надежность источников получения этих штаммов перед секвенированием. Так, штамм SofjinCDC был передан в коллекцию арбовирусов CDC в 1985 году участниками первой экспедиции на Дальний Восток М.П. Чумаковым и Е.Н. Левкович. Штамм SofjinKSY был получен из Всесоюзной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Ивановского в 1974 году по официальному запросу Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций. И, наконец, штамм SofjinKGG был получен в 70-е годы из коллекции вирусов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. Все эти штаммы имели минимальное количество пассажей и до секвенирования хранились в жидком азоте или в лиофилизированном виде. Кроме того, вакцинные штаммы от двух независимых производителей вакцин КЭ также принадлежат этой группе штаммов. Важно отметить, что нуклеотидные последовательности фрагментов генома этих штаммов были получены тремя независимыми научными группами. Подводя итог вышесказанному, мы пришли к заключению, что группа штаммов SofjinCDC, SofjinKGG и SofjinKSY, включая два вакцинных штамма, ведет свое происхождение от подлинного (аутентичного) штамма Софжин. Таким образом, полная нуклеотидная последовательность генома штамма Софжин, выделенного первой Дальневосточной экспедицией в 1937 году, только сейчас стала известна.

Настоящей работой поднимается общая проблема, связанная с необходимостью обязательного подтверждения молекулярно-генетическими методами соответствия лабораторных штаммов аутентичным коллекционным образцам.

Данная работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (№ 10-04-96062).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эндемический клещевой энцефалит // Арх. биол. наук. – 1939. – Т. 56. Вып. 2. – С.9-37.
2. Плетнев А.Г., Ямищиков В.Ф., Блинов В.М. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита // Биорган. химия. – 1989. – Т. 15. №11. – С.1504-1521.
3. Погодина В.В., Карань С.В., Колясникова Л.С. и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопр. вирусологии. – 2007. – Т. 5. – С.16-21.
4. Clarke D.H. Further Studies on Antigenic Relationships among the Viruses of the Group B Tick-Borne Complex // Bull. World Health Organ. – 1964. – Vol. 31. – P.45-56.
5. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., et al. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80 (Pt 1). – P.179-185.
6. Gorev N.E., Smorodincev A.A. The serological differentiation of viruses in the tick-borne encephalitis subgroup by the gel-diffusion method // Bull. World Health Organ. – 1968. – Vol. 38. №3. – P.389-399.
7. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80 (Pt 12). – P.3127-3135.
8. Mandl C.W., Iacono-Connors L., Wallner G., et al. Sequence of the genes encoding the structural proteins of the low-virulence

tick-borne flaviviruses Langat TP21 and Yelantsev // Virology. – 1991. – Vol. 185. №2. – P.891-895.

9. Mehla R., Kumar S.R., Yadav P., et al. Recent ancestry of Kyasanur Forest disease virus // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15. №9. – P.1431-1437.

10. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polypeptide of tick-borne encephalitis virus // Virology. – 1990. – Vol. 174. №1. – P.250-263.

11. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Tick-borne encephalitis virus genome. The nucleotide sequence coding for virion structural proteins // FEBS Lett. – 1986. – Vol. 200. №2. – P.317-321.

12. Ruzek D., Sterba J., Kopecky J., et al. The supposedly attenuated hy-HK variant of highly virulent Hypr strain of tick-borne encephalitis virus is obviously a strain of Langat virus // Acta Virol. – 2006. – Vol. 50. №4. – P.277-278.

13. Tamura K., Dudley J., Nei M., et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24. №8. – P.1596-1599.

14. Yamshchikov V.F., Pletnev A.G. Nucleotide sequence of the genome region encoding the structural proteins and the NS1 protein of the tick borne encephalitis virus // Nucleic Acids Res. – 1988. – Vol. 16. №15. – P.7750.

15. Chumakov M.P., Levkovich E.N. Russian Spring Summer Encephalitis. The International Catalog of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates 1985; <http://www.cdc.gov/arbocat/catalog-listing.asp?VirusID=404&SI=1>.

**Информация об авторах:** 620000 Екатеринбург, пр-т Ленина, 51, УрФУ, Ковалев Сергей Юрьевич – доцент, к.б.н., тел 8 (343) 261-68-26, e-mail: Sergey.Kovalev@usu.ru; Мухачева Татьяна Александровна – м.н.с.; Беляева Ирина Вениаминовна – с.н.с., к.б.н.; Кокорев Валерий Серафимович – заведующий лабораторией, профессор, д.м.н.: 620030, Екатеринбург, ул. Летняя 23, ЕНИИ ВИ.

## ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ БОРРЕЛИОЗОМ И КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ В НОВОСИБИРСКОМ НАУЧНОМ ЦЕНТРЕ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН В 2009-2011 ГГ.

Вячеслав Юрьевич Боргояков<sup>1</sup>, Анна Андреевна Васькова<sup>2</sup>, Елена Дмитриевна Чикова<sup>1</sup>, Наталья Владимировна Фоменко<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, директор – акад. РАН В.В. Власов, лаборатория генной диагностики, зав. – к.м.н. Е.Д. Чикова, лаборатория молекулярной иммунологии и микробиологии, заведующая – д.б.н. Н.В. Тикунова; <sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, ректор – д.х.н., проф. В.А. Собянин; <sup>3</sup>ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов, лаборатория ПЦР, зав. – к.б.н. М.К. Иванов)

**Резюме.** В сезоны активности таежных клещей апрель-сентябрь 2009-2011 г.г. клещи, снятые с людей в Новосибирском научном центре СО РАН, проанализированы на наличие боррелий и вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). В данном районе было выделено 5 локаций с разным типом растительности. Проанализировано распределение положительных образцов клещей по данным районам в течение всего сезона активности клещей. В результате проделанной работы выяснено, что пик выявления боррелий и ВКЭ приходится на май-июнь каждого сезона. Установлено, что антропогенное воздействие на местность существенно изменяет зараженность клещей ВКЭ и разными видами боррелий.

**Ключевые слова:** боррелии, Новосибирский научный центр СО РАН, клещи.

## VARIATION IN INFECTION OF IXODES TICKS BY BORRELIOSIS AND TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN NSC SB RAS DURING 2009-2011

V.Yu. Borgoyakov<sup>1</sup>, A.A. Vaskova<sup>2</sup>, E.D. Chikova<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS; <sup>2</sup>Novosibirsk State University, <sup>3</sup>JSC "VECTOR-BEST")

**Summary.** In April-September, 2009-2011 the ticks, removed from people in the Novosibirsk Scientific Center of SB RAS were analyzed for the presence of Borrelia and tick-borne encephalitis virus (TBEV). This area was allocated to five locations with different types of vegetation. We analyzed the distribution of positive samples in these areas during the tick season. As a result of this work it has been found that the peak detection of Borrelia and TBEV is in May and June of each season. It was found that the human impact on the area significantly alters tick TBEV infection and tick contamination of various Borrelia species.

**Key words:** borrelia, NSC SB RAS, ticks.

Проблема заболеваний, переносимых иксодовыми клещами, в последние годы приобретает все большее значение для многих регионов России. На территории Новосибирской области основное эпидемиологическое значение среди природно-очаговых инфекций, переносимых клещами, имеют клещевой энцефалит и иксодовый клещевой боррелиоз [2]. Мониторинг численности возбудителей данных инфекций в течение клещевых сезонов нескольких лет может позволить выявить некоторые закономерности их динамики и выработать практические рекомендации для населения, врачей и производителей диагностических наборов.

Цель работы: Исследование динамики распределения боррелий и ВКЭ в районе ННЦ СО РАН в течение 2009-2011 гг.

### Материалы и методы

Таежные клещи, снятые с людей, собраны в пункте вакцинопрофилактики Автономной некоммерческой организации «Центр новых медицинских технологий в Академгородке» (АНО «ЦНМТ в Академгородке») в 2009-2011 гг. За 2009 год было исследовано 747 образцов клещей, за 2010 год – 440 образцов и за 2011 год – 581 образец.

При анализе географического распределения мест, в которых произошло присасывание таежного клеща, выявлено, что большинство клещей были сняты с людей в районе ННЦ СО РАН и его окрестностей. В данном районе были выделены следующие территориальные единицы (ТЕ): 1 – ЦСБС СО РАН, пос. Новый и пос. Геологов и их окрестности, 2 – Верхняя зона Академгородка и микрорайон «Щ», 3 – Нижняя Ельцовка и ее окрестности, 4 – пос. Ключи и ближайшие дачи и леса, 5 – нетронутые территории леса между населенными пунктами. Территориальная единица 1 представлена мелколи-

ственными осиново-березовыми лесами и смешанными березово-сосновыми лесами, 2 – лесом, кустами и газонами жилой зоны, а единицы 3 и 4 – мелколиственными осиново-березовыми лесами, полями и перелесками, 5 – смешанными березово-сосновыми лесами (табл. 1).

Выделение суммарной ДНК от клещей проведено с применением коммерческих наборов «Рибо-Преп» (AmpliSens, Москва) и «Экстракция 100» (Вектор-Бест, Новосибирск).

Выявление ДНК боррелий и РНК ВКЭ проведено с применением коммерческих тест-систем «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi* sensu lato-FL», «АмплиСенс® TBE-FL», «РеалБест РНК ВКЭ» и «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s. l.». Учет результатов проводили по наличию флуоресцентного сигнала на анализаторах фирмы Corbett Research «Rotor-Gene 3000» и фирмы Biorad «CFX-96» с использованием наборов фирмы AmpliSens и Вектор-Бест соответственно.

Для проверки достоверности полученных данных был использован критерий Стьюдента для больших выборок образцов (более 50 образцов) и критерием Фишера – для маленьких (менее 50 образцов). Также была посчитана ошибка среднеквадратического отклонения (Mр) для всех данных, приведенных в таблице [5].

### Результаты и обсуждение

В Лаборатории генной диагностики на базе АНО «ЦНМТ в Академгородке», проведено широкомасштабное исследование клещей снятых с людей, обратившихся за помощью в пункт вакцинопрофилактики АНО «ЦНМТ в Академгородке» в 2009-2011 г.г. Основная часть людей, обратившихся за помощью, пострадала от присасывания таежных клещей на территории ННЦ СО РАН. Методом ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени проанализировано 1769 клещей.

Распределение процента положительных образцов клещей в течение клещевых сезонов 2009-2011 г.г. по территориальным единицам ННЦ СО РАН

Год	Зона	Возбудитель (в %±Мр)					
		<i>B. garinii</i> (B.g)	<i>B. afzelii</i> (B.a)	<i>B. miyamotoi</i> (B.m)	B.g+B.m	B.g+B.a	ВКЭ
2009	1	25,8±4,5	2,1±1,5	2,1±1,5	1,3±1,2	0,8±0,9	9,6±3
	2	30,8±3,1	4,1±1,3	1,9±0,9	0,8±0,6	0	9,1±1,9
	3	20,8±5,6	1,9±1,9	2,9±2,3	0	0,4±0,9	11,3±4,3
	4	17,5±2,6	2,3±1	1,5±0,8	0	0	11,1±2,1
	5	25,9±3,4	4,8±1,7	0	0	0	6,0±1,8
	Все	24,5±1,6	2,8±0,6	1,6±0,5	1,2±0,4	0,1±0,1	10,0±1,1
2010	1	29,6±4,6	1,0±1,0	3,1±1,7	1,0±1,0	1,0±1,0	3,1±1,7
	2	22,5±3,8	0,8±0,8	1,6±1,2	0,8±0,8	0	4,2±1,8
	3	13,8±4,3	3,1±2,1	1,5±1,5	1,5±1,5	0	4,6±2,6
	4	30,3±8,0	0	0	6,0±4,1	3,0±3,0	15,2±6,3
	5	11,4±2,9	0,8±0,8	2,4±1,4	0	0	5,7±2,1
	Все	20,0±1,9	1,1±0,5	1,6±0,6	1,6±0,6	0,5±0,3	6,1±1,1
2011	1	25,1±3,1	0,5±0,5	2,1±1,0	1,1±0,8	2,1±1,0	2,1±1,0
	2	22±3,5	0	4,3±1,7	0	1,4±1,0	2,1±1,2
	3	20,9±5,0	1,5±1,5	4,5±2,5	1,5±1,5	0	3±2,1
	4	21,8±5,6	5,5±3,1	7,3±3,5	0	0	0
	5	19,7±3,5	0	1,6±1,1	0,8±0,8	0	0,8±0,8
	Все	22,4±1,7	1,6±0,5	4,0±0,8	0,9±0,4	1,0±0,4	2,1±0,6
2009-2010		22,7±1,0	2±0,3	2,4±0,4	1,2±0,3	0,5±0,2	6,4±0,6

За все время исследования в образцах клещей, снятых с людей, достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) детектирована *B. garinii* (22,7%). Выявление *B. afzelii* составляет только 2% образцов, что сопоставимо с выявлением *B. miyamotoi* (2,4%). Одновременное присутствие *B. garinii* и *B. miyamotoi* обнаружено в 1,1% образцов, а *B. garinii* и *B. afzelii* – в 0,5% образцов (табл. 1). *B. afzelii* и *B. miyamotoi* на территории ННЦ СО РАН совместно не обнаружены. Зараженность клещей ВКЭ составила 6,4%. Из них 2,2% составили клещи, зараженные одновременно ВКЭ и боррелиями. Наиболее часто с ВКЭ обнаруживается *B. garinii* (1,7%) ( $p < 0,01$ ), вид *B. miyamotoi* одновременно с ВКЭ не обнаружен. В трех случаях (0,2%) вместе с ВКЭ в клеще обнаружены два вида боррелий.

Проанализировано распределение зараженности клещей ВКЭ и боррелиями в течение эпидемиологических сезонов 2009-2011 г.г. по территориальным единицам ННЦ СО РАН с различным типом растительности (табл. 1). Выяснено, что максимум зараженности клещей совпадает с пиком клещевой активности, приходящийся на начало мая – конец июня. Это может объясняться тем, что с увеличением численности переносчиков, пропорционально увеличивается их зараженность [4]. В этой связи в данный период времени необходимо усиленная профилактика нападения клещей. Мероприятия по обработке местности акарицидными средствами рекомендуется проводить до начала клещевого сезона, в апреле или начале мая. Отмечается спад числа клещей, зараженных ВКЭ, на территории ННЦ СО РАН, так в 2009 году их зараженность составила 10%, в 2010 – 6,1%, а в 2011 – 2,1%. Это может объясняться межгодовыми колебаниями вирусофорности клещей [2]. Наибольшая зараженность клещей энцефалитом стабильно наблюдается в территориальных единицах 3 и 4. Скорее всего, это связано с типом растительности на этих участках. Преобладающий тип растительности для них – мелколиственные осиново-березовые леса, поля и перелески, в основном не подвергшиеся антропогенному воздействию.

За три года наблюдений не отмечено существенных

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Голубкова А.А., Дорогина Ю.В., Шашина Н.И. Рационализация мероприятий по неспецифической профилактике клещевых инфекций // Журнал инфекционной патологии. – 2010. – Т. 17. №3. – С.47-49.
2. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит: Рук-во для врачей. – Новосибирск: Гос. мед. акад. МЗ РФ, 2001. – 360 с.
3. Коренберг Э.И. Современные черты природной очаго-

Таблица 1

изменений в зараженности клещей боррелиями. Однако можно сказать, что в жилых зонах с лесом, кустами и газонами зараженность боррелиями достаточно высока во время всего сезона, в то время как в дачных или нежилых зонах с мелколиственными осиново-березовыми лесами, смешанными березово-сосновыми лесами, полями и перелесками зараженность боррелиями постепенно падает после пика активности клещей. Во всех территориальных единицах доминирующим видом является *B. garinii*, зараженность клещами данным видом колеблется из года в год. Наиболее заражены данным видом боррелий клещи, снятые с людей в местности, наиболее подвергшейся антропогенному воздействию (ТЕ 1 и 2). Зараженность клещей *B. miyamotoi* за три года исследований значительно выросла в основном за счет моноинфекции клещей. Клещи, зараженные данным видом, равномерно распределены по всем ТЕ, вне зависимости от их антропогенного статуса. Зараженность клещей *B. afzelii* претерпевает сезонные колебания. Причем часто в одной ТЕ в разные года, данный вид представлен в виде моноинфекции или смешанной инфекции. Исключение составляет первая ТЕ – на ней этот вид во все года представлен и в виде моноинфекции, и в виде смешанной инфекции. Отдельное внимание следует уделить пятой ТЕ, состоящей из различных участков почти не подвергшегося влиянию людей леса. Зараженность клещей, напавших на людей в данной местности в целом меньше, чем в остальных территориальных единицах. Это наталкивает на мысль, что большее влияние на зараженность клещей имеет состояние местности, в которой они обитают. Влияние человека сказывается на представленности резервуарных хозяев боррелий и ВКЭ, в частности мелких грызунов [3]. В местностях, подвергшихся антропогенному воздействию, они размножаются активней, их численность растет, растет вероятность прокормления клеща на мелких грызунах, и, как следствие, увеличивается зараженность переносчиков [1].

Суммируя все выше сказанное, можно предположить, что один из очагов ИКБ Новосибирской области находится в окрестностях ННЦ СО РАН и по мере удаления от него число зараженных клещей постепенно снижается. Особенность данного очага – в существенном преобладании вида *B. garinii* над другими видами боррелий и довольно большом проценте клещей, зараженных *B. miyamotoi*. Также в данной местности высока вероятность зараженности одного клеща двумя видами боррелий или боррелиями и ВКЭ, что следует учитывать при экстренной профилактике клещевых инфекций.

при экстренной профилактике клещевых инфекций.

ности клещевого энцефалита: новые или хорошо забытые? // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2008. – №3. – С.3-8.

4. Павловский Е.Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. – М.; Л., 1964. – 211 с.

5. Плохинский Н.А. Биометрия. – Новосибирск, 1961. – 364 с.



**Информация об авторах:** Боргояков Вячеслав Юрьевич – аспирант, 630190, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, лаборатория генной диагностики, тел. (383) 3333807, e-mail: ternsu@gmail.com; Васькова Анна Андреевна – студент; Чикова Елена Дмитриевна – заведующая лабораторией, к.м.н.; Фоменко Наталия Владимировна – н.с., к.б.н.

© САМАРДЖИЧ С., ПАРЛИЧ М., СТЕВАНОВИЧ Я., САМАРДЖИЧ В., МИХАЙЛОВИЧ Б., МАРИНКОВИЧ Т. – 2012  
УДК: 616.9-036.21(470.638)

## ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ ГЕМОРРОГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ КРЫМ-КОНГО НА ТЕРРИТОРИИ КОСОВА

Светомир Самарджич<sup>1</sup>, Милан Парлич<sup>1</sup>, Ясмينا Стеванович<sup>1</sup>, Владимир Самарджич<sup>2</sup>, Бранко Михайлович<sup>1</sup>,  
Татьяна Маринкович<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Медицинский факультет, г.Приштина, местонахождение – Косовская Митровица;  
<sup>2</sup>Учреждение здравоохранения им. Доктора Драголюбa Вучича;<sup>3</sup>Высшая школа санитарии и  
здравоохранения «Висан»)

**Резюме.** В биотопе на территории Косова (Республика Сербия) в ходе исследований, проведенных Центром природных очагов инфекции, с 1995 года были зарегистрированы векторы, которые могли повлечь геморрагическую лихорадку. Врачи не были достаточно подготовлены на предмет возможного наличия заболеваний природных очагов инфекции, не было лабораторий, которые бы могли разрешить клинические сомнения о наличии заболевания. Болезнь обычно регистрируется в отдаленных, лесных, горных участках, что способствует запоздалому выявлению болезни, а наряду с этим несвоевременно оказываются меры по лечению и предупреждению населения. Цель данной работы заключается в том, чтобы на примере первого выявленного случая ГЛКК (первый случай) показать сложности, связанные с выявлением болезни, неправильным лечением больного, и последствиями данной ситуации. Применен метод Истории болезни (Case report). В селе Киево, которое находится на плато Дреница, заболела женщина (45 лет) после работы на ближайшей вишневой плантации. За ней ухаживали 18 медицинских работников в отделениях ОРЛ, заболеваний внутренних органов, инфекционном отделении и отделении гинекологии. Не были предприняты меры безопасности. Был сделан кюретаж, с неправильным диагнозом: беременность на ранних сроках – по прошествии двух дней больная умерла. Лечение вызвало негодование семьи, которая отказалась сотрудничать с эпидемиологической службой. За тот год заболело 46 человек, 16 из которых с летальным исходом, Le 34,78%. Установлено 6 механизмов заражения между людьми. Получены данные о массовых укусах заболевших клещами. В 100% случаях возбудителем был вид *Hyaloma plumbeum plumbeum*, в телах которых подтверждено наличие вируса. С тех пор болезнь эндемически проявляется на данной территории, с интервалом эпидемии порядка 6 лет. Ввиду военных событий, социальных обстоятельств, ситуации в здравоохранении и иных причин, масштабы существования ГЛКК до сих пор не установлены.

**Ключевые слова:** болезни природных очагов инфекции, геморрагическая лихорадка Крым-Конго, клещи рода *hyaloma*.

## INDEX CASE OF CONGO-CRIMEAN HAEMORRHAGIC FEVER IN KOSOVO – A CASE REPORT

S. Samardzic<sup>1</sup>, M. Parlic<sup>1</sup>, J. Stefanovic<sup>1</sup>, V. Samardzic<sup>2</sup>, B. Mihajlovic<sup>1</sup>, T. Marinkovic<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>School of Medicine University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Kosovo, Serbia; <sup>2</sup>Health Clinic “Dr Dragoljub Vucic” Belgrade, Serbia; <sup>3</sup>Medical Sanitary School of Applied Sciences “Visan” Belgrade, Serbia)

**Summary.** Center for natural foci research of Belgrade registered in 1995 the vectors, that could cause a hemorrhagic fever on the territory of Kosovo in Serbia. Prior to this finding, there was no education of physicians on the territory regarding the possible existence of natural foci of disease, and there were no laboratories that could clarify the clinical suspicion of disease. The disease is usually registered in a remote, forested, mountainous areas, where the disease is not recognized and confirmed on time, which also results in delayed treatment and prevention of disease. Here, we are presenting an index CCHF case on the territory of Kosovo and we are pointing out the difficulties in identifying disease, inadequate treatment of a patient, and the consequences, arising from this situation. In the village of Kiev, on a plateau known as the Drenica a 45 years old woman, worker at the plantation of cherry, showed CCHF symptoms. The patient was treated by 18 medical practitioners at ENT, internal diseases, infectious and gynecological departments. The precautions for medical staff have not been taken. Based on the wrong diagnosis of early pregnancy, patient was subjected to the curettage procedure. After 2 days the patient died. The treatment caused a revolt of relatives who refused further to cooperate with the epidemiological service. During that epidemic 46 people were infected. 16 patients died, Le 34,78%, and 6 inter-human ways of transmission of disease were determined. The data was obtained that people were bitten by ticks. The ticks, identified on the territory, were *Hyaloma plumbeum plumbeum* in 100% of the cases. In tested ticks the presence of viruses was confirmed. All analyses were performed at Institute Torlak, Belgrade and confirmed by Chumakov in Russia. Since then, the disease occurs endemically on the territory, with the interval of epidemic about 6 years. Because of the war, political, social and other reasons, situation with health care the scale of CCHF on the territory of Kosovo has not been determined yet.

**Key words:** natural focal diseases, Congo-Crimean hemorrhagic fever, ticks of the genus *hyaloma*.

Исследователи Центра природных очагов инфекции Республики Сербии (Белград) ранее уже подтвердили существование биотипов, в которых было возможно проявления болезней, связанных с природными очагами инфекции. При сотрудничестве с нашим учреждением был организован Сентинел контроль данной территории. В условиях удаленности территорий от крупных медицинских центров, плохо развитой службы здравоохранения, отсутствия специализированных

лабораторий, плохой подготовки врачей, политических противоречий, оказалось, что выявление этих болезней очень проблематично.

Цель работы: на примере впервые обнаруженного случая геморрагической лихорадки Крым-Конго (ГЛКК) указать на трудности, связанные с распознаванием болезни и определением диагноза, неправильным лечением больного, а также последствиями, в условиях неразвитой службы здравоохранения, отдаленности от

крупных медицинских центров.

Показателен случай П.И., женщины, 45 лет из села Киево. Она живет в крайне бедной семье с 7 детьми. Муж умер 5 месяцев тому назад. Семья в основном занимается сельским хозяйством, их доходы очень малы. Чтобы накормить семью, хозяйка с односельчанками собирает вишню на государственной плантации, чтобы сбором ягод заработать на жизнь семьи. Ввиду высокой температуры и влажности, женщины носят одежду с коротким рукавом. Во время работы их неоднократно кусают клещи. По окончании рабочего дня они помогают друг другу избавиться от паразитов. По прошествии 10 дней у П.И. внезапно поднялась температура, открылось обильное носовое кровотечение – ее отвозят в местную больницу, в отделение отоларингологии. Там ей, без защитного оборудования, производят тампонирующее носа. Но самочувствие больной не улучшилось, появилась сукровица в глазах, после чего ее направляют в отделение заболеваний внутренних органов. Очень быстро ее переводят, ввиду высокой температуры, в инфекционное отделение. Открылось вагинальное кровотечение, был приглашен гинеколог на осмотр, который установил беременность на третьем месяце, и больную перемещают в отделение гинекологии, где ей делают кюретаж. На следующий день больная умирает.

Врачи сообщают диагноз и историю болезни семье.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Obradović M: Doktorska disertacija, VMA, Beograd 1985.
2. Gligić A. I dr. Vojnosanitetski preglod: 34:5,1977.
3. Чумаков М.П. Новости Медицины. – М., 1974.

Семья негодует, особенно ввиду неправильно поставленного диагноза беременности.

Из Белграда приезжает команда из Центра природных очагов инфекций, ввиду подозрения на лихорадку, возникшую как результат сентинел-метода, но семья отказывается оказывать содействие и говорить с ними. В очень деликатной ситуации мы смогли наладить контакт с семьей и получили образцы крови женщин, работавших вместе с умершей на плантации. У умершей же была предварительно взята кровь в больнице. Лабораторное заключение было выполнено в Институте Торлак в Белграде (др. Ана Глигич), а позднее оно было подтверждено в Москве, у проф. Чумакова. Установлен диагностический высокий титр у умершей, иммунные ответы – у ее родственниц и в 4 случаях – незначительный титр у персонала, ухаживавшего за умершей.

Так началась эпидемия ГЛКК на территории Косова (Республика Сербия). За тот год было зарегистрировано 46 заражений, из которых 16 с летальным исходом, Le 34,78%. Зарегистрировано и 6 механизмов заражения между людьми. Болезнь приобрела характер эндемии, с годами эпидемии в 2001 и 2008 гг. Но ввиду военных событий, социальных обстоятельств, ситуации в здравоохранении и иных причин, масштабы проблемы ГЛКК до сих пор не были достаточно изучены.

4. Benenson A. Control of communicable diseases in man 16th edition. American public health association, 1995

5. Antonijević B. Zoonoze, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva 132-135 2001.

**Информация об авторах:** dr Svetomir Samardžić, Medicinski fakultet Priština, sedište Kosovska Mitrovica šef predmeta epidemiologije, Tel.+381 (0) 63 34 54 04, e-mail: Svetomir\_samardzic@yahoo.com.

© ЛЕПЕХИН А.В., ИЛЬИНСКИХ Е.Н., ЛУКАШОВА Л.В., ДОРОШЕНКО А.С., ЗАМЯТИНА Е.В. – 2012  
УДК 616:988.25/612.07.1:615.2.03

#### ИЗУЧЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЙОДАНТИПИРИНА ПРИ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ

Алексей Васильевич Лепехин<sup>1</sup>, Екатерина Николаевна Ильинских<sup>1</sup>, Лариса Владимировна Лукашова<sup>1</sup>, Александр Сергеевич Дорошенко<sup>2</sup>, Евгения Владимировна Замятина<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет, ректор – акад. РАМН, д.м.н., проф. В.В. Новицкий, кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии, зав. – д.м.н., проф. А.В. Лепехин; <sup>2</sup>ООО “Наука, Техника, Медицина”, Томск, начальник – генеральный директор В.Н. Худолей)

**Резюме.** Цель настоящей работы – изучение клинической эффективности индуктора интерферонотенеза йодантипирина (ИА) для экстренной профилактики клещевого энцефалита (КЭ) и его влияния на динамику спонтанной продукции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови. Все показатели были определены трехкратно до и после назначения препаратов в группе, получавшей ИА, и в группе, получавшей специфический иммуноглобулин (ИГ). Показана высокая профилактическая эффективность препарата ИА не только в первые 72 ч после присасывания клеща, но и в более поздние сроки. Кроме того, ИА, в отличие от ИГ, по-видимому, не приводит к подавлению продукции специфических IgG к вирусу КЭ. Через 2 недели после начала приема ИА в культурах клеток установлено существенное повышение уровней продукции интерферонов-α и -γ, интерлейкина-10, с последующим их снижением показателей до исходных значений.

**Ключевые слова:** йодантипирин, клещевой энцефалит, цитокины, экстренная профилактика.

#### ASSESSMENT OF EFFECTIVENESS OF IODANTIPYRINE PREVENTIVE USE IN TREATMENT OF RUSSIAN TICK-BORNE ENCEPHALITIS

A. V. Lepikhin<sup>1</sup>, E. N. Ilyinskikh<sup>1</sup>, L. V. Lukashova<sup>1</sup>, A. S. Doroshenko<sup>2</sup>, E. V. Zamyatina<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Siberian State Medical University, Tomsk; <sup>2</sup>LLC “Nauka, Tekhnika, Meditsina”, Tomsk)

**Summary.** The purpose of this work was to study the effectiveness of iodantipyrine (IA), a home-produced interferon-inductor drug, in preventive treatment for Russian tick-borne encephalitis (TBE) in tick bite-exposed individuals, as well as the IA's effects on the variations of spontaneous production of some pro- and anti-inflammatory cytokines by the peripheral blood mononuclear cells. All indices were triply assessed before and after a course of the prophylactic treatment with IA (a course dose 4,5 g for 9 days) or with specific anti-TBE virus immunoglobulin (IG). It was demonstrated the high preventive effectiveness of IA, which was prescribed to individuals within 72 h and later after a tick bite. Preventive treatment with IA, unlike IG, does not induce suppression of production of specific IgG to RTB virus. It was found a significant increase in the IFNα, IFNγ and IL-10 production in cell cultures in 2 weeks after the beginning of the preventive treatment with IA as

compared to the initial cytokine concentrations before and a month after the beginning of the treatment. The variations of cytokines production are associated with the mixed-Th1/Th2-type of adequate immune response to the viral infection.

**Key words:** iodantipyrine, Russian tick-borne encephalitis, cytokines, preventive treatment.

Клещевой энцефалит (КЭ) – одно из самых распространенных природно-очаговых заболеваний нервной системы, передающихся иксодовыми клещами [2]. Основными направлениями в предупреждении заболеваемости КЭ являются вакцинация населения против этой инфекции. Экстренная профилактика (ЭП), которая проводится сразу после присасывания клеща, в основном рассматривается как дополнительная профилактическая мера [2]. Назначение иммуноглобулина (ИГ) против КЭ для ЭП проводится только после получения положительных результатов иммуноферментного анализа (ИФА), свидетельствующих об обнаружении вируса КЭ (ВКЭ) в клеще и/или в крови [1]. На сегодняшний день доказано, что эффективность профилактического действия данного серопрепарата находится в прямой зависимости от сроков его введения с момента инфицирования ВКЭ. Иммуноглобулин против КЭ целесообразно применять при повторных укусах клещей в течение одного эпидсезона. Кроме того, этот препарат имеет высокую стоимость и не является эффективным в случае инфицирования другими инфекционными агентами, возбудителями арбовирусных инфекций [2].

В последние годы одним из перспективных направлений для ЭП и лечения КЭ стало применение препаратов индукторов интерферонов, к которым относится йодантипирин (ИА) [5,7]. Это препарат, индуктор эндогенных интерферонов 1-го и 2-го типов, из класса нестероидных противовоспалительных препаратов, производных пирозолона, был зарегистрирован и применяется для профилактики и лечения неочаговых форм КЭ и некоторых других вирусных инфекций (РУ № ЛС-002505 от 29.12.2006 г., ЛС-002505 от 24.02.2010 г.) [5,6,7].

Цель настоящей работы заключалась в изучении клинической эффективности использования отечественного индуктора интерферонотенеза ИА для постэкспозиционной ЭП КЭ и его влияние на динамику спонтанной продукции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови.

### Материалы и методы

Скрининг участников-волонтеров для участия в данном исследовании был проведен из числа лиц, обратившихся на пункты ЭП клещевых инфекций г. Томска по факту присасывания клеща. Критериями включения в исследование служили: возраст от 18 до 60 лет; отсутствие в анамнезе указания на заболевание или вакцинацию против КЭ, и/или факта присасывания вирусофорного клеща; обнаружение антигена ВКЭ методом ИФА в клеще и/или в крови пациента в срок не ранее чем через 24 ч от момента присасывания клеща; отрицательный результат исследования IgG к ВКЭ; отсутствие противопоказаний к применению препаратов ИА и ИГ; информированное согласие волонтера на участие в исследовании. Исследование, одобренное Этическим комитетом СибГМУ (№ 993 от 27.04.09 г.), проведено в соответствии с юридическим и этическими нормами, предусмотренными Хельсинкской декларацией и действующим законодательством РФ.

В результате скрининга были сформированы 2 группы волонтеров, обратившихся по поводу присасывания клеща, не различающихся по возрасту, половому признаку, клинико-анамнестическим и эпидемиологическим данным. Основная группа, включавшая 73 человека (возраст 36,1±2,11 лет), получила в качестве курса ЭП ИА (таблетки 100 мг; серия 20209) производства ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», г. Томск, а в группе сравнения (контроль), состоявшей из 44 человек (возраст 37,2±3,51 лет), был введен ИГ против КЭ (ам-

пулы 1 мл для внутримышечного введения, титр 1:160; серии: № 210109, 020309 и 070509) производства ЗАО «Микроген», ФГУП НПО «Вирион», г. Томск. Дизайн исследования был построен по принципу открытого рандомизированного сравнительного исследования. В целях ЭП ИА назначался по стандартной 9-дневной схеме (курсовая доза 4,5 г), предусмотренной инструкцией к его применению: по 0,3 г 3 раза в день в течение первых 2-х дней; по 0,2 г 3 раза в день в течение следующих 2-х дней; по 0,1 г 3 раза в день в течение следующих 5-ти дней. Назначение испытуемым ИГ производилось в соответствии с инструкцией (2005 г.) из расчета 0,1 мл/кг массы тела внутримышечно однократно.

У всех волонтеров, включенных в данное исследование, было проведено тщательное клиническое обследование, а также определение методом твердофазного ИФА (ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово) антигена ВКЭ в сыворотке крови и/или клеще, титра специфических IgM и IgG в сыворотке крови к антигену ВКЭ и к боррелиям иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ). Кроме того, с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) было проведено выявление РНК ВКЭ в крови.

Обследование волонтеров проводилось в процессе 3 визитов – до назначения препаратов (визит 1), а также через 10-14 дней (визит 2) и через 21-28 дней (визит 3) от начала ЭП [1]. Кроме того, изучение маркеров ВКЭ в сыворотке крови участников исследования дополнительно проводилось через 3 мес. (визит 4).

У 27 волонтеров из основной группы в сроки трех визитов были взяты образцы гепаринизированной крови (10 мл) для получения культур. Мононуклеарные клетки, выделенные с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция), инкубировали во флаконах (около  $\times 10^6$  клеток/мл) в среде RPMI-1640 («ПанЭко», г. Москва) при 37°C и в присутствии 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Спонтанные уровни продукции интерферонов- $\alpha$  и - $\gamma$  (ИФ- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$ ) и интерлейкинов-2, -4 и -10 (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10) в супернатантах полученных культур были определены с помощью твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями, предлагаемыми производителем тест-систем (ООО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург и «BioSource», США). Оптическую плотность регистрировали с помощью иммунологического анализатора «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

Для статистической обработки данных использовали стандартный пакет программ «Statistica 6.0». Количественные показатели представлены в виде Me ( $Q_{0,25} - Q_{0,75}$ ), где Me – медианное значение, а ( $Q_{0,25} - Q_{0,75}$ ) – интерквартильный разброс. Статистическую значимость различий качественных признаков в ходе анализа частот проверяли при помощи точного теста Фишера и критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса. Для определения существования связи между параметрами вычисляли ранговую корреляцию Спирмена. Кроме того, применялся параметрический критерий Стьюдента для зависимых выборок, непараметрический критерий Вилкоксона для парных сравнений, а также критерий Фридмана – непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

В случае подозрения на заболевание КЭ волонтер, получивший курс ЭП, госпитализировался в специализированный стационар. В настоящем исследовании отсутствовали случаи манифестных форм заболеваний КЭ. Тем не менее, в основной группе лиц, получавших

ИА, у двух волонтеров (2,7%) более 3 мес. сохранялась высокая антигенемия ВКЭ при отсутствии антителообразования. Проведенная ПЦР диагностика не подтвердила наличие РНК ВКЭ в крови этих лиц, что можно интерпретировать как отсутствие инфицирования. В группе лиц, которым вводился ИГ, у двух (4,5%) волонтеров также длительно сохранялась высокая антигенемия ВКЭ при отсутствии антителообразования. Поскольку проведенная ПЦР диагностика в одном случае подтвердила наличие вируса, а клиническая симптоматика отсутствовала, то был поставлен диагноз субклинической формы КЭ. Кроме того, двум волонтерам (4,5%) из группы сравнения был поставлен диагноз острого ИКБ, который подтвердился серологически.

Побочное действие препаратов отслеживалось по наличию жалоб участников. В основной группе у 8 (10,9%) волонтеров на фоне приема ИА были зарегистрированы следующие побочные явления легкой степени тяжести: тошнота (у 4,1%), боль в эпигастральной области (у 4,1%), головная боль умеренной интенсивности и без четкой локализации (у 2,7%). Указанные симптомы не требовали медикаментозной терапии, не сопровождались какими-либо отклонениями при объективном обследовании и были отмечены лишь в момент приема максимальной суточной дозы ИА (9 таблеток). В группе сравнения у 7 (15,8%) волонтеров на фоне введения ИГ было зарегистрировано появление побочных явлений легкой степени тяжести: отёка и болезненности в месте инъекции (у 4,5%), головокружения (у 4,5%), слабости и недомогания (у 4,5%), а также головной боли (2,3%). Статистически значимых различий между обследованными группами выявить не удалось ( $p > 0,05$ ).

Распределение участников исследования по срокам обращения в пункты ЭП клещевых инфекций после присасывания клеща (табл. 1) позволило выявить статистически значимое различие между основной и контрольной группами. В группе, которой назначался ИА, в отличие от группы сравнения, большинство волонтеров начали получать курс ЭП в поздние сроки (через 4 и более суток) после укуса клеща ( $p = 0,044$ ), то есть в те сроки, когда применение ИГ считается малоэффективным [2]. Распределение волонтеров по другим изученным показателям в сроки первого и всех последующих визитов не имело достоверных различий между основной и контрольной группами ( $p > 0,05$ ). В

Таблица 1  
Распределение участников исследования по срокам обращения (в сутках) в пункты экстренной профилактики клещевых инфекций после присасывания клеща в основной (ИА) и контрольной (ИГ) группах

Сутки	Группа ИА		Группа ИГ	
	n	%	n	%
1	9	12,3	8	18,2
2	20	27,4	15	34,0
3	20	27,4	13	29,6
4	10	13,7	8	18,2
более 4	14	19,2	0	0
Всего обследовано	73	100	44	100
				$t=2,13$ $p=0,044$

Примечание (здесь и для табл. 2): n – абсолютное число волонтеров; ИА – йодантипирин; ИГ – иммуноглобулин против клещевого энцефалита; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита.

Распределение участников исследования (%) в сроки 2-го и 3-го визитов по наличию в сыворотке крови специфических поздних антител (Ig G) к антигену ВКЭ в основной (ИА) и контрольной группах (ИГ)

Титр антител	Визит 2				Визит 3			
	Группа ИА		Группа ИГ		Группа ИА		Группа ИГ	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Отрицательный	66	90,4	43	97,7	57	78,1	44	100
1:100	3	4,1	0	0	5	6,9	0	0
1:200	3	4,1	1	2,3	6	8,2	0	0
1:400	0	0	0	0	2	2,7	0	0
1:800	0	0	0	0	2	2,7	0	0
1:1600	1	1,4	0	0	1	1,4	0	0
Всего обследовано	73	100	44	100	73	100	44	100
			$t=1,50$ $p=0,13$				$t=3,47$ $p=0,0007$	

сроки 1-го и 2-го визитов отсутствовали также различия в распределении участников исследования между обследованными группами по наличию в сыворотке крови специфических IgG к антигену ВКЭ (табл. 2). Однако, уже на 3-й визит распределение волонтеров по этому показателю существенно отличалось в группах, получавших ИА и ИГ ( $p = 0,0007$ ). В основной группе у 21,9% обследованных лиц в сыворотке крови были обнаружены поздние антитела к ВКЭ. В тоже время, у всех волонтеров в группе, получавших ИГ, этот показатель был отрицателен. Более того, эта тенденция сохранялась и на 4-й визит после начала курса ЭП ( $p = 0,0015$ ), что отражает активность гуморального иммунитета в

Таблица 3  
Уровни спонтанной продукции про- (ИФ- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$ , ИЛ-2) и противоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокинов в культурах мононуклеарных клеток периферической крови группы волонтеров, получивших курс экстренной профилактики ИА, в сроки трех последовательных визитов (Me ( $Q_{0,25} - Q_{0,75}$ ))

Показатель	Визит 1	Визит 2	Визит 3	$\chi^2_{крит}$ N=27 df=2	P
ИФ- $\alpha$	14,88 (13,10–20,41)	16,62 (14,43–21,14)	15,25 (13,42–17,10)	6,19	0,045
ИФ- $\gamma$	9,23 (6,21–15,05)	12,56 (9,98–21,54)	9,34 (4,76–12,35)	5,85	0,054
ИЛ-2	9,17 (8,61–11,01)	9,62 (8,75–16,22)	9,07 (8,44–11,45)	4,67	0,097
ИЛ-4	3,91 (2,65–5,08)	4,92 (2,53–5,34)	4,71 (3,64–5,09)	1,56	0,459
ИЛ-10	15,72 (11,32–23,24)	23,11 (16,05–39,09)	16,23 (10,08–24,44)	17,56	<0,001

Примечание: N – общее число волонтеров; Me – медиана; ИФ- $\alpha$  и ИФ- $\gamma$  – интерфероны- $\alpha$  и - $\gamma$ ; ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 – интерлейкины-2, -4 и -10; использован критерий Фридмана; для уровня статистической значимости  $p = 0,05$  критическое значение  $\chi^2_{крит} = 5,99$ .

ответ на специфическую антигенную нагрузку в основной группе, в отличие от группы получавшей ИГ.

В результате изучения уровней спонтанной продукции цитокинов в группе волонтеров, получавших ИА (табл. 3), было показано, что в динамике трех визитов показатели ИФ- $\alpha$  ( $p = 0,045$ ) и ИЛ-10 ( $p < 0,001$ ) имеют статистически значимые различия. Статистически значимые различия были установлены для уровней продукции в супернатантах ИФ- $\alpha$  ( $Z = 2,12$ ,  $p = 0,041$ ) и ИЛ-10 ( $Z = 2,96$ ,  $p = 0,003$ ) между 2 и 3 визитом, а также для ИЛ-10 ( $Z = 2,51$ ,  $p = 0,012$ ) между 1 и 2 визитом. Поскольку распределение значений показателя ИФ- $\gamma$  было близко к нормальному, то для сравнения этого показателя между визитами применялся параметрический критерий Стьюдента для зависимых выборок. В результате было установлено статистически значимое повышение содержания в супернатантах ИФ- $\gamma$  ( $T = 2,72$ ,  $p = 0,012$ ) между 1 и 2 визитами на фоне применения ИА, с дальнейшим динамическим снижением уровня этого показателя до исходных значений к визиту 3 ( $T = 3,01$ ,  $p = 0,06$ ), что соответствовало смешанному Th1/Th2-типу адекватному типу иммунного ответа на вирусную инфекцию [3,4,8,9].

Таким образом, показана высокая эффективность препарата ИА для ЭП КЭ не только в первые 72 ч после

присасывания вирусифорного клеща, но и в более поздние сроки, когда введение ИГ неэффективно. Все выявленные нами побочные симптомы были легкой степени тяжести, не требовали назначения дополнительной медикаментозной терапии и были отмечены лишь в момент приема максимальной суточной дозы ИА (9 таблеток). Установлено, что, ЭП КЭ с использованием ИА, в отличие от применения ИГ, по-видимому, не приводит к подавлению формирования специфического гу-

морального иммунного ответа на антиген ВКЭ. В культурах мононуклеарных клеток периферической крови основной группы через 2 недели после начала приема ИА установлено существенное повышение спонтанных уровней продукции ИФ- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$  и ИЛ-10, с последующим снижением этих показателей до исходных значений через 1 месяц, что соответствует смешанному Th1/Th2-типу адекватному типу иммунного ответа на вирусную инфекцию.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионова О.И., Чиканова Т.Ю., Вожаков С.В. и др. Анализ эффективности алгоритмов диагностики клещевых инфекций по результатам эпидсезона 2008 г. // Сибирский медицинский журнал. – Томск, 2009. – Т. 24. №2. – С.97-101.
2. Злобин В.И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: современное состояние проблемы и стратегия профилактики // Вопросы вирусологии. – 2005. – №3. – С.26-32.
3. Насырова Р.Ф. Иммунопатогенетические основы антигенемии вируса клещевого энцефалита: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2006. – 24 с.
4. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Зима А.П. Нарушения продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови при персистенции вируса клещевого энцефалита // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2006. – №12. – С.57-62.
5. Попонникова Т., Пиневиц О., Панько Т., Вахрамеева Т.

Эффективность циклоферона при различных этиологических вариантах клещевых инфекций у детей // Врач. – 2007. – №7. – С.30-32.

6. Шайхулина Л.Р. Состояние процессов пероксидации у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом на фоне терапии с применением йодантипирина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2005. – 22 с.

7. Яворовская В.Е., Саратиков А.С., Федоров Ю.В. Йодантипирин – средство для лечения и профилактики клещевого энцефалита // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – Т. 61. №1. – С.51-53.

8. Couper K.N. Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180. №9. – P.5771-5777.

9. Liu X.S., Leerberg J., MacDonald K., et al. IFN- $\gamma$  promotes generation of IL-10 secreting CD4 + T that suppress generation of CD8 responses in an antigen-experienced host // Immunology. – 2009. – Vol. 183. №3. – P.51-58.

**Информация об авторах:** Лепехин Алексей Васильевич – заведующий кафедрой, д.м.н., профессор;

Ильинских Екатерина Николаевна – профессор кафедры, д.м.н., 634050, г. Томск, а/я 808, e-mail: infconf2009@mail.ru; Лукашова Лариса Владимировна – профессор кафедры, д.м.н.; Дорошенко Александр Сергеевич – заместитель начальника медицинского отдела; Замятина Евгения Владимировна – сотрудник медицинского отдела.

© ЖУКОВА Н.Г., ПИНЕГИНА Т.С., ПОЛТОРАЦКАЯ Т.Н., НАСЫРОВА Р.Ф., ПЕРМИНОВ В.А., РАССОЛОВА Л.В., УДИНЦЕВА И.Н., ПЕРШИНА С.А., ПИРОГОВА Н.П., ШИХИН А.В. – 2012  
УДК 616.988.25-002.954.2:595.421]-036.8(571.16)

#### ИСХОДЫ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕНОСИМЫХ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Наталья Григорьевна Жукова<sup>1</sup>, Татьяна Семёновна Пинегина<sup>1</sup>, Татьяна Николаевна Полторацкая<sup>2</sup>, Регина Фаритовна Насырова<sup>1</sup>, Вячеслав Анатольевич Перминов<sup>3</sup>, Лариса Валентиновна Рассолова<sup>3</sup>, Ирина Николаевна Удинцева<sup>4</sup>, Светлана Анатольевна Першина<sup>5</sup>, Наталия Петровна Пирогова<sup>6</sup>, Александр Владимирович Шихин<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. В.В. Новицкий, кафедра неврологии и нейрохирургии, зав. – д.м.н., проф. В.М. Алифирова; <sup>2</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Томской области, гл. врач – к.м.н. А.В. Шихин, лаборатория паразитологических исследований, зав. – к.м.н.

Т.Н. Полторацкая; <sup>3</sup>Главное бюро медико-социальной экспертизы по Томской области, главный эксперт – к.м.н. В.А. Перминов, экспертный состав № 2, руководитель – Л.В. Рассолова; <sup>4</sup>МСЧ «Строитель», гл. врач – Н.Н. Бартфельд, терапевтическое отделение, зав. – О.В. Буров; <sup>5</sup>Лоскутовская ЦРП, гл. врач – В.С. Грязнов;

<sup>6</sup>Кубанский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. С.Н. Алексеенко, кафедра общей и клинической патофизиологии, зав. – д.м.н., проф. А.Х. Каде)

**Резюме.** Проведено сравнительное изучение исходов инфекций, переносимых иксодовыми клещами, с 1944 года по 2011 г. в Томской области. Показано, что их структура претерпела определенный патоморфоз. В настоящее время отмечается снижение паралитической, менинго-энцефалитической и полирадикулоневритической форм клещевого энцефалита. В последние годы зафиксировано учащение как микст-инфекции, так и длительной антигенемии вируса КЭ.

**Ключевые слова:** инфекции, переносимые иксодовыми клещами, патоморфоз, исход, Томская область.

#### THE OUTCOMES OF INFECTIONS CARRIED BY TICKS IN TOMSK REGION

N.G. Zhukova<sup>1</sup>, T.S. Pinegina<sup>1</sup>, T.N. Poltorazkaja<sup>2</sup>, R.F. Nasirova<sup>1</sup>, B.A. Perminov<sup>3</sup>, L.V. Rassolova<sup>3</sup>, I.N. Ydinzeva<sup>4</sup>, C.A. Perschina<sup>5</sup>, N.P. Pirogova<sup>6</sup>, A.B. Schixin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Siberian State Medical University; <sup>2</sup>Center of Hygiene and Epidemiology of Tomsk Region; <sup>3</sup>Head Office of Medical and Social Assessment of Tomsk Region; <sup>4</sup>Medical Division "Stroitel"; <sup>5</sup>Central Regional Clinic "Loskutovskaya"; <sup>6</sup>Kuban State Medical University)

**Summary.** There has been conducted the comparative study of outcomes of infections transmitted by ticks from 1944 to 2011 in the Tomsk region. It has been shown that their structure has undergone the definite pathomorphosis. Currently, the decrease of paralytic, meningo-encephalitic and polyradiculoneuritic forms of tick-borne encephalitis is noted. In recent years, an increased frequency of both mixed infections, and prolonged antigenemia of virus of tick-borne encephalitis have been noted.

**Key words:** infections carried by ticks, pathomorphosis, outcome, Tomsk Region.

Инфекции, переносимые иксодовыми клещами, являются самыми распространенными природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями на территории Томской области. Клинические особенности поздних проявлений и хронического течения данных природно-очаговых инфекций, их диагностика и этиопатогенетическая терапия остаются нерешенными и требуют дальнейшего изучения.

В каждом клиническом случае инфекции, передаваемой иксодовыми клещами, в остром периоде врач не может предсказать, каков будет исход. На сегодняшний день различают следующие виды исходов: выздоровление, остаточные явления, последствия, переход в хроническое (прогредиентное) течение и смерть больного. Исход инфекции зависит от многих факторов: от тяжести клинических проявлений острого периода и состояния макроорганизма и от свойств возбудителя. Необходимо отметить, что исходы при современных методах лечения становятся более благоприятными. Вместе с тем по данным Е.П. Деконенко и К.Г. Уманского (1984), после паралитических форм КЭ выздоровление с полным восстановлением трудоспособности (жалоб нет, микросимптоматика) наблюдается лишь у 4% переболевших; легкие остаточные явления с незначительным снижением качества жизни, наличием жалоб, без выраженных парезов и иной очаговой патологии – у 30%; стойкий органический синдром со значительным ограничением жизнедеятельности и инвалидизацией без прогрессирования – у 66%. Установлено, что после лихорадочной, стертой и менингеальной форм КЭ обычно наступает полное выздоровление. Хотя в единичных случаях, возможен переход в прогредиентное течение [4].

Очаговые формы КЭ (менингоэнцефалитическая, полиомиелитическая, полиоэнцефалитическая) могут закончиться смертью больного, если же наступает выздоровление, то часто остаются неврологические нарушения разной степени выраженности, которые в последствии рассматриваются как остаточные явления. Выявлено значительное утяжеление в последние годы клинической картины очаговых форм заболевания в остром периоде. Отмечается повышение удельного веса многоуровневых поражений ЦНС, значимый процент летальности и хронизации инфекционного процесса с полиморфными проявлениями [3].

В настоящее время показана ассоциированность между формами и вариантами течения КЭ с генетическими характеристиками макроорганизма, а также особенностями индивидуального реагирования иммунной системы больных на вирус КЭ [8]. Известно, что с момента инфицирования и в последующем, даже после острого периода, вирус КЭ может сохраняться в ЦНС в активной форме. В этих случаях инфекционный процесс не завершается, а переходит в фазу хронической (прогредиентной) инфекции. Частота трансформации в хроническую инфекцию составляет 3-11% к общему числу заболеваний острым КЭ [1]. Хронический КЭ может протекать в латентной форме и проявляться через несколько месяцев и лет под действием провоцирующих факторов (физическое и психические травмы, раннее курортное и физиотерапевтическое лечение и др.) [6].

Последствия КЭ включают состояния, определяемые как таковые или как отдаленные эффекты, а также состояния, которые сохранялись в течение одного года или более после возникновения вызвавшей их болезни, при отсутствии симптомов активности воспалительного процесса. Последствия КЭ могут быть в виде психовегетативные нарушения с психоэмоциональными, когнитивными и поведенческими изменениями, которые приводят к снижению качества жизни и социальной адаптации реконвалесцентов. По литературным данным, иммунитет после перенесенного КЭ должен быть стойким ко всем типам вируса, повторных случаев заболеваний не должно быть, однако бывают исключения, что тоже еще не нашло должного объяснения [5]. Последствия иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ)

чаще представлены в виде дисфункции вегетативной системы и поражения периферической нервной системы (невропатия).

Цель работы: изучение исходов инфекций, передающихся иксодовыми клещами в Томской области.

## Материалы и методы

Проведён анализ структуры клинических форм (1944-2011 гг.) и тяжелых исходов острых клещевых инфекций (1990-2011 гг.) по данным ФБУЗ Центра гигиены и эпидемиологии по Томской области, главного бюро Медико-социальной экспертизы в Томске и Томской области. Дополнительно проанализированы амбулаторные карты и истории болезней выявленных лиц. Все больные в острый период находились на лечении в различных стационарах города и области, были осмотрены неврологом, верификация диагноза осуществлялась серологическими и вирусологическими методами (по МКБ-10 – Последствия воспалительных болезней центральной нервной системы, G09).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы SPSS Statistics 17,0. Проверка данных на подчинение нормальному закону распределения проведена с помощью метода Шапиро-Вилка. Статистическая значимость различий средних величин, подчиняющихся нормальному закону распределения, проведена с помощью дисперсионного анализа, для сравнения качественных независимых данных использован критерий Хи-квадрат Пирсона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В результате изучения клинических проявлений КЭ с первых лет (с 1944 года) его регистрации в Томском регионе было выявлено, что структура их претерпела определенный патоморфоз. Так, до 1950-х годов, по данным Н.В. Шубина (1974), чаще встречалась полиомиелитическая форма (34,5%), на втором месте – кожевниковская эпилепсия (25,0%), третьем – менингеальная (16,2%). Затем в убывающем порядке регистрировались полиоэнцефаломиелитическая (10,9%), энцефаломиелитическая (6,7%), полиоэнцефалитическая (3,1%), стертая форма занимала последнее место (1,8%) [7]. Начиная с 1950-х годов, очаговые формы КЭ стали выявляться реже без уменьшения общего количества больных за сезон, тогда как лихорадочная и стертая – увеличились. В начале 1990-х годов количество случаев паралитических форм КЭ продолжало снижаться и составило около 5,0% лиц, в 1999 г. – 2,8%, в 2000 г. – 2,95% и в 2011 г. – 4,3%.

Наиболее тяжелая полиомиелитическая форма КЭ наблюдалась значительно реже – у 1-3 (0,2-3,7%) больных. Однако в отдельные эпидсезоны было зарегистрировано по 7 (1987 и 1993) и 5 (1983) больных, при этом процентное соотношение составляло не более 1,6-3,7%. В последнее время не отмечали энцефалополиомиелитическую форму КЭ. Менингоэнцефалитическая форма КЭ установлена в 1999 г. у 14 (2,04%) человек, в 2000 г. – 7 (1,6%), в 2011 г. – 8 (3,8%).

Редко встречалась полирадикулоневритическая форма КЭ: в 1998 г. была выявлена у 1 (0,23%) больной, в 1999 г. и 2000 г. – по 3 (0,4% и 0,7%, соответственно). Установлено, что причиной данной клинической формы инфекции, передаваемой иксодовыми клещами, могут быть только боррелии. Поэтому в настоящее время данная клиническая форма рассматривается как проявление ИКБ.

Одной из возможных причин уменьшения числа тяжелых (очаговых) форм КЭ, вероятнее всего, следует считать вакцинацию и естественную иммунизацию населения. В последние годы зафиксировано учащение как микст-инфекции (КЭ и ИКБ, анаплазмоз и эрлихиоз), так и лиц с длительной антигемией вируса КЭ.

Анализ динамики клинических форм КЭ по годам показал, что они подвержены циклическим колебаниям, в частности, лихорадочные формы имеют колебания в 4 и 9 лет. Для данной формы отмечен устойчивый рост ( $r=0,74$ ;  $p<0,05$ ) по годам. Для менингеальной формы зафиксированы колебания в 4 года с большой амплитудой в 1970-1980 годах и значительное укорочение ее в последнее десятилетие. Кроме того, корреляционный анализ показал, что для менингеальной формы КЭ характерна наклонность к неустойчивому снижению с течением времени ( $r = -0,4$ ;  $p<0,05$ ). Среди очаговых форм КЭ также отмечалась тенденция к снижению энцефалополлиомиелитической и полиомиелитической ( $r=0,3$ ;  $p<0,05$ ) в последние годы.

В острый период от КЭ в разные годы умерли 2-3 больных, при этом летальность составляла от 3,0% до 0,19%. Смертность составляла в разные годы 0,002-0,003.

Проведенный анализ 161 случая с неблагоприятным исходом острых форм клещевой нейроинфекции показал, что жители Томска составили 74 (46%) случаев, Томской области – 87 (54%). Возрастной состав наблюдаемых колебался от 7 до 74 лет, средний возраст составил  $46,7 \pm 13,2$  лет, но наиболее часто страдали лица трудоспособного возраста: 118 (72,7%) лиц приходилось на возраст от 36 до 59 лет, 37 (23,4%) – до 35 лет и лишь 7 (3,9%) – после 60 лет. По гендерному признаку среди обследованных преобладали в 1,9 раза ( $p<0,05$ ) мужчины – 102 (63,4%) больных, что может быть связано с большим количеством мужчин, занятых в лесной и нефтегазовой промышленности и работающих в лесной зоне.

Диагностирован КЭ у 106 (65,8%) больных, ИКБ – 30 (18,6%), микст-инфекция – 2 (1,5%), что указывает на преобладание ( $p<0,05$ ) последствий КЭ. Среди больных с КЭ 18 (13,7%) случаев были признаны инвалидами I группы, 47 (35,9%) – II группы и 66 (50,4%) – III группы, тогда как после ИКБ инвалидов I группы не было, II группа установлена у 6 (37,5%) больных и III группы – у 10 (62,5%). Для больных с микст-инфекцией было практически аналогичное соотношение – инвалидов I группы нет, II группы – 5 (33,4%) больных и III группы – 10 (66,7%). Стоит отметить, что в группе больных с тяжелым течением КЭ не было лиц, получавших вакцинацию против КЭ.

Анализ клинических проявлений 18 инвалидов I группы показал, что у всех резко выражены ограничения жизнедеятельности, у них регистрировали тяжелые двигательные нарушения в виде грубых спастических нижних и атрофических верхних парезов с прогрессирующим течением, как результат перенесенной в острый период полиомиелитической формы КЭ.

Среди 47 инвалидов II группы после КЭ с ограничениями способности к трудовой деятельности, а также к самообслуживанию и передвижению у 11 больных были зафиксированы умеренно выраженные вялые верхние моно- или парапарезы и спастические нижние парезы, как результат острой полиомиелитической формы; у 24 – бульбарные нарушения, спастические гемипарезы, как следствие острой менингоэнцефалитической формы; у 12 – распространенные гиперкинезы в сочетании с эпилептическими припадками, как следствие энцефалитической формы. Данная группа из 12 больных наблюдалась с диагнозом кожевниковская эпилепсия. У них отмечали постоянные миоклонические гиперкинезы, захватывающие мышцы шеи и плечевого пояса. При эмоциональном напряжении у них отмечалось приступообразное усиление и генерализация миоклоний или переход в большой тонико-клонический приступ с по-

терей сознания.

У 6 инвалидов II группы после ИКБ выявили симптомы поражения опорно-двигательного аппарата и нервной системы в виде выраженного корешкового синдрома и явлений артралгии, что было расценено нами как проявление поздней стадии диссеминации инфекции. У 5 инвалидов II группы после микст-инфекции регистрировали симптомы в виде стойких гемиспастических парезов и положительных лабораторных показателей ИКБ.

У инвалидов III группы после инфекций, передаваемых иксодовыми клещами, диагностировали умеренно выраженные нарушения двигательных функций в виде легкой или рефлекторной пирамидной недостаточности у 4 больных; радикулоневропатии поясничного отдела позвоночника – у 3; стойкие психовегетативные – у 62. Также у 12 обследованных регистрировали гипертензионно-гидроцефальные синдромы как исход лихорадочной и менингеальной форм КЭ в сочетании с манифестной безэритемной формой ИКБ.

Отдельно нами проведен анализ случаев инфекции, которые не были признаны инвалидами, но предъявляли жалобы психовегетативного характера и длительно наблюдались у невролога по месту жительства. По данным А.М. Вейна (2003), данный синдром является частым последствием КЭ [2]. Главным основным проявлением психовегетативных расстройств являлась астения в виде выраженной общей слабости, повышенной раздражительности, частой головной боли, больше выраженной ночью и по утрам, головокружения при езде на транспорте, ощущения дрожания рук и ног, чувства внутреннего напряжения, вегетативных кризов (панические атаки), плаксивости, субфебрилитета, нарушения внимания, памяти и сна, психических нарушений в виде подавленного настроения, чувства страха и ипохондрии.

Таким образом, на основании проведенного анализа тяжелых исходов инфекций, передающихся иксодовыми клещами, можно утверждать, что неблагоприятные последствия острого периода чаще регистрируются у мужчин трудоспособного возраста после перенесенного КЭ, с одинаковой частотой, как у жителей города, так и села. Наиболее серьезные последствия отмечаются после полиомиелитической и менингоэнцефалитической форм, с возможным развитием в дальнейшем прогрессирующей формы, приводящей не только к существенному ограничению трудовой деятельности, но и к полной её утрате. В последние годы в Томской области выявлена тенденция к снижению числа больных с тяжелыми очаговыми формами КЭ. Исход паралитических форм КЭ проявляется у реконвалесцентов длительно (до 1-2 лет, а иногда и пожизненно) выраженными органическими изменениями ЦНС (судорожные синдромы, атрофии мышц, признаки деменции).

Основные проявления резидуального периода после лихорадочных и менингеальных форм КЭ представлены в виде психовегетативных расстройств по типу астенического и/или болевого синдромов, с когнитивными и психоэмоциональными нарушениями. В Томской области течение КЭ в последние годы претерпело изменения. Относительно редко стали наблюдаться тяжелые клинические формы острого периода. В то же время доброкачественность острого периода не исключает развития в дальнейшем кожевниковской эпилепсии и атрофических параличей.

Последствия ИКБ формируются не часто и редко являются причинами инвалидизации, однако, снижают качество жизни и увеличивают сроки временной нетрудоспособности таких больных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Амосов А.Д. Клещевой энцефалит: Информационно-методическое пособие. – Кольцово: Ин-т средств мед. диагностики ЗАО «Вектор-Бест», 2006. – 115 с.
2. Вегетативные расстройства: клиника, диагностика, ле-

чение / Под ред. А.М. Вейна. – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 752 с.

3. Волкова Л.И., Романенко В.В. Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика клещевого энцефалита: методические указания. – Екатеринбург,

2004. – 72 с.

4. Деконенко Е.П., Уманский К.Г. Последствия различных клинических форм острого периода клещевого энцефалита // Журнал невропатологии и психиатрии. – 1984. – №2. – С.202-207.

5. Жукова Н.Г., Команденко Н.И. Клещевой энцефалит в Томской области (этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика, лечение). – Томск: STT, 2002. – 256 с.

6. Субботин А.В., Семенов В.А., Арефьева Е.Г. и др. Хронический клещевой энцефалит в неврологической практике // Медицина в Кузбассе. – 2008. – Спецвып. №5. – С.149-151.

7. Шубин Н.В. Клещевой энцефалит. – Томск, 1974. – 67 с.

8. Vandenbroeck K., Goris A. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases gateways to novel targets for immunotherapy? // Trends Pharmacol. Sci. – 2003. – Vol. 11. №61. – P.26-28.

**Информация об авторах:** Жукова Наталья Григорьевна –

профессор кафедры, д.м.н., 634508, Томская область, Томский район, д. Кисловка, ул. Советская, 35, тел. (3822) 531019, e-mail: znatali@yandex.ru; Пинегина Татьяна Семеновна – аспирант; Полторацкая Татьяна Николаевна – заведующая лабораторией, к.м.н.; Насырова Регина Фаритовна – доцент, к.м.н.;

Перминов Вячеслав Анатольевич – главный эксперт, к.м.н.; Рассолова Лариса Валентиновна – руководитель экспертного состава; Удинцева Ирина Николаевна – врач-невролог, к.м.н.; Першина Светлана Анатольевна – врач-невролог, к.м.н.; Пирогова Наталия Петровна – профессор кафедры, д.м.н.; Шихин Александр Владимирович – главный врач, к.м.н.

© ФОМЕНКО Н.В., ШПЕРЛИНГ М.М., БОРГОЯКОВ В.Ю., ЕПИХИНА Т.И., РОМАНОВА Е.В. – 2012

УДК 616025.002.954.2;576.807.7

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК БОРРЕЛИЙ И ПРОТИВОБОРРЕЛИОЗНЫХ АНТИТЕЛ

Наталия Владимировна Фоменко<sup>1,3</sup>, Михаил Моисеевич Шперлинг<sup>2</sup>, Вячеслав Юрьевич Боргояков<sup>3</sup>, Тамара Ивановна Епихина<sup>3</sup>, Екатерина Владимировна Романова<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, генеральный директор – М.Д. Хусаинов; <sup>2</sup>Городская инфекционная клиническая больница №1, г. Новосибирск, гл. врач – к.м.н. Л.Л. Позднякова; <sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов)

**Резюме.** В данной работе проведено выявление ДНК боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. и противоборрелиозных антител в крови больных, пострадавших в результате присасывания таежных клещей, а также проведено сравнение выявления антител и ДНК. Антитела выявлены на ранних сроках заболевания как у больных с эритемной формой иксодового клещевого боррелиоза (ЭФ ИКБ), так и у больных с хроническим течением ИКБ, а также у больных с клещевым энцефалитом. При сравнении результатов выявления ДНК боррелий и антител, проведенного на примере анализа результатов, полученных при обследовании больных с ЭФ ИКБ, отмечено, что с увеличением времени, прошедшего после присасывания клеща, количество проб, в которых детектируются антитела, увеличивается, а число проб, положительных в ПЦР, уменьшается.

**Ключевые слова:** иксодовый клещевой боррелиоз, ДНК, антитела.

### A COMPARATIVE ANALYSIS FOR IDENTIFYING DNA AND ANTIBORRELIA ANTIBODIES

N. V. Fomenko<sup>1,3</sup>, M. M. Spherling<sup>2</sup>, V. Yu. Borgoyakov<sup>3</sup>, T. I. Epichina<sup>3</sup>, E. V. Romanova<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>JSC VECTOR-BEST, Novosibirsk; <sup>2</sup>City Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk; <sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk)

**Summary.** In this work, the detection of *Borrelia burgdorferi* s.l. DNA and anti-borrelia antibodies in the blood of patients, hospitalized after tick bites, as well as a comparison of the detection of antibodies and DNA have been conducted. Antibodies were revealed at the early stages of the disease both in patients with Lyme disease with erythema migrans (EM LD), and in patients with chronic LD, and also in patients with tick-borne encephalitis. When comparing the results of DNA detection of antibodies, carried out by analyzing the results obtained when examining patients with EM LD, it was noted that with increasing time after tick bites, the number of samples, in which antibodies are detected, increases the number of samples with positive PCR is reduced.

**Key words:** Lyme disease, DNA, antibodies.

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – трансмиссивные заболевания, вызываемые спирохетами комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.), – занимают лидирующее место по широте распространения среди природно-очаговых инфекций в России [1]. ИКБ протекают в острой, а чаще в хронической форме, и проявляются в виде множественных органных повреждений. Основным патогномичным признаком ИКБ является мигрирующая эритема (МЭ), возникающая в месте присасывания клеща [2,3,4]. Наличие МЭ при ИКБ является достаточным критерием для постановки диагноза. Терапия ИКБ антибиотиками более эффективна на ранней стадии заболевания, при переходе в хроническую стадию лечение становится более длительным и сложным. Проведение лабораторных исследований, позволяющих подтвердить диагноз, особенно важно при безэритемном протекании ИКБ, когда симптомы заболевания могут быть неспецифичными. Показано, что у больных с безэритемной формой ИКБ, которым не про-

водилась терапия и у которых не наблюдали неврологических нарушений, при повторном обследовании в 68% были обнаружены поражения центральной и периферической нервной системы [2]. Кроме того, остается не изученным вклад боррелиозной инфекции в развитие тяжелых форм поражения центральной нервной системы (ЦНС). Ранее предложенный алгоритм диагностики безэритемных форм ИКБ предполагает серологическое обследование всех больных с острыми лихорадочными заболеваниями, возникающими после присасывания клещей [2,4]. При наличии высоких титров антител или их 4-х кратного нарастания через месяц ставится диагноз безэритемная форма ИКБ. Однако повсеместного применения на практике данный алгоритм не получил.

Целью данного исследования было выявление ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s.l. и антител у больных с ИКБ, клещевым энцефалитом и больных с нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу.



## Материалы и методы

Исследованы образцы крови 452 больных МБУЗ г. Новосибирска Городской инфекционной клинической больницы №1 (МБУЗ ГИКБ №1). Больные госпитализированы в весенне-летние эпидемиологические периоды 2003-2007 гг. и 2010-2011 гг. с признаками инфекционных заболеваний после присасывания клещей. Диагноз «ИКБ» или «клещевой энцефалит» (КЭ) был поставлен на основании эпидемиологического анамнеза (присасывание клеща, пребывание в эпидемиологически опасном районе области), клинических симптомов (в случае ИКБ – наличие эритемы) и по результатам лабораторных тестов.

Данные пробы крови собраны с согласия больных, с соблюдением этических норм, исследование одобрено на заседании этического комитета при ИХБФМ СО РАН (протоколы №3 от 14.07.2007 и №19 от 9.04.2010), все больные подписывали протоколы добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Всего проанализировано 452 образца крови больных, с ЭФ ИКБ – 202 образца, с КЭ – 172, одновременное протекание КЭ и ЭФ ИКБ – 38, с подтвержденным диагнозом ИКБ и с признаками поражения кожи, опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы – 40. Кроме того, проанализировано 100 образцов крови больных с нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу, диагноз которых был верифицирован при компьютерной томографии и клинически, имевшие неврологическую симптоматику в виде клинических синдромов, схожих с клиникой поражений нервной системы при хроническом нейроборрелиозе. Для изучения уровня противоборрелиозных антител у людей, отрицавших факт присасывания клещей в последние 3-5 лет, обследована контрольная группа, 100 человек, жителей Новосибирской области. Для определения диагностически значимого титра принят уровень специфичности 97%. Диагностическими считали следующие титры: с поливалентным конъюгатом начиная с титра 1:80, для IgM – начиная с титра 1:20.

Кровь объемом 6-9 мл собирали в пробирки «Vacuette»-К3Е с 0,5 М ЭДТА (Greiner Bio-One, Австрия). Плазму крови отделяли от клеточек центрифугированием при 500g, 15 мин, в дальнейшем ее использовали для серологических тестов. Для выделения ДНК боррелий использовали ДНК-содержащий материал, полученный центрифугированием 1,5 мл плазмы при 10000g, 15 мин, выделение нуклеиновых кислот проводили из осадка по ранее описанной методике [9]. Детекция ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s.l. в крови больных проведена методом двухраундовой ПЦР с использованием двух пар специфичных праймеров, соответствующих концам генов 5S и 23S рРНК, как описано ранее [9].

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили с использованием наборов реагентов ВектоВКЭ-IgM, IgG и ЛаймБест-IgG, IgM («Вектор-Бест», Новосибирск) и в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) с использованием конъюгатов, меченных флуоресцеин-5-изотиоцианатом, по предложенной ранее методике.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с применением программы Microsoft Excel. Для оценки статистической значимости различий показателей использовался критерий Стьюдента и критерий Фишера. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Проведено выявление ДНК *B. burgdorferi* s.l. в крови 452 больных, с диагнозом ИКБ, КЭ и микст-инфекция ИКБ и КЭ. ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s.l. обнаружены в 75 образцах крови больных (табл. 1).

Определение видовой принадлежности показало, что в пробах крови присутствовали ДНК видов – *B. garinii*

Таблица 1

Частота выявления ДНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s.l. в образцах крови больных

Диагноз (число исследованных/ положительных)	Число положительных образцов/ абс. число (%)		
	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. afzelii</i> + <i>B. garinii</i>
ЭФ ИКБ (202/49)	36 (73,5)	11 (22,4)	2 (4,1)
КЭ+ЭФ ИКБ (38/7)	5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)
КЭ (172/19)	13 (68,4)	4 (21,1)	2 (10,5)
ИКБ (40/0)	-	-	-
Всего (452/75)	54 (72,0)	16 (21,3)	5 (6,7)

и *B. afzelii*. В 16 образцах выявлена ДНК *B. afzelii*; в 54 – *B. garinii* (табл. 1). Одновременное присутствие ДНК *B. garinii* и *B. afzelii* выявлено в пяти случаях. Время прошедшее после укуса до взятия крови у больных ЭФ ИКБ варьировало от 1 до 30 дней, у больных КЭ до 34 дней, у большинства больных (62% и 70,8%, соответственно) он превышал 14 дней. Размеры эритемы варьировали от 4 см до 50 см. У больных с признаками поражения кожи, опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы от момента укуса клеща до анализа прошло от трех месяцев до трех лет. В наших исследованиях в крови больных с проявлениями поражения ЦНС была обнаружена ДНК *B. garinii*, как в случае моноинфекции ИКБ, так и в случае одновременного заболевания ИКБ и КЭ. Однако в случае одновременного протекания ИКБ и КЭ неизвестно, какая из инфекций была причиной менингеальных симптомов. ДНК *B. garinii* выявлена в 73,5% всех ПЦР-положительных проб крови больных с диагнозом ЭФ ИКБ, в то время как ДНК *B. afzelii* обнаружена лишь в 22,4% и в 4,1% проб выявлена ДНК обоих видов. Примерно такое же соотношение показано и для больных с диагнозом КЭ и смешанной формы заболевания. У больных с признаками поражения кожи, опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы ДНК в крови не обнаружена (табл. 1).

Противоборрелиозные антитела выявлены у как больных с ИКБ, так и у больных с КЭ. Антитела к белкам боррелий у больных с ЭФ ИКБ выявлены в 26% случаев, в 34% случаев выявлены пограничные титры антител. Статистически значимого отличия между выявлением противоборрелиозных антител у больных КЭ и смешанной формой ЭФ ИКБ и КЭ не выявлено. При использовании поливалентного конъюгата пограничные титры антител 1:40 выявлены в 30% случаев, а диагностически значимые титры антител выявлены в 18%. В 24% случаев противоборрелиозные антитела детектированы у больных с ЭФ ИКБ и КЭ, заболевание, в большинстве случаев, начиналось остро с поднятия температуры тела, сопровождавшейся головной болью и ознобом. Повышение температуры тела наблюдалось у всех больных в этой группе, причем у 76% больных температура тела была 38,5°C и выше.

Мы провели сравнение частоты выявления ДНК боррелий и противоборрелиозных антител у больных с ЭФ ИКБ в зависимости от времени, прошедшего после укуса клеща. ДНК боррелий выявлена в крови больных, преимущественно в течение первого месяца после присасывания клещей. При сравнении результатов выявления ДНК и антител в крови больных с ЭФ ИКБ, в первые пять недель после присасывания клещей, отмечено, что с увеличением времени, прошедшего после присасывания клеща, количество проб, в которых детектируются антитела, увеличивается, а число проб, положительных в ПЦР, уменьшается. На пятой неделе после укуса число проб, в которых выявлена ДНК, статистически значимо меньше ( $p<0,05$ ), чем число проб, в которых определены положительные титры антител. У больных с признаками поражения кожи, опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы положительные титры антител обнаружены в 92,5%, однако ни в одном случае ДНК в крови больных не детектирована.

Сравнение результатов выявления ДНК боррелий и наличия антител в крови больных с ЭФ ИКБ показало, что в 57,1% случаев, в которых детектирована ДНК, антитела не выявлены, а в 32,2% случаев антитела выявлены в титрах 1:40 (табл. 2). Одновременно с ДНК боррелий диагностически значимые титры антител выявлены только в 10,7%. В тоже время, у больных с ЭФ ИКБ, в крови которых ДНК боррелий не детектирована, диагностически значимые титры антител выявлены в 24,6% случаев.

Результаты выявления ДНК и титров противоборрелиозных антител

Результаты в ПЦР	Диагноз (число исследованных)	Титры антител		
		Σlg отр IgM отр	Σlg 1:40 IgM 1:10	Σlg 1:80 и выше IgM 1:20
Положительные (%)	ЭФ ИКБ (28)	16 (57,1)	9 (32,2)	3 (10,7)
	ЭФ ИКБ+ КЭ (3)	2 (67,7)	1 (32,3)	–
	КЭ (4)	3 (75,0)	1 (25,0)	–
Отрицательные (%)	ЭФ ИКБ (69)	23 (33,4)	29 (42,0)	17 (24,6)
	ЭФ ИКБ+ КЭ (4)	1 (25,0)	3 (75,0)	–
	КЭ (56)	32 (57,1)	15 (26,9)	9 (16,0)

Таким образом, показано, что при выявлении ДНК боррелий определяемые титры антител ниже, чем у больных с той же формой ИКБ, у которых ДНК не выявлялась. Анализ результатов, полученных для ЭФ ИКБ, показал, что ДНК боррелий статистически значимо реже ( $p < 0,05$ ) выявляется в пробах с титрами антител 1:80 и выше (табл. 2). В других случаях статистически значимого отличия между накоплением диагностического уровня антител и определением ДНК не выявлено, вероятно, из-за малого числа ПЦР-положительных образцов.

Из числа обследованных больных с клиникой поражения нервной системы, антитела к боррелиям выявлены в 12%, причем во всех случаях выявлены антитела класса IgG. Титр 1: 100 у 6 человек (6%), титр 1: 200 у одного больного, титр 1:400 у двух больных, титр 1: 800 у одного и титр 1: 1600 у двух больных. То есть в 5% случаев во всей группе, выявлены титры антител 1:400 и выше.

У больных контрольной группы антитела к белкам боррелий выявлены в 11% случаев: титр 1: 100 – у 9 больных, титр 1:200 – у одного, титр 1: 400 – у одного больного, титр 1: 800 и выше не выявлен. Таким образом, антитела класса IgM в титрах 1:200 и IgG 1:100 выявлены у 2% больных, так же в 9% выявлены только антитела класса IgG с минимальными значениями титров (1:100).

Принято считать, что вид *B. garinii* связан с неврологическими проявлениями ИКБ, а кожные проявления связывают с *B. afzelii* [14]. Однако в последнее время неоднократно обсуждалось отсутствие четкой взаимосвязи между видовой принадлежностью возбудителя и клиническими симптомами [13,15]. В тоже время при установлении видовой принадлежности боррелий, изолированных из ЦСЖ больных нейроборрелиозом, показано, что преимущественно детектируется *B. garinii* [14]. Показано, что у этих больных отличается не только вид боррелий, вызвавший заболевание, но и сильно выражены клинические отличия, так у них гораздо раньше проявляются симптомы нейроборрелиоза и в 96% случаев продолжаются шесть и более месяцев [14]. По литературным данным, этот вид боррелий изолирован при посевах биоптатов из МЭ больных ИКБ в Хабаровском крае и крови в Пермском крае [5,11]. В нашем исследовании у 7 больных с диагнозом ЭФ ИКБ отмечены симптомы острого нейроборрелиоза, у этих больных ДНК *B. garinii* детектирована в 4 случаях. Таким образом, наши результаты также не позволяют связать вид боррелий с клиническими проявлениями заболевания.

Ранее неоднократно отмечалось, что у больных с эри-

темной формой ИКБ на ранней стадии болезни антитела могут не определяться, либо полученные титры антител могут быть ниже диагностически значимого уровня [6]. Противоборрелиозные антитела в титрах 1:80 встречались у 13% больных ИКБ с МЭ на I стадии, у 34% больных на II стадии и у 67% больных на III стадии [2,3,6]. Отсутствие антител может быть обусловлено специфической гуморальной иммунной реакцией, при которой выработка антител зависит от клинического варианта заболевания, либо циркуляцией иммунных комплексов, образующихся в присутствии большого количества антигена и выявляемых в 30% случаев [1,2,8,12]. Показано, что при обследовании больных КЭ в Свердловской и Томской областях, циркуляция антител к боррелиям выявлена в 36,5% и 40% случаев, соответственно [3]. В Новосибирской области ЭФ ИКБ составляют не более 40-50% случаев заболевания, что сравнимо с данными, полученными при анализе заболеваемости ИКБ в Красноярском крае, где доля ЭФ ИКБ составила 42,2% [7].

Известно, что в некоторых случаях диссеминация боррелий начинается уже в первые дни болезни одновременно с развитием МЭ. Отмечено, что на поздних стадиях инфекции изолировать боррелий или детектировать ДНК боррелий в крови в большинстве случаев не удается [10]. В тоже время, в крови накапливается достаточное для диагностики количество противоборрелиозных антител. В данной работе так же показана обратная корреляция выработки антител с накоплением ДНК боррелий. Подобная корреляция выявления ДНК *B. burgdorferi* s.l. методом ПЦР и определения противоборрелиозных антител IgG также показана в работах Кондрушика и Хмелевской с соавт. [8,10]. Показано, что совместное применение ИФА и ПЦР для исследования ликвора и крови значительно увеличивает возможность ранней диагностики [4].

Анализ выявления противоборрелиозных антител у больных, имевших неврологическую симптоматику в виде клинических синдромов, схожих с клиникой поражения нервной системы при хроническом нейроборрелиозе показал, что оно сравнимо с выявлением антител у жителей Новосибирской области, отрицающих факт присасывания клещей в анамнезе. Полученные результаты соответствуют приводимым в литературе данным по иммунной прослойке населения в эндемичных по ИКБ регионах. Следовательно, однократное выявление антител не может быть окончательным критерием диагностики хронического ИКБ с поражением ЦНС. Для клинической диагностики данного заболевания требуется динамическое клиническое и лабораторное наблюдение за больными.

Таким образом, на стадии раннего ИКБ до начала лечения метод ПЦР применим в комплексной диагностике заболевания наряду с иммунологическими методами анализа. Поскольку отрицательный результат серологических тестов на ранних стадиях заболевания не является доказательством отсутствия инфекции, получение положительного результата в ПЦР может помочь в постановке правильного диагноза, что особенно важно в случае смешанной инфекции и отсутствии патогномичных признаков ИКБ. Использование метода ПЦР для детекции ДНК боррелий в крови на поздних стадиях и при хроническом течении заболевания нецелесообразно. У больных с нарушением мозгового кровообращения по ишемическому типу, при выявлении специфических антител, не получено существенных различий с контрольной группой.

Работа выполнена при частичной поддержке проекта № 5.25 Программы фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки - медицине» Российской академии наук и гранта РФФИ 11-04-01066-а.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьева Л.П. Иксодовые клещевые боррелиозы (Лаймская болезнь). Экология, клиническая картина и этиология // Тер. арх. – 2000. – №5. – С.72-78.
2. Воробьева Н. Н. Иксодовые клещевые боррелиозы // Росс. мед. журн. – 2000. – №6. – С.33-38.
3. Лукашова Л.В., Лепехин А.В., Жукова Н.Г. и др. Клинические проявления и дифференциальный диагноз иксодовых клещевых боррелиозов // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Приложение №1. – С.99-105.
4. Марьина Н.М., Шетекаури С.А., Ольховский И.А. Возможности ранней лабораторной диагностики клещевых нейроинфекций: клещевого энцефалита и Лайм-боррелиоза // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – №7, Прил. 1. – С.55-57.
5. Нефедова В.В., Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И. и др. Изоляция возбудителя иксодового клещевого боррелиоза из крови больных // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – №1. – С.63-66.
6. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В. и др. Серонегативный вариант эритемной формы иксодовых клещевых боррелиозов // Национальные приоритеты России. Спец. выпуск. – 2011. – №2. – С.177-179.
7. Шетекаури С.А., Ольховский И.А., Марьина Н.М., Солохина Д.В. Выявление новых клинических форм клещевых инфекций в Красноярском крае // Неврологический журнал. – 2005. – №3. – С.10-13.
8. Chmielewska-Badora J., Cisak E., Wojcik-Fatla S., et al. Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis // Ann. Agric. Environ. Med. – 2006. – Vol. 13. – P.307-311.
9. Fomenko N.V., Livanova N.N., Chernousova N.Y. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in natural foci of Novosibirsk region // Int J Med Microbiol. – 2008. – Vol. 298 S1. – P.139-148.
10. Kondrusik M., Grygorczuk S., Skotarczak B., et al. Molecular and serological diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection among patients with diagnosed *Erythema migrans* // Ann. Agric. Environ. Med. – 2007. – Vol. 14. – P.209-213.
11. Mediannikov O.Y., Ivanov L., Zdanovskaya N., et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russian Far East // Microbiol. Immunol. – 2005. – Vol. 49. – P.191-197.
12. Nowakowski J., Schwartz L., Liveris D., et al. Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 33. – P.2023-2027.
13. Ornstein K., Berglund J., Nilsson, Norrby R.I., Bergström S. Characterization of Lyme borreliosis isolates from patients with erythema migrans and neuroborreliosis in southern Sweden // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P.1294-1298.
14. Strle F., Ruzic-Sabljic E., Cimperman J., et al. Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid // Clin. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 43. – P.704-710.
15. Wilske F. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis // Ann. Med. – 2005. – Vol. 37. – P.568-579.

**Информация об авторах:** Фоменко Наталия Владимировна – к.б.н., 630128, г.Новосибирск, ул. Пасечная, 3, ЗАО «Вектор-Бест», e-mail: nataliyaf@ngs.ru; Шперлинг Михаил Моисеевич – врач невролог, 630099, Новосибирск ул. Семьи Шамшиных, 40, тел. (383) 218-17-61, e-mail: shperlingmihail@yandex.ru; Боргояков Вячеслав Юрьевич – аспирант, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, тел. (383) 363-51-37, e-mail: ternsu@gmail.com; Романова Екатерина Владимировна – врач инфекционист, 630099, Новосибирск ул. Семьи Шамшиных, 40, тел. (383) 218-17-61, evlrom@list.ru; Епихина Тамара Ивановна – м.н.с., ИХБФМ СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, тел (383) 363-51-37.

© ДАНЧИНОВА Г.А., ЛЯПУНОВ А.В., ХАСНАТИНОВ М.А., ЧАПОРГИНА Е.А., АРБАТСКАЯ Е.В., ПЕТРОВА И.В., САВЕЛЬКАЕВА М.В., ГОРБУНОВА Е.Л., ТУНИК Т.В. – 2012  
УДК 616-036.22

#### ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЩАЕМОСТИ ЛЮДЕЙ, ПОСТРАДАВШИХ ОТ УКУСОВ КЛЕЩЕЙ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ И ЗА ЕЕ ПРЕДЕЛАМИ

Галина Анатольевна Данчинова, Александр Валерьевич Ляпунов, Максим Анатольевич Хаснатинов, Елена Александровна Чапоргина, Елена Валентиновна Арбатская, Ирина Викторовна Петрова, Марина Владимировна Савелькаева, Елена Леонидовна Горбунова, Татьяна Владимировна Туник (Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, г. Иркутск, директор – член-корр. РАМН, проф., д.м.н. Л.И. Колесникова, лаборатория трансмиссивных инфекций, руководитель – д.б.н. Г.А. Данчинова)

**Резюме.** В статье впервые приводятся результаты исследований материалов почти 34,5 тыс. человек, обратившихся в Центр диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (г. Иркутск, Россия) по факту укусов иксодовых клещей, произошедших в 25 административных территориях России, в том числе в Иркутской области, Республике Бурятия, других регионах России и 10 странах мира за последние пять лет.

**Ключевые слова:** иксодовые клещи, клещевой энцефалит, клещевой боррелиоз, укусы клещей, диагностика, профилактика, Иркутская область, Республика Бурятия, регионы России, страны мира.

#### ECO-GEOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF APPEALABILITY OF PEOPLE, SUFFERED FROM TICK BITE IN IRKUTSK REGION AND IN OTHER TERRITORIES

G.A. Danchinova, A.V. Liapunov, M.A. Khasnatinov, E.A. Tchaporgina, E.V. Arbatskaya, I.V. Petrova, M.V. Savelkaeva, E.L. Gorbunova, T.V. Tunik  
(The Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction of SD RAMS, Irkutsk, Russia)

**Summary.** In this paper for the first time we present the results of study of materials from almost 34.5 thousand people attending a Center for diagnosis and prevention of tick-borne infections FGBU “Scientific Center of Family Health, and Human Reproduction” RAMS (Irkutsk, Russia), being bitten by ticks, that have occurred in 25 administrative territories of Russia, including the Irkutsk region, the Republic of Buryatia, and other regions of Russia and 10 foreign countries during the last five years.

**Key words:** ticks, tick-borne encephalitis, tick-borne Lyme disease, tick bites, diagnosis, prevention, Irkutsk region, Buryatia, Russia's regions, the countries of the world.

В Центр диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (г. Иркутск, Россия) ежегодно обращается, получает консультативную, диагностическую и, в случае обнаружения антигена вируса клещевого энцефалита (КЭ), боррелий или антител к спектру клещевых инфекций, профилактическую помощь от 6,5 до 8 тыс. человек, пострадавших от укусов иксодовых клещей на территории Российской Федерации и других стран мира. Благодаря качественно и в срок проведенным исследованиям и профилактике, удается предотвратить до 1000 заболеваний КЭ, клещевым боррелиозом (КБ) у людей, своевременно обратившихся в Центр клещевых инфекций.

Цель работы: провести анализ обращаемости населения в Центр диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (г. Иркутск, Россия) с укусами иксодовых клещей по территориям России и стран мира за 2007-2011 гг.

### Материалы и методы

За последние пять лет, включая 2011 г., в Центр диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН обратилось около 34,5 тыс. человек, подвергшихся нападению иксодовых клещей как в Прибайкалье, так и в других регионах России и мира, в том числе в Республике Монголия. Сведения об обстоятельствах укусов содержатся в зарегистрированных нами электронных базах данных [2,3]. Для выявления антигена ВКЭ проводили иммуноферментный анализ суспензии клеща с помощью тест-систем «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-Бест, Новосибирск), «ИФА ТС АГ ВКЭ» (Микроген, Томск), а при отсутствии или непригодности клеща для исследования анализировали сыворотки крови с помощью тест-систем «ИФА ТС АГ ВКЭ» (Микроген, Томск) согласно инструкции производителей. Исследование клещей на зараженность *Borrelia burgdorferi sensu lato* проводили с помощью прямой микроскопии препарата из содержимого кишечника клеща, окрашенного по Романовскому-Гимза с доокраской кристаллическим фиолетовым [5].

### Результаты и обсуждение

Укусы людей произошли на территориях 25 регионов Российской Федерации – 99,6% и 10 государств мира – 0,4% (рис. 1).

Большинство этих людей – 99,7% подверглось укусу клеща на территории Прибайкалья (табл. 1): в Иркутской области (в окрестностях крупных городов, разветвленных на несколько оживленных транспортных магистралей, садоводствах, различных местах отдыха и сбора лекарственных трав, черемши, папоротника, ягод, грибов и кедровых орехов) и Республике Бурятия (около 4,5%, в основном в Тункинской долине: п. Аршан, Нилова пустынь или на юго-восточном побережье оз. Байкал: п. Выдрино, Теплые озера). Эти местности также являются излюбленными местами для лечения, отдыха, сбора ягод и грибов.



\* - в России, ▲ - за рубежом.

Рис. 1. Карта-схема территорий, где люди подверглись укусам иксодовых клещей (по материалам Центра диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН).

86 человек, пострадавших от укусов клещей за пределами Иркутской области и Бурятии, подверглись нападению клеща в регионах от Урала до Дальнего Востока. Более половины из этих случаев укусов произошло на территориях регионов, граничащих с Иркутской областью и Бурятией: в Красноярском крае – 23, в Забайкальском – 27 человек. Укусы людей в этих краях регистрировались ежегодно.

Таблица 1

Многолетняя динамика обращений людей, подвергшихся укусу клещей в регионах России, 2007–2011 гг.

Регион/годы	2007	2008	2009	2010	2011	Всего
1. Алтайский край	1	1	1	1	1	5
2. Амурская область	1	-	3	1	1	6
3. Бурятия	241	227	341	349	381	1539
4. Владимирская область	-	-	1	-	-	1
5. Еврейская автономная область	-	1	1	-	-	2
6. Забайкальский край	4	1	3	8	11	27
7. Иркутская область	5773	6378	6939	7301	6143	32534
8. Калужская область	-	-	-	1	1	2
9. Кемеровская область	1	-	1	5	-	7
10. Кировская область	-	-	1	-	-	1
11. Краснодарский край	-	-	1	-	1	2
12. Красноярский край	5	2	4	10	2	23
13. Московская область	-	2	2	-	2	6
14. Новосибирская область	1	1	2	1	1	6
15. Омская область	-	-	1	1	-	2
16. Орловская область	1	-	-	-	-	1
17. Рязанская область	-	1	-	-	-	1
18. Свердловская область	-	-	-	-	1	1
19. Ставропольский край	-	-	-	2	-	2
20. Тверская область	-	-	-	1	-	1
21. Томская область	-	-	1	-	1	2
22. Тульская область	-	-	1	-	-	1
23. Тюменская область	-	-	-	1	-	1
24. Хабаровский край	-	-	1	-	1	2
25. Якутия (Республика Саха)	1	-	1	-	-	2
Всего	6029	6614	7305	7682	6547	34177

Известно о 10 случаях укусов клещей на административных территориях Дальнего Востока (Амурская область, Еврейская автономная область, Хабаровский край). Эти регионы относятся к зонам высокого риска заражения вирусом КЭ дальневосточного генотипа, часто приводящему к инвалидизации и даже летальному

исходу.

Два человека подверглись укусу клеща в Республике Якутия (Саха), что является еще одним доказательством наших данных о расширении к северу границы ареала иксодовых клещей [4].

23 случая укусов людей наблюдались в регионах Западной Сибири (Алтайский край, Кемеровская, Новосибирская, Омская, Томская и Тюменская области). При этом отмечались ежегодные обращения людей с укусами клещей в Алтайском крае и Новосибирской области. Единичные обращения наблюдались из Свердловской и Тюменской областей.

В экосистемах Западной Сибири и Урала обитают клещи, не только встречающиеся в фауне иксодид Восточной Сибири, но и другие виды, являющиеся переносчиками туляремии, клещевого сыпного тифа, чумы человека и домашних животных (например, *D. marginatus*) и других инфекций [4,7,8].

Часто ввиду удаленности территорий или других причин люди, пострадавшие от укусов клещей в других регионах, не могли доставить клещей, пригодных для видового определения и анализа, и поэтому большинство из них исследовали на наличие антигена вируса КЭ сыворотки крови.

Всего из этих территорий было доставлено 20 экз. клещей. 19 особей были определены как самки *Ixodes persulcatus* P. Sch., 1931 (таежный клещ). Одна самка принадлежала роду *Dermacentor*, снята в Амурской области с мужчины 32 лет в сентябре 2007 г. Антиген вируса КЭ выявлен в одном из пяти таежных клещей из Алтайского края (Белокуриха, 2011 г.). В шести самках таежного клеща были выявлены боррелии (Красноярский край – 3, Кемеровская, Омская и Томская области – по одной).

При исследовании 66 образцов сывороток крови антиген ВКЭ обнаружен в пробах из Красноярского края (2007, 2008, 2010 гг.). Инфицированность ВКЭ в этом регионе была высокой (в среднем 13%) и варьировала от 10 до 50%.

Ежегодно отмечается обращаемость с укусами иксодовых клещей людей, вернувшихся из поездок в Европейскую часть России – 19 случаев в 11 регионах (табл. 1). Эти укусы происходили как в южных регионах (Краснодарский и Ставропольский края), где преобладают степные экосистемы, так и в центральной России (Владимирская, Калужская, Кировская, Московская, Орловская, Рязанская, Тверская, Тульская и Ярославская области) – в зоне смешанных и хвойных лесов. На территории Московской области зарегистрировано по два укуса в течение трех лет и в Калужской области – по одному укусу в 2010 и 2011 гг., в остальных областях по одному случаю.

Было исследовано 6 клещей, снятых с людей, пострадавших от укусов в Европейской части России. Пять особей идентифицированы как самки клещей рода *Ixodes* (Подмосковье – две, Калужская, Владимирская и Ярославская области – по одной). Шестой клещ (самец) определен как *Dermacentor pictus* (Herm, 1804) [8]. По результатам ИФА самка таежного клеща из окрестностей г. Ярославля, снятая с мужчины 46 лет, была инфицирована ВКЭ. Возбудители клещевого боррелиоза в этих клещах не обнаружены.

Анализ 13 образцов сывороток крови из Европейских регионов показал наличие антигена ВКЭ в двух пробах от людей, подвергшихся укусу в Краснодарском крае (г. Сочи, 2009 г. и г. Анапа, 2011 г.). Это обстоятельство имеет важное значение в связи с частым посещением этих привлекательных мест отдыха как иркутян, так и жителей других регионов.

#### Зарубежные государства

Кроме случаев обращений населения с укусами клещей на территориях разных регионов РФ встречаются люди, пострадавшие от укусов иксодовых клещей за пределами Российской Федерации (табл. 2).

К настоящему времени известно об 11 обращениях людей, подвергшихся укусам клещей на территории

Таблица 2

Многолетняя динамика обращений людей, подвергшихся укусу клещей в других странах мира, 2007–2011 гг.

Страны/годы	2007	2008	2009	2010	2011	Всего
1. Германия	-	1	1	-	2	4
2. Италия	-	-	1	-	-	1
3. Казахстан	1	-	-	-	-	1
4. Монголия	1	-	2	1	1	5
5. Польша	-	-	1	-	-	1
6. США	-	2	1	-	-	3
7. Турция	-	1	-	-	-	1
8. Украина	2	-	-	-	1	3
9. Швеция	-	1	-	-	-	1
10. Чехия	-	-	-	-	1	1
Всего	4	5	6	1	5	21

Европы (Германия, Украина, Италия, Польша, Швеция, Чехия), о семи – в Азии (Монголия, Казахстан, Турция), о трех – в Северной Америке (США). Среди этого континента преобладают российские граждане, посещавшие зарубежные государства с различной целью.

Подобного рода случаи интересны в связи с тем, что в большинстве стран, о которых идет речь, состав фауны клещей отличается от такового в Восточной Сибири. Например, в США обычными являются следующие виды клещи: *Ixodes scapularis* (Say, 1821), *Amblyomma americanum* (L., 1758) и др. [9]. В странах Европы, а также в западных регионах нашей страны – одним из доминантов является *Ixodes ricinus* (L., 1758). Также там обитают клещи рода *Dermacentor*: *D. reticulatus* (Fabricius, 1794), *D. pictus* (Herm, 1804), *D. marginatus* (Sulzer, 1776). В экосистемах Казахстана обычны виды *D. pictus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus* (Sulzer, 1776), также встречаются: *D. niveus* (Neumann, 1897), *D. ushakovae* (Filippova et Panova, 1987); *I. apronophorus* (Schulze, 1924), *I. ricinus* (L., 1758), *H. punctata* (Canestrini et Fanzago, 1878), *Rhipicephalus rossicus* (Yakimov et Kol-Yakimova, 1911), *R. pumilio* (Schulze, 1935), *Hyalomma* sp. и ряд других видов [1,5]. В Турции и регионах Южного и Кавказского федеральных округов отмечаются укусы людей клещами рода *Hyalomma*, (например *H. anatolicum* (Koch), *H. scupence* (Sch), *H. detritum* (Sch) и *H. marginatum* (Koch)), рода *Haemaphysalis* (например, *H. punctata* (Canestrini & Fanzago, 1878), *H. sulcata* (Canestrini & Fanzago, 1878)) или рода *Rhipicephalus* (например, *R. bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878), *R. turanicus* (Pomerantsev 1936) и *R. sanguineus* (Latreille, 1806)) и клещи вида *Boophilus calcaratus* (Bir) [8].

Эти и другие виды клещей представляют реальную опасность инфицирования населения неизвестными для Прибайкалья патогенами.

Исследование клещей, снятых с людей, подвергшихся укусам клещей на территориях иностранных государств, или сывороток крови этих людей на наличие антигена ВКЭ показало отрицательный результат. У самки *I. persulcatus*, от укуса которой пострадала женщина в середине июля 2010 г. в Монголии, были обнаружены боррелии.

Во всех случаях обращений людей с укусами иксодовых клещей, произошедшими за пределами Иркутской области и Республики Бурятия, при положительном результате исследования клещей или сывороток крови, была рекомендована и проведена соответствующая профилактика. Через полтора-два месяца после проведенных профилактических мероприятий контрольными исследованиями была подтверждена 100%-ная эффективность иммуноглобулино- и антибиотико-профилактики.

Анализ материалов исследований показал большую научную и практическую значимость проведенных исследований. Следует знать, что в любое время могут быть обнаружены новые для Прибайкалья виды иксодовых клещей, инфицированные неизвестными и/или новыми патогенами, и, как следствие, новые инфекции, до настоящего времени не выявленные в регионе. В

практическом плане в связи с появлением новых инфекций у специалистов медицинских учреждений могут возникнуть затруднения в постановке диагноза и

лечении таких пациентов.

Исследование проведено при поддержке грантов РФФИ: 08-04-90206 и 11-04-92221.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Атлас распространённости бактериальных и вирусных зоонозных инфекций в Казахстане / Под ред. Л.А. Бурделова. – Алматы, 2010. – 122 с.
2. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Петрова И.В. и др. Информационно-справочная система «Пациенты, подвергшиеся укусу клеща, результаты лабораторных исследований их клещей и сывороток крови, и меры профилактики» (ИСС «Клещи») // Электронный бюллетень – Программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем. – М., 2009. – №1. – С.431-432.
3. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Петрова И.В. и др. Информационно-справочная система «Пациенты, подвергшиеся укусу клеща, и результаты лабораторных исследований их сывороток крови» (ИСС «Антитела») // Электронный бюллетень – Программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем. – М., 2009. – №1. – С.42.
4. Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Шулунов С.С.

- и др. Фауна и экология популяций иксодовых клещей-переносчиков клещевых инфекций в Прибайкалье // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2007. – Т. 55. №3. Прил. – С.86-89.
5. Коренберг Э.И. Методические указания по эпидемиологии, диагностике, клинике и профилактике болезни Лайма. – М., 1991. – 61 с.
6. Сердюкова Г.В. Иксодовые клещи фауны СССР. – М., Л.: Изд-во АН СССР, 1956. – 122 с.
7. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. Ixodinae. // Фауна России и сопредельных стран. Т. IV (4): Паукообразные. – Л.: Наука, 1977. – 396 с.
8. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. Amblyomminaе. // Фауна России и сопредельных стран. Т. IV (5): Паукообразные. – СПб.: Наука, 1997. – 383 с.
9. Scott J.D., Fernando K., Banerjee S.N., et al. Birds disperse ixodid (Acari: Ixodidae) and *Borrelia burgdorferi* – infected ticks in Canada // J. Med. Entomol. – 2001. – Vol. 38. №4. – P.493-500.

**Информация об авторах:** 664025, Иркутск, Карла Маркса, 3, ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН Данчинова Галина Анатольевна – д.б.н., руководитель лаборатории, тел. (3952) 333971, e-mail: dan-chin@yandex.ru; Ляпунов Александр Валерьевич – к.б.н., н.с.; Хаснатинов Максим Анатольевич – к.б.н., с.н.с.; Чапоргина Елена Александровна – к.б.н., с.н.с.; Арбатская Елена Валентиновна – н.с. лаборатории; Петрова Ирина Викторовна – руководитель центра; Савелькаева Марина Владимировна – заведующая отделением; Горбунова Елена Леонидовна – врач-гастроэнтеролог; Туник Татьяна Владимировна – м.н.с.

© БАЛАХОНОВ С.В., НИКИТИН А.Я., АНДАЕВ Е.И., АЛЛЕНОВ А.В., БОРИСЕНКО Е.А., ЗВЕРЕВА Т.В., ГОРДЕЙКО Н.С., КРАСНОЩЕКОВ В.Н., АДЕЛЬШИН Р.В., БОРИСОВА Т.И., ВЕРЖУЦКАЯ Ю.А., ВЕРШИНИН Е.А., СИДОРОВА Е.А. – 2012  
УДК: 616.988.25

#### ЭКОЛОГО-ПАЗИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВМЕЩЕННЫХ ОЧАГОВ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ КЛЕЩАМИ, НА ТЕРРИТОРИИ ПРОВЕДЕНИЯ САММИТА АТЭС (2012 Г.)

Сергей Владимирович Балахонов<sup>1</sup>, Алексей Яковлевич Никитин<sup>1</sup>, Евгений Иванович Андаев<sup>1</sup>, Александр Васильевич Алленов<sup>2</sup>, Елена Александровна Борисенко<sup>2</sup>, Татьяна Викторовна Зверева<sup>2</sup>, Наталья Станиславовна Гордейко<sup>2</sup>, Виктор Николаевич Краснощекоев<sup>2</sup>, Ренат Викторович Адельшин<sup>1</sup>, Татьяна Ивановна Борисова<sup>1</sup>, Юлия Алексеевна Вержущая<sup>1</sup>, Евгений Александрович Вершинин<sup>1</sup>, Елена Анатольевна Сидорова<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, директор – д.м.н., проф. С.В. Балахонов; <sup>2</sup>Приморская противочумная станция, директор – к.м.н. А.В. Алленов)

**Резюме.** В сентябре 2012 г. на о. Русский (Приморский край) планируется проведение Саммита АТЭС. Прибытие многочисленных участников мероприятия предполагает необходимость оценки опасности их заражения трансмиссивными инфекциями, передаваемыми иксодовыми клещами. В этой связи сотрудниками ФКУЗ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора и ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в 2011 г. и проведено совместное эпидемиологическое обследование территории острова. Отловлено шесть видов мелких грызунов (*Apodemus speciosus* Temminck, *A. agrarius* Pallas, *Microtus taximoviczhii* Schrank, *Clethrionomys rufocanus* Sundevall, *Rattus norvegicus* Berkenhout, *Eutamias sibiricus* Laxmann). Собрано с растений пять видов клещей (*Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskiy*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*, *Dermacentor silvarum*). Показано наличие на острове природных очагов клещевого энцефалита, клещевых боррелиозов и риккетсиозов, моноцитарного эрлихиоза. В качестве более эпидемиологически опасных оцениваются лесные биотопы. Рассмотрен комплекс мер профилактики, необходимых для предотвращения заболеваемости участников Саммита и местного населения инфекциями, передаваемыми иксодовыми клещами.

**Ключевые слова:** клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы, профилактика, фауна иксодовых клещей, Приморский край.

#### ECOLOGICAL-PARASITOLOGIC CHARACTERISTIC OF THE COMBINED TICK-BORNE INFECTION FOCI ON THE TERRITORY OF APEC SUMMIT HOLDING IN 2012

S.V. Balakhonov<sup>1</sup>, A.Ya. Nikitin<sup>1</sup>, E.I. Andaev<sup>1</sup>, A.V. Allenov<sup>2</sup>, E.A. Borisenko<sup>2</sup>, N.S. Gordeiko<sup>2</sup>, T.V. Zvereva<sup>2</sup>, V.N. Krasnoschekov<sup>2</sup>, R.V. Adelshin<sup>1</sup>, T.I. Borisova<sup>1</sup>, Yu.A. Verzhutckaya<sup>1</sup>, E.A. Vershinin<sup>1</sup>, E.A. Sidorova<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk;  
<sup>2</sup>Primorye Antiplague Station of Rospotrebnadzor, Ussuriisk, Nakhodka)

**Summary.** Summit of Asian Pacific Economical Cooperation (APEC) is planned in September 2012 at the Russian (Primorye Territory) island. Numerous participants are expected. It is necessary to evaluate the danger of their possible contamination with infections, transmitted by Ixodes ticks. Therefore, employees of Primorye Antiplague Station and Irkutsk Antiplague Research Institute conducted a joint epidemiological inspection of the island territory in 2011. Six species of

small rodents (*Apodemus (Alsomys) peninsulae* Thom., *A. agrarius* Pallas, *Clethrionomys rufocanus* Sundevall, *Microtus (Alexandromys) fortis* Buchn., *Tamias (Eutamias) sibiricus* Laxm., *Rattus norvegicus* Berkenhout) were caught. Five species of ticks (*Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*, *Dermacentor silvarum*) were collected from plants. Natural foci of tick-borne encephalitis, tick-borne borrelioses and rickettsioses, monocytic ehrlichiosis were revealed. Sylvan biotopes were evaluated as the most dangerous. The complex of the preventive measures to prevent tick-borne infections in the Summit participants and the local population is proposed.

**Key words:** Tick-borne encephalitis, borreliosis transmitted by Ixodes ticks, preventive measures, tick fauna, Primorye Territory.

На ранее закрытом для свободного посещения о. Русский в настоящее время развернуто масштабное строительство объектов Дальневосточного федерального университета, Приморского океанариума, моста, связывающего остров с материком, жилого сектора, сооружений, предназначенных для участников Саммита АТЭС. Только количество работающих на возведении этих объектов в 2011 г. более чем в два раза превысило число проживающих на острове жителей [7]. Рост постоянно и длительно находящегося на острове населения, антропогенная трансформация его природных биотопов, могут повлечь изменение эпидемиологической обстановки по природно-очаговым заболеваниям, в том числе по инфекциям, передаваемым иксодовыми клещами. В этой связи сотрудниками Приморской противочумной станции и Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора весной и осенью 2011 г. проведено совместное эпизоотолого-эпидемиологическое обследование территории острова, изучен видовой состав и дана оценка встречаемости, численности и зараженности возбудителями зоонозов иксодовых клещей и мелких млекопитающих.

Цель работы: оценка эпидемиологического риска возникновения трансмиссивных заболеваний, передаваемых иксодовыми клещами, на участках острова с различной степенью антропогенной трансформации и предложение мер их профилактики.

### Материалы и методы

Для отлова мелких млекопитающих в сентябре 2011 г. использованы ловушки Геро с хлебом в качестве приманки. В ходе работ выставлено в пяти районах острова 10 линеек и накоплено 1800 ловушко-ночей, отловлено 97 грызунов. Определение видовой принадлежности отловленных животных проведено по И.М. Громову и М.А. Ербаевой [4].

Сбор клещей выполняли на флаг с растений стандартным методом [12] в мае 2011 г. Всего отработано 18 часов, пройдено около 60 км маршрутов. Наиболее полно обследованы территории, окружающие бухты Воеводиха, Рында, полуостров Саперный. Координаты точек массовых сборов клещей определены по GPS-навигатору: N 43,00° E 131,79°; N 43,02° E 131,80°; N 42,98° E 131,91°. При определении вида иксодовых клещей пользовались определителями [9,15].

Выявление РНК/ДНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), патогенных геномовидов боррелий (*Borrelia burgdorferi* и др.) – возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), эрлийи (*Ehrlichia chaffeensis*) – моноцитарного эрлийиоза человека (МЭЧ) и анаплазм (*Anaplasma phagocytophilum*) – гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) проводили с помощью мультиплексной тест-системы АмплиСенс (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва). ДНК риккетсий (КР) – методом ПЦР с набором реактивов ЗАО «Синтол» (г. Москва) и праймерами RTF (5'-GTGGTGGCGGATCGC-AGAGATGCT-3'), RTR1 (5'-TCGCCGTCTTGCTTCCCTCTGTAAACA-3'), комплементарными участку гена 16SpPHK микроорганизмов порядка Rickettsiales. В последующем для выявления микроорганизмов рода Rickettsia использовали праймеры, комплементарные участку гена ompB RtsfF (5'-GGGTGTAGGTCAGAACGTTA-CAACATTT-3'), RtsfR (5'-CCAGCTAA-ACCGCCTTTCTTACTTT-3'), кодирующего поверхностный белок риккетсий.

Содержание антигена ВКЭ в иксодовых клещах изучено методом иммуноферментного анализа (ИФА), с применением тест-системы ЗАО «Вектор-Бест» (п. Кольцово, Новосибирская область).

Для статистической обработки материалов использованы z-критерий. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$  [10].

### Результаты и обсуждение

По степени антропогенной трансформации и активности посещения населением на острове выделено два типа территорий: лесные участки (занимают 7500 из 10000 га), представленные преимущественно широколиственным лесом и нарушенные биотопы (антропогенно трансформированные), на которых находятся пастбища, поселки, базы отдыха, остатки фортификационных сооружений и т.п. Несмотря на то, что леса на острове также подвержены выраженному воздействию человеческого фактора (например, сбор клещей проведен по обочинам троп и дорог, пересекающих их), однако оно менее значительно, чем в антропогенно трансформированной зоне.

При отлове грызунов в полидоминантном широколиственном лесу на различных участках острова накоплено 800 ловушко-ночей. Обилие мелких млекопитающих колебалось от 4 до 5,5% попадений. Отловлены восточно-азиатская мышь (*Apodemus (Alsomys) peninsulae* Thom.), красно-серая полевка (*Clethrionomys rufocanus* Sundevall) и полевая мышь (*A. agrarius* Pallas) при абсолютном доминировании (89,5%) первого вида. Исследование мозга животных методом ОТ-ПЦР выявило РНК ВКЭ у восьми особей только восточноазиатской мыши, что составило 21,1% общего числа ( $n=38$ ), отловленных в биотопе грызунов.

Антропогенно трансформированный ландшафт характеризуется более высоким видовым разнообразием прокормителей преимагинальных фаз развития клещей. В 1000 выставленных на ночь ловушек отловлены зверьки шести видов (*A. (A.) peninsulae*, *A. agrarius*, *Microtus (Alexandromys) fortis* Buchn., *C. rufocanus*, *Tamias (Eutamias) sibiricus* Laxm., включая синантропный – *Rattus norvegicus* Berkenhout – серую крысу). Обилие зверьков по учетам колебалось от 3 до 8 попадений на 100 ловушко-ночей. Доминирующий вид – полевая мышь (*A. agrarius*), субдоминант – большая (синоним восточная) полевка (*M. (A.) fortis*). ВКЭ выявлен методом ОТ-ПЦР в мозге 14 особей (в том числе у одной серой крысы), что составляет  $23,7 \pm 5,54\%$  количества исследованных грызунов из антропогенно трансформированных биотопов ( $n=59$ ). Различия в зараженности ВКЭ грызунов из двух типов зон статистически незначимы ( $p>0,05$ ).

На острове зарегистрированы иксодовые клещи пяти видов: *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930; *I. pavlovskyi* Pomerantzev, 1946; *Haemaphysalis concinna* Koch 1844; *H. japonica douglasi* Nuttall et Warburton, 1915; *Dermacentor silvarum* Olenov, 1932. Суммарная численность иксодовых клещей колебалась по учетам от 9,0 до 63,0 особей на флажок/час. Все обнаруженные виды теоретически могут участвовать в обеспечении циркуляции в природных очагах ВКЭ, боррелий, риккетсий и других возбудителей зоонозов [1,5,6,13,14]. Поэтому все они, кроме *D. silvarum*, представленного в сборах единично, изучены на зараженность этими и другими патогенами.

Исследование имаго на наличие антигена ВКЭ методом ИФА (табл. 1) дало положительные результаты только для *I. persulcatus* – таежного клеща. Подчеркнем, что в ИФА регистрируются клещи с высоким содержанием вируса, доля которых в популяциях незначительна [2]. Но именно вирусофорность клещей, выявленная в ИФА, рассматривается как показатель эпидемиологи-

ландшафте и в лесном биотопе (51,2±7,81 и 32,5±7,41 соответственно) статистически не значимы ( $p>0,05$ ). Однако низкое обилие *I. persulcatus* вне лесной зоны, где преобладает *H. concinna*, у которого боррелии регистрируются в десять раз реже, позволяет считать более опасными в отношении этой нозологической формы лесные территории.

Таблица 1

Анализ зараженности возбудителями зоонозов имаго иксодовых клещей, собранных на флаг с растений на о. Русский в зоне лесов (обозначено А) и на антропогенно трансформированных участках (Б)

Возбудитель	Метод детекции возбудителя	Биотоп	<i>I. persulcatus</i>		<i>H. concinna</i>		Достоверность (р) межвидовых различий
			всего	% зараженных	всего	% зараженных	
Вирус клещевого энцефалита	ИФА	А	39	7,7±4,27	17	5,0±4,99*	>0,05
		Б	37	2,7±2,67	26	3,4±3,45*	>0,05
		Статистическая значимость (р) между биотопами		>0,05	-	>0,05	-
Вирус клещевого энцефалита	ПЦР	А	40	22,5±6,60	27	18,5±7,48	>0,05
		Б	41	17,1±5,88	238	1,3±0,72	<0,001
		Статистическая значимость (р) между биотопами		>0,05	-	<0,001	-
Боррелии	ПЦР	А	40	32,5±7,41	27	3,7±3,63	<0,01
		Б	41	51,2±7,81	238	0,4±0,41*	<0,001
		Статистическая значимость (р) между биотопами		>0,05	-	<0,05	-
Риккетсии	ПЦР	А	36	58,3±8,22	10	10,0±9,49	<0,01
		Б	31	64,5±8,59	19	4,8±4,54*	<0,001
		Статистическая значимость (р) между биотопами		>0,05	-	>0,05	-
Эрлихии	ПЦР	А	34	5,9±4,04	10	0	>0,05
		Б	29	3,4±3,39	22	0	>0,05
		Статистическая значимость (р) между биотопами		>0,05	-	>0,05	-

Примечание: \*фактически определенная зараженность 0, но в силу экспериментально установленной возможности наличия данного вида возбудителя у *H. concinna* проведен расчет вероятной зараженности по методу Ван-дер-Вардена [10].

ческой опасности очага, причем, если вирусофорность выше 2,5%, то они считаются активными [2]. Более важное эпизоотическое значение таежного клеща ожидаемо, т.к. на территории Сибири и Дальнего Востока именно он является основным резервуаром и переносчиком ВКЭ [1,5-7,13,14]. Статистически значимых различий в зараженности ВКЭ особей таежного клеща из биотопов двух типов зон не выявлено (лес – 7,7±4,27; антропогенно трансформированный – 2,7±2,67;  $p>0,05$ ). По данным Л.М. Сомовой средняя за пять лет (2007-2011 гг.) зараженность ВКЭ иксодовых клещей на острове составляет 1,4% [13], то есть, полученные оценки вполне сопоставимы, а показатели вирусофорности устойчивы.

Исследование вирусофорности имаго клещей в ПЦР по всем имеющимся сборам, показало, что доля зараженных особей таежного клеща статистически значимо ( $p<0,001$ ) выше, чем *H. concinna* (20,4% и 2,5% соответственно). Более высокие показатели вирусофорности для клещей в ПЦР, чем в ИФА (табл. 1), отражают большую чувствительность этого метода.

Выявлена статистически значимо ( $p<0,001$ ) более высокая вирусофорность у имаго *H. concinna*, собранных в лесу (при их низком обилии), по сравнению с особями этого же вида, происходящих с антропогенно трансформированных территорий (18,5% и 1,3% соответственно). По-видимому, это связано с тем, что *H. concinna*, обитающие в границах природного очага КЭ с доминирующим более вирусофорным таежным клещом, имеют повышенную вероятность быть вовлеченными в эпизоотический процесс [6]. Суммарно по всем типам сборов патогенные для человека боррелии комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* выявлены в ПЦР у трех видов клещей: *I. persulcatus* – 40,8%, *I. pavlovskyi* – 36,0% и *H. concinna* – 0,3%. Между зараженностью первого и последнего видов различия высокозначимы ( $p<0,001$ ). Не зарегистрированы боррелии в *H. j. douglasi*, но исследовано только 13 имаго.

Различия в уровне зараженности боррелиями между видами рода *Ixodes*, а также у особей *I. persulcatus* (табл. 1), собранных в антропогенно трансформированном

Исследование методом ПЦР зараженности имаго иксодовых клещей риккетсиями показало более высокую зараженность таежного клеща по сравнению с *H. concinna* как при сборе имаго в лесу (58,3% и 10,0% соответственно;  $p<0,01$ ), так и в антропогенно трансформированных биотопах (64,5% и 4,8%;  $p<0,001$ ). Высокая зараженность *I. persulcatus* риккетсиями, в том числе патогенными для человека, известна и для других эндемичных по КР территорий [5]. В дальнейшем необходима видовая идентификация спектра выявляемых на острове представителей этой группы возбудителей.

При исследовании в ПЦР иксодовых клещей на зараженность эрлихиями и анаплазмами возбудитель МЭЧ выявлен в трех особях *I. persulcatus* (4,8%) и одной *I. pavlovskyi* (5,9%). Возбудитель ГАЧ не выявлен ни в одном из иксодовых клещей (всего исследовано 123 имаго четырех видов).

Несомненно, что достаточно высокая численность и зараженность различными патогенами массовых видов иксодовых клещей на о. Русский, позволяют сделать вывод о существующей для населения эпидемиологической опасности в отношении зоонозов, передающихся с укусами этих переносчиков. Случаи заболевания людей на острове КЭ и ИКБ известны [7]. У доминирующего на лесных территориях *I. persulcatus* выявлены возбудители четырех нозологических форм: ВКЭ, боррелии, риккетсии, эрлихии. У доминирующего по обилию в антропогенно трансформированных биотопах *H. concinna* показана зараженность ВКЭ, боррелиями и риккетсиями.

Очевидно, что определенная эпидемиологическая опасность существует и для участников Саммита АТЭС, так как известно, что в сентябре, когда будет проходить мероприятие, активность иксодовых клещей в районах побережья Японского моря сохраняется [3,6]. Люди с присосавшимися иксодовыми клещами обращаются в медицинские учреждения Приморского края до конца октября [3], а тяжесть проявления клинических форм КЭ и смертность максимальны в поздне-летний, осенний период [6].



Риск контакта человека с иксодовыми клещами, в том числе зараженными патогенами, несомненно, зависит от целого ряда абиотических, биотических и социальных факторов. В нашем случае в первом приближении можно оценить его для каждого из типов биотопов как сумму произведений обилия массовых видов переносчика на экспериментально установленную их зараженность определенным возбудителем. Для примера рассмотрим две наиболее изученные точки: одна по дороге через лес вдоль реки Воеводиха (на ряде карт называется река Русская), где индекс обилия имаго иксодовых клещей (ИО) составил 40,0 особей на флажок/час; вторая – пастбище, заросшее бурьяном с ИО – 63,0. В зоне леса выявлено четыре вида иксодовых клещей: *I. persulcatus* (ИО 21,6), *H. concinna* (13,1); *I. pavlovskiyi* (3,2), *H. j. douglasi* (2,0). В зоне пастбища – три: *H. concinna* (ИО 58,0), *I. persulcatus* (2,1), *D. silvarum* (1,3). Расчет обилия зараженных особей переносчика для *I. persulcatus* и *H. concinna* в каждом типе биотопов приведен в таблице 2.

Обобщенная оценка обилия иксодовых клещей, зараженных возбудителями зоонозов (по данным ПЦР), в биотопах двух типов на острове Русский [*I. persulcatus* (ИО × Доля зараженных) + *H. concinna* (ИО × Доля зараженных)]

Возбудитель болезни	Вид клеща	Оцениваемый биотоп					
		Лесной			Антропогенно трансформированный		
		ИО	Доля зараженных	Суммарная оценка обилия зараженных имаго	ИО	Доля зараженных	Суммарная оценка обилия зараженных имаго
ВКЭ	<i>I. persulcatus</i>	21,6	0,23	7,4	2,1	0,17	1,0
	<i>H. concinna</i>	13,1	0,19		58,0	0,01	
Боррелии	<i>I. persulcatus</i>	21,6	0,33	7,6	2,1	0,51	3,4
	<i>H. concinna</i>	13,1	0,04		58,0	0,04*	
Риккетсии	<i>I. persulcatus</i>	21,6	0,58	13,8	2,1	0,65	4,3
	<i>H. concinna</i>	13,1	0,10		58,0	0,05*	

Примечание: \* фактически определенная зараженность в этом случае 0, но в силу экспериментально установленной возможности наличия данного вида возбудителя у *H. concinna* проведен расчет вероятной зараженности по методу Ван-дер-Вардена [10].

Рассчитанные показатели позволяют сравнивать разные очаги болезней и характеризуют их леймопотенциал [8]. Полученные оценки свидетельствуют, что наиболее высокая вероятность встретиться с зараженным тем или иным возбудителем иксодовым клещом существует при нахождении людей на дорогах, проходящих через лес. Кроме того, необходимо учитывать, что в биотопах, где доминирует *H. concinna*, риск нападения клещей этого вида на человека существенно ниже, чем в зонах преобладания таежного клеща, даже в случае их

### ЛИТЕРАТУРА

1. Болотин Е.И., Ананьев В.Ю., Бурухина Е.Г. Некоторые особенности экологии клещевых инфекций в Приморском крае // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – Владивосток, 2009. – Т. 38. №3. – С.63-65.
2. Бочкова Н.Г., Башкирцев В.Н., Левина Л.С. и др. Опыт применения иммуноферментного метода для индикации вируса клещевого энцефалита в различных очагах // Вопросы вирусологии. – 1990. – №2. – С.165-167.
3. Бурухина Е.Г., Жигаев Д.С., Жебровская Е.В., Хомичук Т.Ф. Об опыте проведения акарицидных обработок на территории Всероссийского детского центра «Океан» // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – Владивосток, 2009. – Т. 38. №3. – С.66-68.
4. Громов И.М., Ермаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий (зайцеобразные и грызуны). – СПб.: ЗИН РАН, 1995. – 540 с.
5. Козлова И.В., Злобин В.И., Воробьева М.С., Верхозина М.М. Экспресс-диагностика и экстренная профилактика иксодовых клещевых инфекций. – М.: БОРГЕС, 2009. – 216 с.
6. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае: вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты. – Владивосток: Дальнаука, 1997. – 190 с.
7. Маслов Д.В., Полякова М.В., Духова А.Ю. Об организации государственного надзора за объектами Саммита АТЭС за 9 месяцев 2011 г. // Матер. расшир. засед. Коллегии

одинакового обилия. Одни авторы связывают это с морфологическими особенностями строения гипостома *H. concinna* [1], другие – с тем, что люди лучше ощущают нападения особей этого вида [11]. Кроме того, вероятно, играет роль особый характер поведения *H. concinna*, проявляющийся во временном обездвиживании имаго после прикосновения к нему человека.

Выявленная сопряженность природных очагов болезней и предполагаемое прибытие на остров не вакцинированных от КЭ участников Саммита АТЭС, требует проведение мер неспецифической профилактики, в частности, акарицидных обработок потенциально опасных территорий, индивидуальное применение людьми акарицидно-репеллентных средств. Необходимо также создание пункта экспресс-диагностики, куда могут обратиться пострадавшие от укусов иксодовых клещей, с целью назначения экстренных мер профилактики.

Для последующего обеспечения эпидемиологического благополучия на о. Русский необходимо проведение

Таблица 2

эпизоотологического мониторинга его природных очагов и разработка перспективного плана комплекса мер по профилактике заболеваемости инфекциями, передающимися клещами. Несомненно, требуется проведение вакцинации населения от КЭ. Исходя из дальнейших наблюдений за из-

менениями численности и видового состава иксодовых клещей, должны быть намечены участки территорий острова, подлежащие обязательным акарицидным обработкам, объемы последних должны быть расширены по сравнению с современными [7]. Сроки обработок и их кратность требуют уточнения, но, судя по полученным к настоящему времени данным о численности и сезонной активности иксодовых клещей, их потребуются на территориях эпидемиологически значимых объектов не менее двух (в середине апреля и в середине мая).

при Управл. Роспотребнадзора по Приморскому краю. – Владивосток, 2011. – С.3-27.

8. Нецкий Г.И., Богданов И.И. Показатель потенциального эпидемиологического значения природных очагов клещевого энцефалита и Омской геморрагической лихорадки // Медицинская паразитология. – 1966. – №3. – С.290-292.

9. Померанцев Б.И. Иксодовые клещи (*Ixodidae*) // Фауна СССР. Паукообразные. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1950. – Т. IV. Вып. 2. – 224 с.

10. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшейшая школа, 1967. – 328 с.

11. Романенко В.Н. Многолетняя динамика численности и видового состава иксодовых клещей (*Ixodidae*) на антропогенно нарушенных и естественных территориях // Паразитология. – 2011. – Т. 45. №5. – С.384-391.

12. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. – 55 с.

13. Сомова Л.М. Задачи НИИЭМ СО РАМН по обеспечению эпидемиологического благополучия в период проведения Саммита АТЭС в 2012 году // Матер. расшир. засед. Коллегии при Управл. Роспотребнадзора по Приморскому краю. – Владивосток, 2011. – С.61-73.

14. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (*Acarina. Ixodidae*). Морфология, систематика, экология, медицинское значение /

Под ред. Н.А. Филипповой. – Л.: Наука, 1985. – 420 с.

Ixodinae // Фауна СССР. Паукообразные. – Л.: Наука, 1977. – Т. IV. Вып. 4. – 396 с.

15. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства

**Информация об авторах:** Балахонов Сергей Владимирович – д.м.н., профессор, директор, 664047 Иркутск-47, Трилиссера, 78. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; Никитин Алексей Яковлевич – д.б.н., вед.н.с., доцент, тел. (3952) 220-140, e-mail: Nikitin\_irk@mail.ru; Андаев Евгений Иванович – д.м.н., заместитель директора, с.н.с.; Алленов Александр Васильевич – к.м.н., директор, с.н.с.; Борисенко Елена Александровна – зоолог; Зверева Татьяна Викторовна – зоолог; Гордейко Наталья Станиславовна – зоолог; Краснощеков Виктор Николаевич – заведующий отделением; Адельшин Ренат Викторович – к.б.н., с.н.с.; Борисова Татьяна Ивановна – к.б.н., с.н.с.; Вержуцкая Юлия Алексеевна – к.б.н., м.н.с.; Вершинин Евгений Александрович – к.б.н., н.с.; Сидорова Елена Анатольевна – м.н.с.

© КОНЬКОВА-РЕЙДМАН А.Б., ЗЛОБИН В.И. – 2012

УДК: 616-036.22

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

Алёна Борисовна Конькова-Рейдман<sup>1</sup>, Владимир Игоревич Злобин<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Челябинская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф., чл.-корр. РАМН Н.И. Долгушин, кафедра инфекционных болезней, зав. – д.м.н., проф. Л.И. Ратникова; <sup>2</sup>Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра микробиологии, зав. – акад. РАМН, д.м.н., проф. В.И. Злобин)

**Резюме.** В статье приведены результаты комплексного эпидемиологического и эколого-паразитологического исследования, позволяющие оценить эффективность мероприятий по специфической и неспецифической профилактике клещевого энцефалита и иксодовых клещевых боррелиозов на Южном Урале. Установлено, что экстренная профилактика с помощью иммуноглобулина показана только невакцинированным лицам, укушенным инфицированными вирусом клещевого энцефалита клещами, а также антибиотиками всем обратившимся на основе определения инфицированности переносчиков боррелиями. Профилактика иксодовых клещевых инфекций на территории области должна базироваться на эффективном проведении акарицидных обработок актуальных загородных и городских территорий, личной неспецифической профилактики, существенного повышения охвата населения вакцинацией против клещевого энцефалита, расширения объемов экстренной профилактики клещевого энцефалита специфическим иммуноглобулином и иксодового клещевого боррелиоза антибиотиками на базе результатов экспресс-обследования пациентов, пострадавших от нападения клещей.

**Ключевые слова:** клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы, профилактика.

## SPECIFIC AND NONSPECIFIC PREVENTION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS AND IXODES BORRELIOSIS IN SOUTHERN URAL

A.B. Kon'kova Reidman<sup>1</sup>, V.I. Zlobin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Chelyabinsk State Medical Academy; <sup>2</sup>Irkutsk State Medical University)

**Summary.** The paper presents the results of a comprehensive epidemiological and parasitological studies to assess the effectiveness of interventions for specific and nonspecific prevention of tick-borne encephalitis and tick-borne borreliosis in the southern Urals. It has been established that emergency prevention by means of an immunoglobulin is indicated only to not vaccinated persons, bitten by infected with a virus of tick-borne encephalitis, and also with antibiotics on the basis of definition of infecting carriers by borrelias. Prevention of tick-borne infections on the territory of area should be based on effective carrying out acaricide processings of actual country and urban areas, the personal nonspecific prevention, essential increase of coverage of the population by vaccination against tick-borne encephalitis, expansion of volumes of emergency prevention of tick-borne encephalitis by a specific immunoglobulin and tick-borne borreliosis antibiotics on the basis of results of express inspection of patients, affected by attack of ticks.

**Key words:** tick-borne encephalitis, tick-borne borreliosis, prevention.

Высокоэндемичными территориями по клещевому энцефалиту (КЭ) и иксодовым клещевым боррелиозам (ИКБ) являются Средний и Южный Урал, Западная и Восточная Сибирь, Дальний Восток (Приморский край). Клинико-эпидемиологический анализ инфекций, передающихся иксодовыми клещами, на большинстве административных территорий Южного Урала показал, что ведущее место в заболеваемости населения занимают иксодовые клещевые боррелиозы и значительно меньше – клещевой энцефалит. Показатели заболеваемости КЭ и ИКБ, превышающие среднегодовые по РФ в 5-14,7 раза и 2-8 раза соответственно, регистрируются в основном в лесостепной и горно-лесной зоне Челябинской области, в районах, имеющих умеренный климат и лесной ландшафт. Несмотря на сходство эпизоотологического процесса, необходимо отметить, что возможности для увеличения числа регистрируемых случаев ИКБ за счет улучшения его диагностики, по всей

видимости, сохраняются. Высокая степень социально-эпидемиологической значимости инфекций, передающихся иксодовыми клещами, определяется не только значительным уровнем заболеваемости, но и тяжестью клинического течения, длительностью трудопотерь, осложнениями, приводящими к инвалидизации, наличием летальных исходов, что характерно для современного течения КЭ на Южном Урале. Значительный рост заболеваемости КЭ, расширение его ареала послужили основанием для внедрения новой программы стратегии и тактики профилактики, принятия программы проведения массовой вакцинации населения высокоэндемичных регионов. В связи с вышеизложенным, необходимо прогнозировать заболеваемость КЭ и ИКБ с учетом климатической подзоны для планирования противоэпидемических мероприятий.

Цель работы: на основании результатов комплексно-эпидемиологического и эколого-паразитологического

анализа оценить эффективность мероприятий по специфической и неспецифической профилактике КЭ и ИКБ на Южном Урале.

### Материалы и методы

С целью анализа эпидемиологической ситуации по трансмиссивным «клещевым» инфекциям в Челябинске и Челябинской области изучены архивные данные заболеваемости ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области», Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по ЧО за период с 1998 по 2010 гг. Использованы данные государственной статистической отчетности. Для детекции специфического фрагмента ДНК боррелий в клещах использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с набором реагентов для амплификации фрагмента 16S rRNA *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с тест-системой «Amplisens *Borrelia burgdorferi sensu lato*-Erh» согласно инструкции производителя.

Обработку данных с последующим статистическим анализом осуществляли в соответствии со стандартными методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica for Windows, версия 6,0. Для проверки «нулевой» гипотезы использовали в зависимости от характера распределения выборки параметрический Т-критерий Стьюдента или непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни и двухвыборочный критерий Колмогорова-Смирнова.

### Результаты и обсуждение

В условиях сочетанных природных очагов, оптимальным является применение тех методов профилактики, которые могли бы одновременно защищать человека от всего комплекса инфекций, передающихся клещами.

К ним относятся, прежде всего, методы неспецифической профилактики, в том числе акарицидные обработки и дератизационные мероприятия. Перспективным направлением предупреждения заболеваемости инфекциями, переносимыми иксодовыми клещами, является расширение масштаба проведения акарицидных обработок на территориях антропоургических очагов с использованием новых инсекто-акарицидных препаратов. В Челябинской области ежегодно увеличивается площадь территорий, обработанных от клещей. Так, в 1998 г. было обработано 667,7 га, в 1999 г. – 839,9 га, в 2000 г. – 996,3 га, в 2001 г. – 913,3 га, в 2002 г. – 873,3 га, в 2003 г. – 760 г., в 2004 г. – 786 га, в 2005 г. – 2242 га, в 2006 г. – 2348 га, в 2007 г. – 2815,7 га, в 2008 г. – 2242 га, а в 2009 г. – 4092 га.

Стабилизировалась обстановка по заклещевленности на территории детских летних оздоровительных учреждений. С 2005 г. изменилась структура акарицидных обработок: стали обрабатывать территории садовых кооперативов, ЛПУ, территории кладбищ, жилье. Начиная с 2003 г. в Челябинской области использовались отечественные («Бриз» 25% к.э., «Ципертрин» 25% к.э.) и зарубежные препараты («Акаритокс», фирма «Сульфурмилс Лимитед», Индия). Все препараты выпускались в форме 25% концентрата эмульсии (действующее вещество – ципертрин). Для уничтожения клещей рода *Ixodes* применяли рабочие водные эмульсии средства (0,1%). Норма расхода акарицидного препарата при густом растительном покрове составляла 0,75 л/га, при редком – 0,5 л/га. Для уничтожения клещей рода *Dermacentor* норма расхода акарицидного препарата составляла – 1,25 л/га. Срок действия средства от 1 до 1,5 мес. На территории Челябинской области отмечают 2 пика обращаемости после присасывания клещей: май-

июнь и третья декада августа – первая декада сентября. Количество людей, подвергшихся нападению клещей, при втором подъеме обращаемости было в 2,7-3 раза меньше, чем при первом. Второй подъем обращаемости обусловлен появлением новой генерации клещей рода *Dermacentor*.

С учетом типизации природных очагов КЭ и ИКБ (монодоминантный, полидоминантный, бидоминантный) на административных территориях с высоким риском заражения – горно-лесной (6 подзон) и лесостепной (7 подзон) ландшафтных зон необходимо рекомендовать демпинговый тип акарицидных обработок – 2-3 раза за эпидемический сезон. При этом необходимо учитывать показатели обращаемости населения с присасыванием иксодовых клещей, свидетельствующих о высоком лоймопотенциале природных очагов КЭ и ИКБ. Наиболее высокие показатели обращаемости, рассчитанные на 100.000 населения (от 1500 до 2000 и от 1000 до 1500) регистрировались на административных территориях горно-лесной (г. Аша, Куся, Нязепетровский район, г. Миасс, г. Кыштым, г. Златоуст, г. Верхний Уфалей, Касли, Кунашак) и лесостепной зон (г. Челябинск, г. Копейск, г. Чебаркуль, г. Пласт, Аргашский район, Красноармейский район, г. Копейск, Коркино, г. Еманжелинск, Еткульский район). На вышеперечисленных административных территориях отмечена высокая численность переносчиков. Многие из них являются местами отдыха жителей Челябинской области, имеют свою инфраструктуру. На территории г. Челябинска (поселок Каштак, Каштакский бор) сформировался антропоургический очаг КЭ, ИКБ, который характеризуется увеличением численности иксодовых клещей с 5-15 особей на флажок/км в 1998 г. до 30-40 особей в 2009 г., повышением численности синантропных прокормителей с 0,2 до 6,0 на 100 ловушко/суток, увеличением частоты заражения людей в черте города до 30%.

На рисунке 1 представлена преимущественная циркуляция различных генотипов боррелий на различных административных территориях области.

Преимущественная циркуляция *Borrelia garinii* ee генотипов на территориях горно-лесной и лесостепной зон Челябинской области и доказанная нами нейротропность данного генотипа [3] позволяют включать в динамическое обследование больных, поступавших с фактом инокуляции клеща в данных ландшафтных зонах, методы нейровизуализации (КТ или МРТ), электронейромиографию для верификации ранних и поздних поражений нервной системы (через 3 месяца и в динамике через 6 месяцев).

ДНК боррелий детектировали в 36,6±5,0% анализируемых образцов от клещей. Определены нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР для межгенного спейсера генов 5S-23S rRNA, на основании гомологии которых с известными нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank и филогенетического анализа образцы ДНК отнесены к двум видам – *Borrelia garinii* (63,4%), *Borrelia afzelii* (36,6%).

Антибиотикопрофилактикой ИКБ охвачено 92,3% пострадавших от нападения клещей. На 17 административных территориях Челябинской области экстренную антибиотикопрофилактику получили 100% лиц. Показатель эффективности (Е) и индекс эффективности (К) составили в 2008 г. 70,2% и 3,3; в 2009 г. – 56,2% и 2,3; в 2010 г. – 65,7% и 2,9 (табл. 1).

С целью экстренной профилактики ИКБ в области использовался антибактериальный препарат – доксициклин. Схема антибиотикопрофилактики состояла в назначении доксициклина по 0,1 г 1 раз в сутки в течение 5 дней. Если препарат назначался позже 3-го дня от момента присасывания клеща (но не более 5 дней) курс приема доксициклина продлевался до 10 дней. Наиболее предпочтительной лекарственной формой данного антибактериального препарата являлся юнидокс-солотаб, имеющий большую биодоступность. При непереноси-

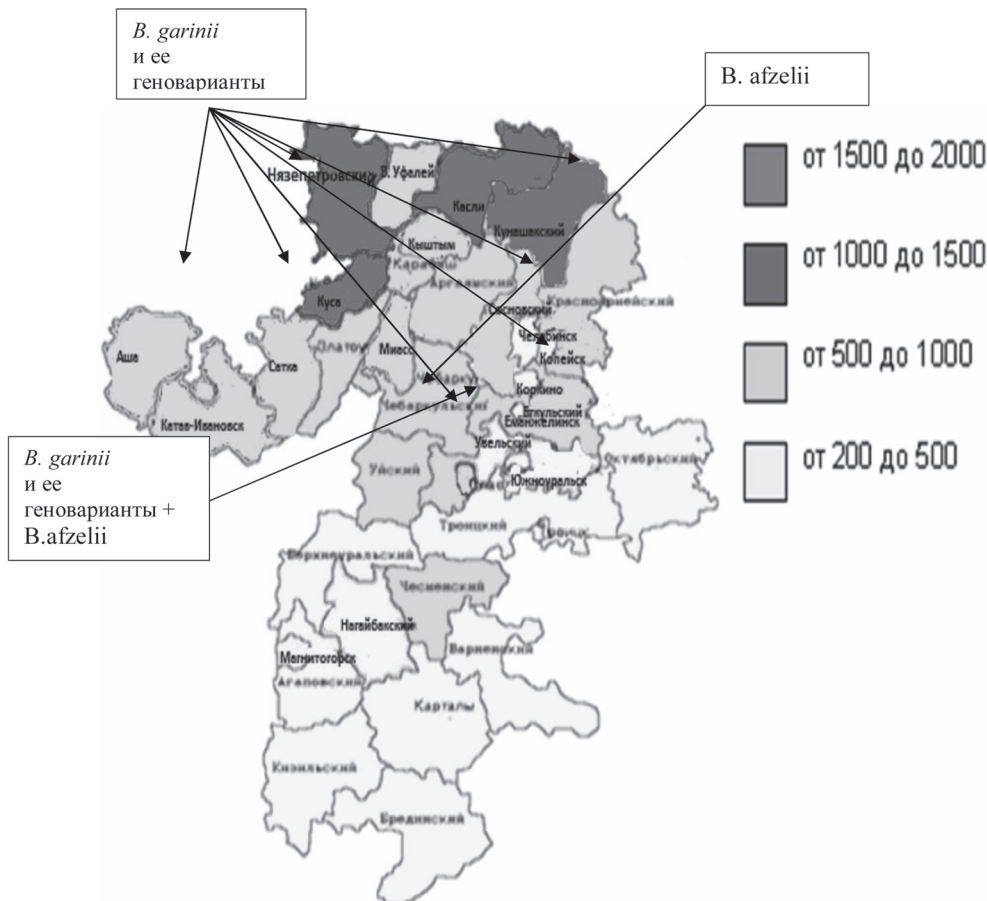


Рис. 1. Преимущественная циркуляция различных геновидов боррелий на административных территориях, приуроченных к ландшафтным зонам, типам природных очагов ИКБ, КЭ в Челябинской области и показатели обрачаемости населения с присасыванием иксодовых клещей (показатель на 100000 населения).

мости антибиотиков тетрациклинового ряда, а так же в случае микст-инфицированности переносчика использовался комбинированный препарат амоксициллина с

42,5% населения административных территорий области. В целом, по Челябинской области 10,6% населения получили специфическую профилактику.

Эффективность антибиотикопрофилактики иксодовых клещевых боррелиозов в Челябинской области в 2008-2009 гг.

Год	Всего случаев	Получили антибиотики (из числа лиц с присасыванием клещей)			Не получили антибиотики (из числа лиц с присасыванием клещей)				
		Всего	Заболело	Пок. на 1000 лиц	Всего	Заболело	Пок. на 1000 лиц	Е	К
2008	170	13226	39	2,9	3602	131	36,3	70,2%	3,3
2009	230	17138	70	4,1	1951	160	82,0	56,2%	2,3
2010	145	15620	37	2,4	1307	108	82,6	65,7%	2,9

клавулановой кислотой (амоксиклав) по 0, 375 г 3 раза в сутки на протяжении 5 дней. Факт одновременного заражения клещей боррелиями и ВКЭ необходимо учитывать при проведении антибиотикопрофилактики, так как некоторые антибиотики, рекомендуемые для лечения и профилактики ИКБ, в частности, доксициклин, обладают активирующим действием на ВКЭ, что может приводить к утяжелению клинического течения заболевания. Необходимо так же принять во внимание данные о том, что поступивший в кровь

Таблица 1  
 Таблица 2  
 адьювантом вакцина КЭ «ФСМЕ-ИММУН», компании «Baxter», Австрия-США (штамм ВКЭ - Neudorfl). В 0,5% случаев использовалась вакцина «Энцепур взрослый»,

Структура вакцинации и ревакцинации в Челябинской области в 1998-2008 гг.

	Год	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2005	2006	2007	2008
кол-во вакцинированных		34198	31489	47895	19008	34286	69742	83983	100575	66429	87600
кол-во ревакцинированных		42348	51101	65965	44281	33453	58962	92468	101259	111570	93244
Всего		76544	82590	113860	63289	67739	128704	176451	201834	177999	180844
% от числа жителей ЧО		2,12	2,3	3,1	1,8	1,8	3,6	5,0	5,6	4,9	5,1

компании «Новартис» (штамм ВКЭ - К-23). Наряду с полной рекомендуемой схемой вакцинации в ряде случаев использовалась экстренная схема создания специфического гуморального иммунного ответа, которая

заклучалась в двухкратном введении 0,5 мл препарата с интервалом в 2 недели. Для вакцины «Энцеппур» экстренная схема состояла из трех прививок с интервалом 0-7-21 день.

Обращает на себя внимание заболеваемость среди привитых по неполной схеме, поступивших в стационары в сроки до двух месяцев после введения второй дозы вакцины, которая составляла 3,8% в 2002 г., 24,3% – в 2003 г., 5,5% – в 2004 г., 16,6% – в 2005 г., 13,1% – в 2007 г. и 6,5% – в 2008 г. У больных, ранее привитых против КЭ, в 98% наблюдались доброкачественные безневрологические формы КЭ, в двух случаях – менингеальные формы. Общее количество привитых среди заболевших за период с 1998 по 2008 гг. составило 4,7%. Уровень заболеваемости по области среди лиц, вакцинированных против КЭ, составлял от 1,6% в 2002 г. до 2,2% в 2006 г. (показатель на 1000 лиц, подвергшихся присасыванию клещей).

Обобщенные данные по иммунизации населения Челябинской области за 10 лет

Вакцины КЭ	Вакцинация -1	Вакцинация-2	Ревакцинация	Всего абс. /%
«Энцеппур», ФГУП «Микроген» НПО «Вирион», (Томск)	18815	18321	65431	102567/58,9
Вакцина КЭ ФГУП ИПЭВ им. М.П. Чумакова (Москва)	4851	26259	23956	55066/31,6
«ФСМЕ-ИММУН», «Baxter» (Австрия-США)	2223	3887	9361	15471/8,8
«Энцеппур-взрослый», «Новартис», (Германия)	77	90	630	797/0,5
Итого:	25966	48557	99378	173901/100

В условиях низкого охвата населения вакцинацией особое значение приобретает экстренная серопротекция КЭ, единственным средством которой продолжает оставаться специфический гомологичный донорский иммуноглобулин. В научной литературе имеются неоднозначные оценки эффективности введения иммуноглобулинов с профилактической целью [2], в связи с чем, представляло интерес проведение анализа эффективности экстренной серопротекции КЭ, основанной на результатах исследования инфицированности присосавшегося переносчика. Серопротекцией КЭ по Челябинской области охвачено от 32,6% до 50,1% взрослых и от 82,9% до 96,4% – детей.

Результаты экспресс-диагностики на зараженность ВКЭ клещей, доставленных от населения в лабораторию ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Челябинской области в 2010 г., показали, что от 1,4% до 50% снятых клещей содержали ВКЭ. Вирусофорность клещей, снятых с людей, была достоверно выше ( $p < 0,001$ ), чем от-

ловленных непосредственно в природе. Этот факт неоднократно отмечали и другие исследователи, указывая на две возможные причины этого явления – изменение поведенческих реакций зараженных клещей и размножение вируса КЭ в организме питающихся переносчиков [4,5].

Нами проведен анализ эффективности иммуноглобулинопрофилактики в 2010 г. Из общего числа заболевших лихорадочной формой КЭ (51) – 10 (17,2%) получали иммуноглобулин, менингеальной формой (31) – 9 (29%) получали противоклещевой иммуноглобулин, очаговой формой (9) – 1 (11,1%). Следует отметить, что пассивная иммунизация в 80% случаев проводилась в сроки позднее 48 часов от момента инокуляции переносчика и доза вводимого иммуноглобулина была значительно меньше рекомендуемой – 0,2 мл на кг массы тела, по данным И.В. Козловой [2]. Анализ эффективности иммуноглобулинопрофилактики в зависимости от

Таблица 3

сроков введения серопрепарата показал, что среди пациентов, которым вводили иммуноглобулин в первые сутки с момента присасывания клеща в рекомендуемой дозе (0,1 мл на кг массы тела), ни один не заболел КЭ.

В данном аспекте наиболее перспективно определение риска заражения обратившихся по поводу присасывания клеща лиц на основании индикации ВКЭ и боррелий в переносчиках, снятых после инокуляции. Одновременное выявление воз-

будителей других клещевых инфекций предоставило бы возможность решать вопрос о необходимости проведения экстренной профилактики в отношении МЭЧ, ГАЧ. Таким образом, экстренная профилактика с помощью иммуноглобулина показана только невакцинированным лицам, укушенным инфицированными ВКЭ клещами, а также антибиотиками всем обратившимся на основе определения инфицированности переносчиков боррелиями. Профилактика иксодовых клещевых инфекций на территории области должна базироваться на эффективном проведении акарицидных обработок актуальных загородных и городских территорий, личной неспецифической профилактики, существенного повышения охвата населения вакцинацией против КЭ, расширения объемов экстренной профилактики КЭ специфическим иммуноглобулином и ИКБ антибиотиками на базе результатов экспресс-обследования пациентов, пострадавших от нападения клещей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.Н. Современное состояние знаний о переносчиках клещевого энцефалита // *Вопр. вирусологии.* – 2007. – №5. – С.21-26.
2. Козлова И.В., Злобин В.И., Верховина М.М. и др. Современные подходы к экстренной специфической профилактике клещевого энцефалита // *Вопросы вирусологии.* – 2007. – №6. – С.25-30.
3. Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И., Тарасов В.Н. и др. Этиопатогенетические и клинические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в природных очагах Южного

Урала // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2010. – №5. – С.24-34.

4. Zharkov S.D., Dubinina H.V., Alekseev A.N., et al. Anthropogenic pressure and changes in Ixodes tick populations in the Baltic region of Russia and Denmark // *Acarina.* – 2000. – №2. – P.137-141.

5. Korenberg E.I., Gorban I.Y., Kovalevskii Y.V. Risk for human tick-borne encephalitis, borreliosis, and double infection in the pre-Ural region of Russia // *Emerg. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 7. №1. – P.459-462.

**Информация об авторах:** Конькова-Рейдман Алёна Борисовна – к.м.н., ассистент, г. Челябинск, ул. Воровского, e-mail: Konkova-reidman@mail.ru; Злобин Владимир Игоревич – акад. РАМН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, тел. (3952) 243016, e-mail: V.I. Zlobin@mail.ru.

© СИДОРОВА Е.А., КАРАНЬ Л.С., БОРИСОВА Т.И., АДЕЛЬШИН Р.В., АНДАЕВ Е.И., ТРУХИНА А.Г., ТУРАНОВ А.О., НАГИБИНА О.А.,  
 ПОГОДИНА В.В., ЛАПА С.Э., БАЛАХОНОВ С.В. – 2012  
 УДК: 616.988.25:575.1+574.9

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ТЕРРИТОРИИ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА «АЛХАНАЙ» (ЗАБАЙКАЛЬСКИЙ КРАЙ)

Елена Александровна Сидорова<sup>1</sup>, Людмила Станиславовна Карань<sup>2</sup>, Татьяна Ивановна Борисова<sup>1</sup>,  
 Ренат Викторович Адельшин<sup>1</sup>, Евгений Иванович Андаев<sup>1</sup>, Анна Гавриловна Трухина<sup>1</sup>,  
 Александр Олегович Туранов<sup>3</sup>, Ольга Алексеевна Нагибина<sup>4</sup>, Ванда Вацлавовна Погодина<sup>5</sup>,  
 Светлана Эдуардовна Лапа<sup>6</sup>, Сергей Владимирович Балахонов<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, директор – д.м.н., проф. С.В. Балахонов;  
<sup>2</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, директор – академик РАМН д.м.н. проф. В.И. Покровский;  
<sup>3</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае, гл. врач – В.И. Игнатьев; <sup>4</sup>Читинская  
 противочумная станция, директор – В.А. Агапов, <sup>5</sup>Институт полиомиелита и вирусных  
 энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, директор – член-корр. РАМН, д.м.н. проф.  
 М.И. Михайлов; <sup>6</sup>Управление Роспотребнадзора по Забайкальскому краю, руководитель – В.И. Пинтусов)

**Резюме.** В работе представлены результаты исследования штаммов вируса клещевого энцефалита (КЭ), выделенных в 1999–2011 гг. от иксодовых клещей и диких грызунов на территории Национального парка «Алханай» Забайкальского края. На территории парка установлена сочетанная циркуляция двух генотипов вируса КЭ – дальневосточного и сибирского, выделены «886-84-подобные» штаммы, отличающиеся от представителей сибирского и дальневосточного генотипов, и микст-штамм, сочетающий признаки сибирского и дальневосточного генотипов.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, генотип, секвенирование, ген E.

## GENETIC VARIETY OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS POPULATION IN ALKHANAY NATIONAL PARK (TRANSBAIKAL REGION)

E.A. Sidorova<sup>1</sup>, L.S. Karan<sup>2</sup>, T.I. Borisova<sup>1</sup>, R.V. Adelshin<sup>1</sup>, E.I. Andaev<sup>1</sup>, A.G. Trukhina<sup>1</sup>, A.O. Turanov<sup>3</sup>,  
 O.A. Nagibina<sup>4</sup>, V.V. Pogodina<sup>5</sup>, S.E. Lapa<sup>6</sup>, S.V. Balakhonov<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor; <sup>2</sup>Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in Transbaikal region of Rospotrebnadzor; <sup>4</sup>Chita Antiplague Station of Rospotrebnadzor, Chita; <sup>5</sup>Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis by M.P. Chumakov of RAMS, Moscow; <sup>6</sup>Administration of Rospotrebnadzor at Transbaikal region)

**Summary.** In our research are presented the results of tick-borne encephalitis (TBE) virus strains, isolated in 1999–2011 from Ixodes ticks and wild rodents in the National Park “Alkhanay” (Transbaikal region). Combined circulation of two TBE virus genotypes, Far Eastern and Siberian, was established. Moreover «886-84-like» strains differed from the Siberian and Far Eastern genotypes were isolated in the National Park and a mixed strain combining features of the Siberian and Far Eastern genotypes.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus, genotype, sequencing, gene E.

Клещевой энцефалит – природно-очаговое вирусное инфекционное заболевание, возбудитель которого открыт на Дальнем Востоке в 1937 г. [8]. Согласно современной международной классификации вирус КЭ относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. В настоящее время выделяют три генотипа вируса КЭ: дальневосточный, сибирский и европейский [11]. В свою очередь сибирский генотип делится на два больших подтипа: азиатский и европейский (или балтийский), в составе азиатского подтипа выделяют два кластера: первый с прототипным штаммом Vasilchenko, второй – с прототипным штаммом Zausaev [2]. Кроме того, в 70–80-е годы прошлого века в Эхирит-Булагатском районе Иркутской области впервые выделены от клещей *Ixodes persulcatus* и полевки красно-серой своеобразные по антигенной структуре и отличающиеся от изолятов сибирского и дальневосточного генотипов штаммы 178-79 и 886-84. Оригинальность штаммов показана А.Г. Трухиной [9] в реакции диффузной преципитации в агаре с моноспецифическими перекрестно-истощенными сыворотками. К настоящему времени получены генетические доказательства особенностей этих штаммов: по результатам филогенетического анализа штаммы распределились в отдельные клады и не были отнесены ни к одному из трех ранее изученных генотипов [4]; расширены представления об ареале «886-84-подобного» варианта вируса КЭ (не только Иркутская область, но и Республика Бурятия, Забайкальский край, Монголия); показано их участие в формировании очаговых форм КЭ с летальным исходом [1,10].

На большей части территории Российской Федерации распространены сибирский и дальневосточный геноти-

пы вируса КЭ с преобладанием сибирского [6,7]. На территориях с одновременной циркуляцией вируса КЭ разных генотипов (Кемеровская, Свердловская, Иркутская, Ярославская области, Республика Алтай, Забайкальский край и Казахстан) выделены микст-штаммы, сочетающие признаки сибирского и дальневосточного генотипов [5].

Учитывая большое значение особенностей региональных популяций вируса КЭ как для анализа фундаментальных вопросов его эволюции, так и решения практических задач, направленных на совершенствование прогноза эпидемиологической ситуации, диагностики, профилактики и лечения, нами проводится изучение гено- и фенотипических свойств штаммов вируса КЭ, выделенных в различных районах Забайкальского края от больных КЭ с летальным исходом, иксодовых клещей и диких грызунов.

Цель работы: изучение генетических особенностей штаммов вируса КЭ, выделенных на территории Национального парка «Алханай» Забайкальского края.

### Материалы и методы

В работе использованы 10 штаммов вируса КЭ, изолированных специалистами Читинской ПЧС (7) и Иркутского научно-исследовательского противочумного института (3) из полевого материала: иксодовые клещи *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor silvarum* и мелкие млекопитающие – полевка красная (*Clethrionomys rutilus*), полевка Максимовича (*Microtus Maximowiczii*), собранного на территории Национального парка «Алханай» в 1999–2011 гг. (табл. 1).

Изоляцию вируса проводили на 2–3 суточных новорожденных белых мышах (НБМ) по общепринятой

методике; индикацию – в ИФА и ПЦР, идентификацию выделенных агентов – в реакции нейтрализации (РН) в культуре клеток СПЭВ.

Выделение РНК из вирусосодержащей суспензии мозга проводили набором реагентов «Рибо-преп», обратную транскрипцию – «Реверта-L-100» и детекцию РНК вируса – тест-системой «АмплиСенс ТВЕ-FL» производства АмплиСенс (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Генотипирование штаммов осуществляли двумя методами: ОТ-ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией с генотипспецифическими зондами и секвенированием участка гена белка Е длиной 1268 п.н. Для амплификации кДНК использовали набор реагентов «АмплиСенс» с праймерами, комплементарными гену Е вируса КЭ. Расшифровку нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе «ABI Prism DNA Sequencer 3130» (Applied Biosystems, США) с набором реактивов «ABI Prism Big Dye Terminator Kit v.3.1.».

Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы BioEdit v.7.0.9.0. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA v.5 методом Maximum Likelihood, модель TN93, G+I. Для сравнения использовали последовательности гена Е вируса КЭ разных генотипов, взятые из GenBank: Sofjin-НО (AB062064), Vasilchenko (AF069066), Zausaev (AF527415), Oshima-5-10 (AB062063), Neudoerfl (U27495), Aina (JN003206), Cht-22 (JN003208), Cht-653 (JN003207), Senzhang (AY182009), Ekaterinburg-716-09 (GQ845428), Kemerovo-134-08 (GQ845433), Ekaterinburg-859-09 (GQ845427), Vologda-157-08 (GQ845434), Vologda-208-08 (GQ845437), Vologda-166-08 (GQ845435), 178-79 (EF469661), Dalnegorsk (FJ402886), EK-328 (DQ486861), Kavalerovo (FJ402885), Svetlogorie (GU121642), Glubinnoe-2004 (DQ862460), Primorye-18 (GQ228395), Primorye-86 (EU816455), Primorye-253 (EU816451), Primorye-633 (HM859894), Nypr (X39292), Salem (FJ572210), Toro-2003 (DQ401140), 886-84 (EF469662), 740-84 (EU878282), 617-90 (EU878283), 711-84 (EU878281), Omsk haemorrhagic fever virus (X66694).

### Результаты и обсуждение

Национальный парк «Алханай» создан в 1999 г. его площадь 138,2 тыс. га. Границы парка сформированы по бассейновому принципу и проходят по Даурскому и Могойтуйскому хребтам. Рельеф – среднегорный с абсолютными высотами до 1000-1200 м. Парк расположен на стыке двух геоморфологических регионов – Даурского и Онон-Аргунского. Центральную часть парка составляет горный массив, покрытый смешанными и хвойными лесами. Расположенная на меньших высотах над уровнем моря южная часть парка занята преимущественно степями. Национальный парк находится в условиях резко континентального климата со средней температурой января –22,5°С; июля – +18,4°С. Территория парка богата разнообразием флоры и фауны. Кроме того, «Алханай» отличает наличие природно-культурного комплекса свя-

тынь северного буддизма [3]. К настоящему времени Национальный парк мало обследован в отношении КЭ, а число как паломников, так и туристов, посещающих его в сезон активности иксодовых клещей, возрастает (в среднем за июнь-сентябрь парк посещает более 30 тыс. гостей).

Генотипирование 9 штаммов вируса КЭ в ОТ-ПЦР в режиме реального времени с генотипспецифическими зондами (табл. 1) показало, что три штамма относятся к вирусу КЭ сибирского генотипа (Alkhanay 46-99, Alkhanay 68B-00, Alkhanay 106-01); два – дальневосточного (Alkhanay 104-01, Alkhanay 64-00), один (Alkhanay 44-99) типирован как микст-штамм, сочетающий признаки сибирского и дальневосточного генотипов. Определить генотип трех штаммов (Alkhanay 43-99,

Таблица 1

Результаты генотипирования штаммов вируса КЭ, выделенных на территории Национального парка «Алханай» Забайкальского края

№ п/п	№ штамма	Год изоляции	Источник изоляции	Генотипирование штаммов	
				ОТ-ПЦР в режиме реального времени с генотипспецифическими зондами	секвенирование фрагмента гена белка Е (1268 п.н.)
1	Alkhanay 43-99	1999	<i>I. persulcatus</i>	не типруется	886-84-подобный
2	Alkhanay 44-99	1999	<i>I. persulcatus</i>	микст-штамм	н/и
3	Alkhanay 46-99	1999	<i>I. persulcatus</i>	сибирский	сибирский
4	Alkhanay 64-00	2000	полевка Максимовича	дальневосточный	дальневосточный
5	Alkhanay 68B-00	2000	красная полевка	сибирский	сибирский
6	Alkhanay 104-01	2001	<i>I. persulcatus</i>	дальневосточный	дальневосточный
7	Alkhanay 106-01	2001	<i>I. persulcatus</i>	сибирский	н/и
8	Alkhanay 3094/9-10	2010	красная полевка	не типруется	886-84-подобный
9	Alkhanay 3094/18-10	2010	красная полевка	не типруется	886-84-подобный
10	Alkhanay 17-11	2011	<i>D. silvarum</i>	н/и	сибирский

Примечание: н/и – не исследован.

Alkhanay 3094/9-10, Alkhanay 3094/18-10) данным методом не удалось.

Семь из девяти штаммов, генотипированных в ОТ-ПЦР в режиме реального времени, и штамм Alkhanay 17-11 параллельно исследованы методом секвенирования фрагмента гена белка Е длиной 1268 п.н. (табл. 1). С использованием этого метода типированы штаммы вируса КЭ дальневосточного (2) и сибирского (3) генотипов, а также «886-84-подобные» (3). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что штаммы дальневосточного генотипа (Alkhanay 104-01 и Alkhanay 64-00) имеют высокий уровень гомологии со штаммом Glubinnoe-2004 (94,7 и 95,3% соответственно). Уровень различия между штаммами Alkhanay 104-01 и Alkhanay 64-00 достигает 2,9%. В нуклеотидных последовательностях гена белка Е оба штамма имеют маркерную аминокислоту в позиции 206 - серин, что является типичным для представителей дальневосточного генотипа, а также аминокислоту треонин в позиции 366, характерную только для штаммов Glubinnoe, Senzhang и Svetlogorie (рис. 1). Тогда как у остальных штаммов, нуклеотидные последовательности которых использованы для филогенетического анализа, в данной позиции находится аминокислота аспарагин. Замена аминокислоты в позиции 366 гена Е отмечена нами ранее и у других штаммов, выделенных в Забайкальском крае от больных КЭ людей с летальным исходом [1].

Три штамма сибирского генотипа (Alkhanay 46-99, Alkhanay 68B-00, Alkhanay 17-11) разделились на два кластера Zausaev и Vasilchenko (рис. 1). Штамм Alkhanay 46-99 кластеризуется с группой штаммов Zausaev, Kemerovo-134-08, Ekaterinburg-716-09 и имеет характерную аминокислоту гистидин в позиции 234. Отличает штамм Alkhanay 46-99 от прототипного Zausaev замена аминокислоты лизин на аргинин в позиции 228. Подобная замена встречается у штаммов, выделенных в Эстонии (EK-328), Иркутской (178-79), Вологодской (Vologda-157-08), Кемеровской областях (Кемерово-8-11-05).

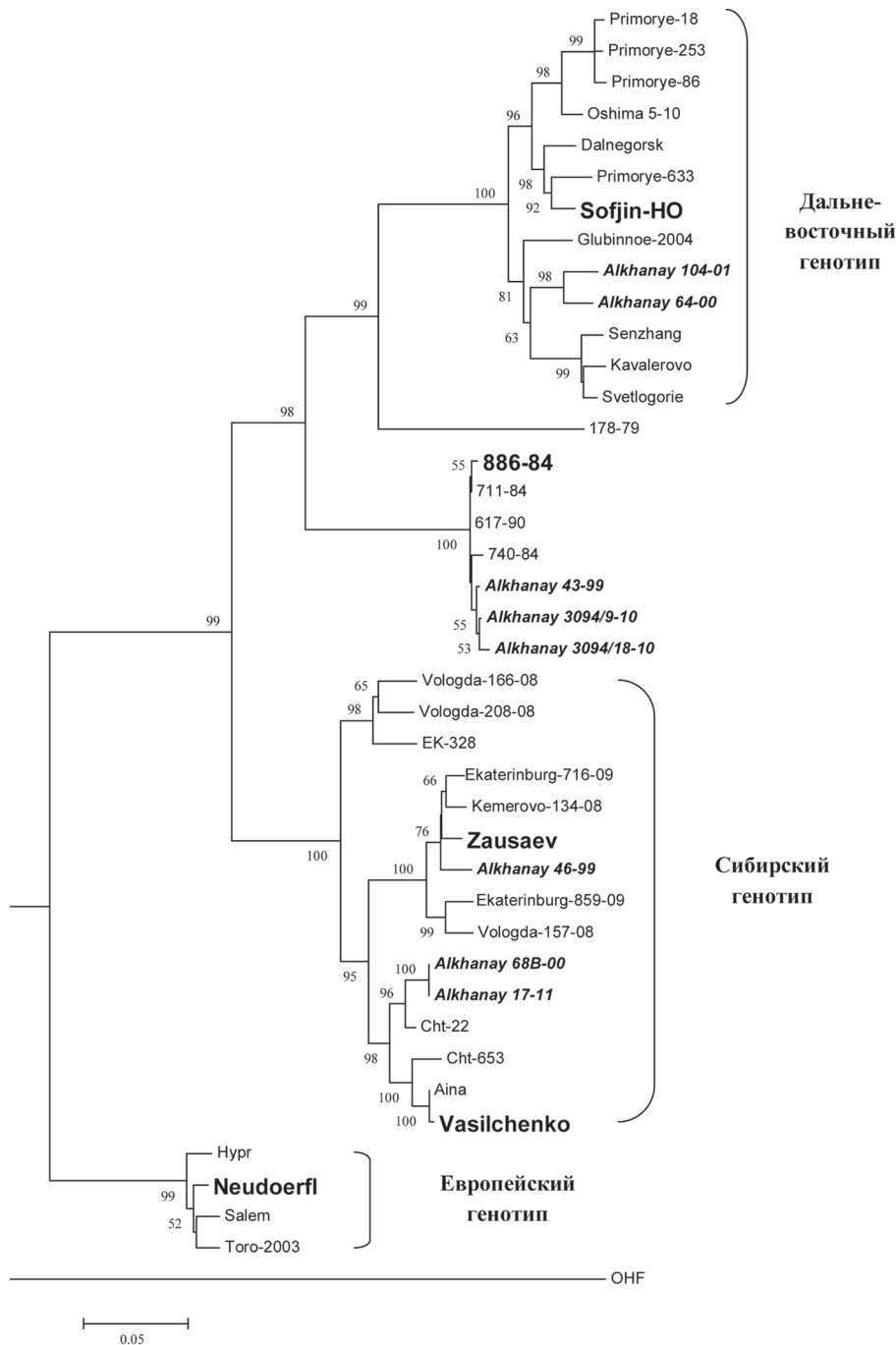


Рис. 1. Филогенетическое древо вируса клещевого энцефалита, построенное на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E (1268 п.н.) с помощью метода максимального правдоподобия (изученные штаммы выделены полужирным курсивом).

Штаммы кластера Vasilchenko Alkhanay 68B-00 и Alkhanay 17-11 не различаются – фрагменты гена E идентичны между собой (100%) и имеют в позиции 81 замену (Thr→Ala), характерную для единичных штаммов из Вологодской, Ярославской, Иркутской областей и Хабаровского края. В позиции 119 у этих штаммов установлена редкая мутация (Val→Ala), присутствующая у единичных штаммов из Иркутской области, входящих в кластер Vasilchenko, одного изолята из Вологодской области и у всех штаммов с архипелага Коккола, Финляндия. Уровень гомологии штаммов Alkhanay 68B-00 и Alkhanay 17-11 со штаммом Vasilchenko достигает 96,3%.

Штаммы Alkhanay 43-99, Alkhanay 3094/9-10, Alkhanay 3094/18-10 генотипированы как «886-84-подобные» с уровнем гомологии между собой 98,7-99,1% и характерными для них аминокислотами аргинин в

позиции 408 и изолейцин в позиции 455. Уникальные замены имеют штаммы Alkhanay 3094/18-10 (Ala→Gly) в позиции 72 и Alkhanay 43-99 в позиции 436 (Ala→Val).

Таким образом, впервые с применением современных молекулярно-генетических методов изучена представительная группа штаммов, выделенных на территории Национального парка «Алханай». Показана сочетанная циркуляция на обследованной территории двух самостоятельных генотипов вируса – дальневосточного (2 штамма) и сибирского (3), «886-84-подобного» варианта (3), отличающегося не только от дальневосточного и сибирского, но и европейского генотипов. Кроме того, из пула клещей *I. persulcatus* выделен микст-штамм, который реагирует со специфическими зондами как сибирского, так и дальневосточного генотипов. Штаммы вируса КЭ сибирского генотипа представлены двумя кластерами Vasilchenko и Zausaev.

Высокая генетическая вариабельность вируса КЭ вероятно обусловлена разнообразием ландшафтно-биоценологических условий (горные, таежные, лесостепные ландшафты) и видовым разнообразием прокормителей иксодовых клещей, поддерживающих циркуляцию возбудителя КЭ. Однако полная характеристика региональной популяции вируса КЭ возможна только при ее изучении с использованием комплекса молекулярно-биологических методов генотипирования штаммов или изолятов вируса: ОТ-ПЦР в режиме реального времени с генотипспецифическими зондами; секвенирование фрагмента гена белка E, содержащего маркерную аминокислоту, или секвенирование полноразмерной последовательности гена E; анализ полиморфизма длин рестрик-

ционных фрагментов.

Результаты наших исследований поднимают ряд вопросов, представляющих практический интерес, в частности, влияние генетической вариабельности возбудителя КЭ на эпидемиологические и эпизоотологические проявления природных очагов инфекции, что невозможно без их адекватного мониторинга. Проведение таких исследований позволит обосновать связь распространения разных генотипов вируса КЭ с ландшафтно-биоценологическими особенностями очаговых территорий и степени их антропогенной трансформации, оценить целесообразность применения диагностических и специфических профилактических препаратов на основе штаммов, представляющих разные генотипы вируса и уточнить роль сибирского, дальневосточного генотипов и «886-84-подобного» варианта вируса КЭ в формировании региональной патологии.



### ЛИТЕРАТУРА

1. Андаев Е.И., Борисова Т.И., Трухина А.Г. и др. Структура популяции вируса клещевого энцефалита в Забайкальском крае // Матер. VII Всерос. научно-практ. конференции с междунаро. участием «Молекулярная диагностика – 2010». – М., 2010. – Т. 2. – С.206-208.
2. Инфекции, передаваемые клещами, в Сибирском регионе / Под ред. В.В. Власова, В.Е. Репина; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т хим. биол. и фунд. медицины. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. – 395 с.
3. Малая энциклопедия Забайкалья. Природное наследие / Под ред. Р.Ф. Гениатулина. – Новосибирск: Наука, 2009. – 689 с.
4. Карань Л.С., Маленко Г.В., Бочкова Н.Г. и др. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита // Бюллетень СО РАМН. – Новосибирск, 2007. – №4 (126). – С.34-40.
5. Карань Л.С., Шопенская Т.А., Платонов А.Е. и др. Молекулярные методы в алгоритме мониторинга очагов клещевых трансмиссивных инфекций // Молекулярная диагностика – 2007. Сб. трудов VI Всерос. научн.-практ. конф. с междунаро. участием. – М., 2007. – Т. II. – С.316-317.
6. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С. и др. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и антигенная характеристика штаммов // Вопр. вирусол. – 2004. – №4. – С.20-25.
7. Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М. и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопр. вирусол. – 2007. – №5. – С.16-21.
8. Смородинцев А.А., Дубов А.В. Клещевой энцефалит и его профилактика. – М., 1986. – 232 с.
9. Трухина А.Г. Особенности популяции вируса клещевого энцефалита в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья: Дисс...канд. мед наук. – Иркутск, 1989. – 179 с.
10. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Кулакова Н.В. и др. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии // Вопр. вирусол. – 2010. – №3. – С.27-32.
11. Heinz F.X., Collett M.S., Purcell R.H., et al. Family Flaviviridae // Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: 7 report of the International committee of taxonomy of viruses. – San Diego, 2000. – P.1217-1225.

**Информация об авторах:** Сидорова Елена Александровна – м.н.с., 664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78, тел.: (3952) 220135, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru; Борисова Татьяна Ивановна – к.б.н., с.н.с.; Адельшин Ренат Викторович – к.б.н., с.н.с.; Балахонов Сергей Владимирович – д.м.н., профессор, директор; Андаев Евгений Иванович – д.м.н., заместитель директора, заведующий лабораторией; Трухина Анна Гавриловна – к.м.н., ученый секретарь; Карань Людмила Станиславовна – н.с.; Туранов Александр Олегович – заместитель главного врача; Погодина Ванда Вацлавовна – д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией; Нагибина Ольга Алексеевна – заведующий лабораторией; Лапа Светлана Эдуардовна – к.м.н., заместитель руководителя.

© ЧЕРНИКОВА А.А., ГОРДЕЕЦ А.В., ШАРКОВА В.А., ХЕГАЙ Т.С. – 2012  
УДК: 616.98:578.833.27 – 053.2

### ОЧАГОВЫЕ ФОРМЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У ДЕТЕЙ ПРИМОРЬЯ

Анастасия Анатольевна Черникова, Альвина Васильевна Гордеев,  
Валентина Александровна Шаркова, Татьяна Сергеевна Хегай

(Владивостокский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. В.Б. Шуматов)

**Резюме.** В статье представлены результаты изучения особенностей проявления очаговой формы клещевого энцефалита у 31 ребёнка. Очаговые формы клещевого энцефалита отличались крайне тяжелой симптоматикой, с выраженными общетоксическими и общемозговыми симптомами, тяжелыми поражениями нервной системы с развитием судорог, потери сознания, периферических вялых параличей, гемипарезов спастического характера, появление патологических стопных знаков, развития косоглазия, птоза, бульбарного синдрома, а в 22,6% случаев отмечалось двухволновое течение болезни. Представлены результаты иммунологического реагирования системного цитокинового статуса. Установлена однонаправленность изменений системного цитокинового статуса: гиперпродукция ИНФγ и ИЛ-10. В динамике заболевания – активное снижение уровня ИЛ-10, что вероятно свидетельствует о развитии Th1/Th2 типа иммунного ответа.

**Ключевые слова:** клещевой энцефалит, очаговые проявления, дети, цитокины.

### THE FOCAL FORMS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS IN CHILDREN IN PRIMORYE

A.A. Chernikova, A.V. Gordeets, V.A. Sharkova, T.S. Hegai  
(Vladivostok State Medical University)

**Summary.** There have been presents the results of studying the characteristics of focal forms of manifestation of tick-borne encephalitis in 31 children. Focal forms of tick-borne encephalitis is characterizing by extremely severe symptoms, with severe general toxic and cerebral symptoms, severe lesions of the nervous system with the development of seizures, loss of consciousness, peripheral flaccid paralysis, spastic hemiparesis nature, occurrence of pathological Iambic signs of strabismus, ptosis, bulbar syndrome, and in 22,6% of cases we observed during two-wave of the disease. The results of the immunological responses of systemic cytokine status have been presented. There have been defined the unidirectional changes in the systemic cytokine status: hyperproduction of INFγ and IL-10. In the process of the disease was noted the active reduction of IL-10, which probably indicates the development of Th1/Th2 type of immune response.

**Key words:** tick-borne encephalitis, focal manifestations, children, cytokines.

Очаговая форма клещевого энцефалита (КЭ) наиболее тяжелая и в некоторых регионах России наиболее часто регистрируется [1,2]. В последние годы в эндемичных регионах отмечается рост заболеваемости клещевым энцефалитом [3,5]. В Приморском крае первые случаи заболевания были зафиксированы еще в 30-х годах прошлого века. С тех пор наблюдались и спады,

и подъёмы заболеваемости. На протяжении последней четверти XX века и в первом десятилетии XXI заболеваемость трансмиссивными инфекциями достигла беспрецедентно высоких уровней [4].

Целью настоящего исследования явилось изучение частоты и характера очаговых форм клещевого энцефалита у детей в условиях г. Владивостока.

## Материалы и методы

Был обследован 31 ребёнок с очаговой формой клещевого энцефалита. Исследование проведено в соответствии с Конституцией РФ, глава 2, ст. 21; Хельсинской декларацией; Конвенцией Совета Европы «О правах человека и биомедицине». Все дети и их родители были информированы о целях и задачах работы, получено их согласие на проведение необходимых диагностических мероприятий (протокол № 3 заседания Независимого междисциплинарного этического комитета ГОУ ВПО ВГМУ Росздрава от 20.11.2006).

У больных была клиника поражения мозга, мозговых оболочек и зафиксированы изменения в спинномозговой жидкости. Диагноз клещевой энцефалит верифицировался по определению специфических антител класса IgM и IgG к вирусу клещевого энцефалита методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов тест-систем производства «Вектор-Бест» (пгт. Кольцово). Нами наблюдались менингоэнцефалитическая форма – 18 детей (58,1%), энцефалитическая – 8 (25,8%), полиоэнцефаломиелитическая – 4 (12,9%), полиомиелитическая – 1 (3,2%) ребенка.

Кроме клинического наблюдения проводилось лабораторное исследование иммунологических параметров. В изучаемые показатели цитокинового статуса входили: системная продукция клетками крови интерлейкина-1 $\alpha$  (ИЛ-1 $\alpha$ ), интерлейкина-10 (ИЛ-10), интерферона-гамма (ИФН $\gamma$ ) в твердофазном ИФА с применением отечественных диагностикумов ООО «Цитокин» (СПб), методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа.

Содержание цитокинов в сыворотке крови исследовано при поступлении больного в стационар и через 10-14 дней у 17 больных.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0 for Windows XP». Из числа основных характеристик для исследуемых групп вычисляли – относительную величину, z-критерий. В связи с широким размахом колебаний показателей цитокинов у больных клещевым энцефалитом, наличия выбросов значений, которые затрудняли статистическую обработку данных в малых группах, их статистическую обработку мы проводили непараметрическими методами. При сравнении групп до и после лечения применялся коэффициент Уилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Начало болезни у всех больных было острым. Состояние при поступлении расценивалось как среднетяжелое в 16,1% случаев, как тяжелое в 83,9%. Дебют заболевания характеризовался выраженным интоксикационным синдромом: появление резкой слабости, недомогания у всех детей (табл. 1). Температура тела у подавляющего большинства заболевших (77,4%) достигала в первые часы фебрильных показателей, в 6,5% случаев оставалась на субфебрильных значениях, в 16,1% наблюдений поднималась выше 39°C. Озноб наблюдался в 41,9% случаев.

Ведущими жалобами были: интенсивная головная боль, в лобно-височной области, усиливающаяся при смене положения тела, движении глазных яблок у 28 (90,3%) больных, тошнота в 58,1% случаев, многократная рвота встречалась в 48,4% наблюдений. Катаральные явления в виде гиперемии зева отмечались у 24 (77,4%), боли в суставах беспокоили 9 (29,0%) детей.

Жалобы на мышечные боли, с мышечной слабостью отмечались в 32,3% случаев, в 16,1% – регистрировались боли в животе.

При объективном исследовании выявлена гиперемия

лица и верхней половины туловища в 29,0% случаев. Язык у некоторых больных был обложен тонким белым налетом (16,1%), в четверти случаев был покрыт плотным белым налетом у корня языка. Увеличенные лимфатические узлы определялись у 9 детей: затылочные, подчелюстные, передне-шейные плотноэластической консистенции, безболезненные. При исследовании сердечно-сосудистой системы на фоне повышенной температуры тела в 48,4% случаев определялась тахикардия, в 22,6% выслушивался систолический шум на верхушке I степени. Увеличение печени отмечалось в 22,6% наблюдений, в 16,1% случаев пальпация живота была болезненной. Увеличение селезенки в первые три дня болезни не наблюдалось.

Таблица 1

Клиника очаговых форм клещевого энцефалита у детей на первой неделе болезни, (абс.)

№ п/п	Симптомы	Частота симптомов (n=31)	
		абс., чел.	отн., %
1.	Температура тела до 38°C	2	6,5
2.	Температура от 38,1° до 39°C	24	77,4
3.	Температура тела выше 39°C	5	16,1
4.	Головная боль	28	90,3
5.	Слабость, недомогание	31	100,0
6.	Гиперемия ротоглотки	24	77,4
7.	Боли в суставах	9	29,0
8.	Боли в мышцах	10	32,3
9.	Озноб	13	41,9
10.	Тошнота	18	58,1
11.	Рвота	15	48,4
12.	Менингеальные симптомы	19	61,3
13.	Нарушение сознания	11	35,5
14.	Судороги	9	29,0
15.	Очаговая симптоматика	24	77,4

Отмечалось стремительное нарастание общемозговых проявлений. Характерным проявлением болезни явилось нарушение сознания (от сомнолентности до комы) в 22,6% случаев, так и психомоторное возбуждение (12,9%). Заболевание дебютировало с судорог в 29,0% случаев, в 9,7% они носили генерализованный характер.

Менингеальные симптомы определялись в 61,3% случаев. У больных с очаговыми формами клещевого энцефалита встречались ригидность затылочных мышц, симптом Кернига, симптом Брудзинского верхний и нижний.

Очаговые симптомы выявлены в 77,4% случаев. В виде моно- и гемипарезов центрального (спастического) характера (41,9%), появления патологических стопных знаков (29,0%), бульбарного синдрома с нарушением акта глотания (9,7%), появлением гнусавого оттенка голоса (9,7%) до афонии (6,5%), возникновения патологических типов дыхания (9,7%), вялого пареза лицевой мускулатуры (22,6%), косоглазия (12,9%), симптома свислой шеи и свободных надплечий (16,1%), отмечалась гиперсаливация (38,7%).

Спинномозговая пункция была проведена всем детям в первые три дня болезни. В 87,1% случаев ликвор вытекал под давлением, в 61,3% был бесцветным, в 38,7% – опалесцирующим. Изменения в спинномозговой жидкости характеризовались наличием цитоза от 14 до 305 клеток в 1 мкл. Плеоцитоз был лимфоцитарным в 3/4 случаев, в 1/3 смешанного лимфоцитарно-нейтрофильного характера. Уровень белка составил от 0,5 до 1,1 г/л.

Двухволновая форма заболевания была в 22,6% случаев среди всех очаговых форм клещевого энцефалита. Она развилась в 16,7% наблюдений с менингоэнцефалитической формой и в 100,0% с полиоэнцефаломиелитической формой.

Иллюстрацией типичной тяжелой формы клещевого энцефалита может служить следующее клиническое наблюдение.

Дима Ф., 3 г. 6 мес., заболел 2 июня с появления слабости, головной боли, болях в мышцах шеи и конечностей. Температура тела повысилась до 39,6°C, появился озноб. На 2-ой день заболевания при подъеме температуры до 40°C возник фокальный эпилептический припадок в левой верхней конечности. Судорожные припадки большие не повторялись, сохранялось дрожание в левой руке и спутанность сознания. Перестал глотать, голос приобрел гнусавый оттенок.

При поступлении на 3 день болезни контакту недоступен, сознание – сопор, стонет, на осмотр реагирует монотонным криком. Лицо гиперемировано с гримасой боли. Зрачки расширены. Кожные покровы горячие на ощупь, был покрыт липким потом, отмечалась гиперсаливация. Общая гиперестезия. Менингеальные симптомы положительные: ригидность затылочных мышц 3 поперечных пальца, симптом Кернига 110° с обеих сторон, положительный симптом Брудзинского верхний. Левый угол рта опущен, левосторонний птоз. Мышечный тонус в конечностях снижен.

За время наблюдения температура тела держалась на субфебрильных цифрах. Стал вступать в контакт, восстановился голос и глотание. Начал подниматься с кровати. На 12-е сутки от начала заболевания состояние мальчика резко ухудшилось. Появилась резкая головная боль, многократная рвота, наросли менингеальные симптомы на фоне подъема температуры тела до 40,5°C. Нарушилась речь и глотание, усилился тремор в левой верхней конечности. На 17-е сутки развились генерализованные тонико-клонические судороги, развилась кома. На фоне активной дегидратационной, противосудорожной терапии в состоянии ребенка появилось улучшение к 19-му дню болезни. Менингеальные симптомы купировались, ребенок пришел в сознание, появились активные движения в дистальных отделах конечностей. Уменьшился левосторонний птоз. В последующие дни состояние мальчика улучшалось. На 21-е сутки уменьшилась атаксия, появились активные движения в правых конечностях, но в левых сохранялась мышечная слабость, значительное ограничение движений в левой руке, нарастала атрофия мышц.

Клинический диагноз: Клещевой энцефалит, острая стадия, полиоэнцефаломиелитическая форма, двухволновая тяжелая форма, тетрапарез с преимущественным поражением левых конечностей. Бульбарный синдром.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова Н.Г., Лепехин А.В., Лукашева Л.В. и др. Современные клинические проявления клещевого энцефалита в Томской области // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.52-56.
2. Захарычева Т.А., Воронкова Г.М., Мжельская Т.В. Дальневосточный клещевой энцефалит: течение и исходы в современных условиях // Вестник Уральской государственной медицинской академии. – 2010. – Вып. 21. – С.83-85.
3. Команденко Н.И., Жукова Н.Г. Некоторые дискуссион-

ные вопросы проблемы клещевого энцефалита // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.57-62.

В динамике к концу недели в 32,3% случаев отмечалось уменьшение выраженности симптомов интоксикации, менингеальные симптомы купировались в 29,0% наблюдений от общего числа. Сохранялась рассеянная очаговая симптоматика в виде пареза мимической мускулатуры, девиации языка в 32,3% случаев, гемипарезы – в 22,6%. В 67,7% наблюдений температура сохранялась на фебрильных значениях, все больные жаловались на резкую головную боль, выраженную слабость, плохой аппетит, сонливость. Летальным исходом завершился 1 (3,2%) случай заболевания (менингоэнцефалитическая форма клещевого энцефалита). Иммунологическое исследование, проведенное в острый период, зафиксировало резкое повышение уровня сывороточного ИФН $\gamma$  у больных с очаговыми формами клещевого энцефалита (354,1 $\pm$ 24,8 пг/мл против 75 $\pm$ 4,1 пг/мл в контроле,  $p < 0,001$ ). При сравнении в динамике среднее количество ИФН $\gamma$  снижалось, составив 257,5 $\pm$ 32,1 пг/мл, но по-прежнему превышало контрольные значения ( $p < 0,05$ ). Концентрация ИЛ-1 $\alpha$  в сыворотке крови у больных с очаговыми формами КЭ превышала контрольные значения в 10,4 раза, составив 366,3 $\pm$ 31,9 пг/мл, ( $p < 0,01$ ). В динамике уровень системного ИЛ-1 $\alpha$  имел тенденцию к повышению в периоде реконвалесценции до 422,2 $\pm$ 29,2 пг/мл, ( $p < 0,001$ ), что в клинической картине соответствовало сохранению лихорадки и очаговой симптоматики. При анализе содержания сывороточного ИЛ-10 у больных клещевым энцефалитом с очаговой формой заболевания концентрация повышалась, составляя 167,7 $\pm$ 25,5 пг/мл, (14,6 $\pm$ 1,8 пг/мл – у здоровых,  $p < 0,05$ ). При повторном исследовании у больных с очаговой формой КЭ концентрация ИЛ-10 снижалась до 63,5 $\pm$ 26,2 пг/мл.

Таким образом, очаговые формы клещевого энцефалита отличались крайне тяжелой симптоматикой, с выраженными общетоксическими и общемозговыми симптомами, тяжелыми поражениями нервной системы с развитием судорог, потери сознания, периферических вялых параличей, гемипарезов спастического характера, появление патологических стопных знаков, развития косоглазия, птоза, бульбарного синдрома, вплоть до летального исхода (1 ребенок). У детей с КЭ в острый период установлена однонаправленность изменений системного цитокинового статуса: гиперпродукция ИФН $\gamma$  и ИЛ-10. В динамике заболевания – активное снижение уровня ИЛ-10, что вероятно свидетельствует о развитии Th1/Th2 типа иммунного ответа.

ные вопросы проблемы клещевого энцефалита // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.57-62.

4. Овчинникова А.А., Гуляева С.Е., Гуляев С.А. и др. Клещевой энцефалит на Дальнем Востоке: аспекты эпидемиологии // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – №1. – С.107-109.
5. Laursen K., Knudsen J.D. Tick-borne encephalitis: a retrospective study of clinical cases in Bornholm, Denmark // Scand. J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 35. №5. – P.354-357.

**Информация об авторах:** Черникова Анастасия Анатольевна – к.м.н., ассистент, 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2, тел. (423)2325569, e-mail: tais359t@mail.ru; Гордеец Альвина Васильевна – д.м.н., профессор кафедры, тел./факс (423) 2229789, e-mail: all-39@mail.ru; Шаркова Валентина Александровна – д.м.н., заведующий кафедрой, тел. (423)2429822, e-mail: vailexsh@mail.ru; Хегай Татьяна Сергеевна – студентка 6-го курса лечебного факультета, e-mail: femina@mail.ru.

© КОЗЛОВА И.В., ВЕРХОЗИНА М.М., ДЕМИНА Т.В., ДЖИОЕВ Ю.П., ТКАЧЕВ С.Е., КАРАНЬ Л.С., ДОРОЩЕНКО Е.К., ЛИСАК О.В., СУНЦОВА О.В., ПАРАМОНОВ А.И., ЧЕРНОИВАНОВА О.О., РЕВИЗОР А.О., ЗЛОБИН В.И. – 2012  
УДК: 578.2'21: 578.4

#### КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОРИГИНАЛЬНОЙ ГРУППЫ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

Ирина Валерьевна Козлова<sup>1,3</sup>, Марина Михайловна Верховзина<sup>2</sup>, Татьяна Васильевна Демина<sup>3</sup>,

Юрий Павлович Джигоев<sup>1</sup>, Сергей Евгеньевич Ткачев<sup>4</sup>, Людмила Станиславовна Карань<sup>5</sup>,  
Елена Константиновна Дорощенко<sup>1</sup>, Оксана Васильевна Лисак<sup>1</sup>, Ольга Владимировна Сунцова<sup>1</sup>,  
Алексей Игоревич Парамонов<sup>1</sup>, Ольга Олеговна Черноиванова<sup>1</sup>, Александр Олегович Ревизор<sup>3</sup>,  
Владимир Игоревич Злобин<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, Иркутск, директор – член-корр. РАМН, проф., д.м.н. Л.И. Колесникова; <sup>2</sup>Центр эпидемиологии и гигиены в Иркутской области, руководитель – к.м.н. И.В. Безгодов; <sup>3</sup>Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов; <sup>4</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов; <sup>5</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, директор – акад. РАМН, д.м.н., проф. В.И. Покровский)

**Резюме.** Получены новые данные об оригинальном варианте вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), циркулирующем на территории Восточной Сибири. Выявлена группа из 13 штаммов, имеющих генетическую структуру, аналогичную штамму 886-84. Дифференцирующий уровень генетических отличий от других генотипов (более 12%), наличие собственного ареала, экологическая связь со всеми звеньями трансмиссивной цепи, участие в патологии человека, стабильность и длительность циркуляции в природе подтверждают правомерность аттестации «группы 886» в качестве самостоятельного генотипа 5 ВКЭ. Показано, что среди представителей этой группы имеются штаммы, обладающие свойствами, соответствующими основным критериям, используемым при первоначальном отборе штаммов на роль кандидатов для приготовления диагностических и вакцинных препаратов.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, генетические свойства, биологические свойства, генотип.

### COMPREHENSIVE DESCRIPTION OF THE ORIGINAL GROUP OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS ISOLATED ON THE TERRITORY OF EASTERN SIBERIA

I.V. Kozlova<sup>1,3</sup>, M.M. Verhozina<sup>2</sup>, T.V. Demina<sup>3</sup>, Yu.P. Dzhiyoev<sup>1</sup>, S.E. Tkachev<sup>4</sup>, L.S. Karan<sup>5</sup>, E.K. Doroshenko<sup>1</sup>,  
O.V. Lisak<sup>1</sup>, O.V. Suntsova<sup>1</sup>, A.I. Paramonov<sup>1</sup>, O.O. Chernovanova<sup>1</sup>, A.O. Revizor<sup>3</sup>, V.I. Zlobin<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>The Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction of SD RAMS, Irkutsk; <sup>2</sup>Center for Epidemiology and Hygiene in the Irkutsk region; <sup>3</sup>Irkutsk State Medical University; <sup>4</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk; <sup>5</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow)

**Summary.** The new data has been obtained on original kind of tick-borne encephalitis virus (TBEV) circulating in Eastern Siberia. We revealed a group of 13 strains having a genetic structure analogous to strain 886-84. The differentiation level of genetic differences from other genotypes more than 12%, own areal, ecological relationship with all the links of a vector-borne chain, participation in human pathology, the stability and duration of circulation in nature confirms the validity of certification of “group 886” as a separate TBEV genotype 5. It has been shown that among the representatives of genotype 5 of TBEV there are strains which meet the basic criteria used in the initial selection of candidates for the role of strains for the preparation of diagnostic and vaccinal preparations.

**Key words:** genetic properties, biological properties, genotype.

При исследовании этиологической структуры клещевого энцефалита в Восточной Сибири нами установлена циркуляция вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) трех генотипов, при общем доминировании генотипа 3. Кроме того, были обнаружены уникальные штаммы (886-84 и 178-79), обладающие генетической структурой, существенно отличающейся от трех основных генотипов ВКЭ [7].

В настоящее время с помощью метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот с генотипспецифическими зондами (МГНК), секвенирования полного генома ВКЭ и его фрагментов нами выявлена группа из 13 штаммов, гомологичных штамму 886-84, которую мы условно обозначили как «группа 886» [4]. Результаты наших исследований свидетельствуют в пользу того, что этой группе штаммов должен быть присвоен статус самостоятельного генотипа.

Оригинальная генетическая структура штаммов «группы 886» выражается в своеобразной фенотипической характеристике, изучение которой представляет значительный научный интерес. Кроме того, учитывая уникальность генетических и антигенных свойств штаммов «группы 886», они, возможно, могут рассматриваться как кандидаты для создания универсальных, эффективных в отношении различных серотипов (генотипов) ВКЭ диагностикумов и вакцин, проблема создания которых до сих пор остается актуальной.

Цель исследования: изучение генетических и биологических свойств

штаммов ВКЭ «группы 886», циркулирующих на территории Восточной Сибири, оценка их патогенного потенциала, исследование штаммов по комплексу критериев, учитываемых при отборе штаммов-кандидатов в диагностические и вакцинные препараты.

### Материалы и методы

**Вирус КЭ.** В работе использовано 13 штаммов ВКЭ из коллекции Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, отнесенных по результатам генотипирования с помощью МГНК или секвенирования полного генома ВКЭ и его фрагментов к «группе 886». Сведения об этих штаммах приведены в таблице 1.

Таблица 1  
Сведения о штаммах «группы 886» ВКЭ, изолированных на территории Восточной Сибири

№ штамма	Год изоляции	Источник изоляции	Место сбора материала
886-84	1984	<i>Myodes rutilus</i>	Иркутская область, Эхирит-Булагатский район
711-84	1984	<i>Myodes rufocanus</i>	Республика Бурятия, Баргузинский район
740-84	1984	<i>Myodes rufocanus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
712-89	1989	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район
780-89	1989	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
617-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
636-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
608-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
606-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
691-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
418-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район
733-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район
742-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район

**Генотипирование штаммов.** Для получения генетической характеристики штаммов использовали МГНК с 3 панелями в составе 40 дезоксирибонуклеотидных зондов, комплементарных участкам 10 генов различных генотипов ВКЭ [4].

Выделение суммарной РНК из мозга инфицированных мышей или культур клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), нанесение ее на нитроцеллюлозные или капроновые фильтры, гибридизация с дезоксирибонуклеотидными зондами осуществляли по общепринятой методике [10].

Аmplификацию осуществляли с праймерами, соответствующими фрагментам 5'-некодирующей области и генам С-ргМ-Е-NS1, либо фрагменту гена Е, либо фрагментам генов Е и NS1, синтезированными в Институте ХБ и ФМ СО РАН (Новосибирск). Одно- и двухраундовую ПЦР проводили с использованием данных олигонуклеотидов в качестве праймеров, в соответствии с рекомендациями производителя («Биосан», Новосибирск).

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР проводили в Центре секвенирования ДНК СО РАН, г. Новосибирск. Анализ полученных последовательностей осуществляли с помощью программы Mega 5.0 [19]. Для сравнения использовали последовательности фрагментов генома штаммов ВКЭ, относящихся к различным генетическим типам, из базы данных GenBank. Поиск гомологии полученных нуклеотидных последовательностей с уже известными последовательностями фрагментов геномов ВКЭ проводили с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Нуклеотидные последовательности штаммов «группы 886», полученные в ходе исследования, депонированы в международную электронную базу данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), номера доступа №EF469662, EU878281-EU878283, JN936341, JN936347, JN936349-JN936350, JN936353- JN936355.

Определение нуклеотидных последовательностей генома штамма 886-84 и фрагментов генома штаммов 606-90 и 608-90 проведено Карань Л.С. и соавт. на базе ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

**Иммунотипирование штаммов.** Реакцию диффузной преципитации в агаре (РДПА) ставили по методу Д. Кларк [9] с модификациями С.Г. Рубина [18] и Н.Г. Бочковой [2].

**Изучение цитопатической активности** проводили по общепринятым методикам. Титры вируса в опытах титрования на культуре клеток СПЭВ определяли по цитопатическому действию (ЦПД) по методу полных кумулятивов Рида и Менча и выражали в lg ТЦД50/мл [17].

**Нейроинвазивность.** Для оценки нейроинвазивности определяли индекс инвазивности (И) – разницу титров вируса при интрацеребральном (mNic) и подкожном (mNsc) заражении мышей, выраженную в lg LD50/мл [12]. Титры вируса определяли по методу Рида и Менча. Значение И в пределах 1-2,5 свидетельствовало о высоких инвазивных свойствах штамма. Значение  $I \geq 3$  указывало на сниженную инвазивную активность штамма.

Работы с лабораторными животными проводились в соответствии с моральными и этическими требованиями к биомедицинским исследованиям с использованием лабораторных животных.

Терморезистентность (Т50) штаммов ВКЭ изучали по методу Э.А. Овчинниковой и др. [11]. Уровень терморезистентности оценивали по индексу инактивации – разнице lg титров прогретого при 50°C в течение 15 мин. и непрогретого (4°C) вируса. При разнице титров  $\leq 2,0$  lg штамм оценивали как  $T^{50+}$ , от 2,1 до 3,0 lg – как промежуточный,  $\geq 3,1$  lg – как  $T^{50-}$ .

**Rct<sub>42</sub>-признак** (способность вируса к репродукции при супраоптимальной температуре). Признак rct42 оценивали по разнице lg титров вируса при культивировании штаммов на культуре клеток СПЭВ при темпе-

ратуре 37°C и 42°C. При разнице титров  $\leq 2,0$  lg штамм оценивали как rct<sub>42+</sub>, от 2,1 до 3,0 lg – как промежуточный,  $\geq 3,1$  lg – как rct<sub>42-</sub>.

**S-признак.** Культуру клеток СПЭВ заражали штаммами ВКЭ, прошедшими не более 4-х пассажей через мозг белых мышей и трехкратное клонирование. Бляшки появлялись на 3-4-е сутки. S-признак учитывался как S<sup>+</sup> при диаметре бляшки (d)  $\geq 2,5$  мм; S<sup>±</sup> – при 2,5>d  $\geq 2,0$ ; S<sup>-</sup> – при 2,0>d  $\geq 1,0$ .

## Результаты и обсуждение

Впервые необычность штамма 886-84 ВКЭ была выявлена при изучении его серологических свойств [14]. В дальнейшем штамм 886-84 был описан нами как представитель самостоятельного генотипа, в соответствии с критериями, выведенными нами на основе сравнения уровня отличий фрагмента гена Е (нуклеотидные позиции 567-727) у 29 штаммов ВКЭ, изолированных в различных частях ареала [5]. Оказалось, что при анализе гомологии аминокислотных последовательностей соответствующего фрагмента белка Е длиной 53 а.о., штамм 886-84 примыкает к генотипу 3. Он имеет в позиции 206 лейцин, как и все штаммы этого генотипа, а в позиции 234 аминокислоту аспарагин, как и генотипы 1 и 2 [7]. Исходя из этого, а также по причине того, что гомологичные ему изоляты на тот момент не были обнаружены, мы посчитали, что для выделения этого штамма вируса в отдельный генотип необходимо получение дополнительных данных.

Сопоставление полного генома штамма 886-84 (EF469662) с последовательностями ВКЭ, имеющимися в GenBank, показало, что на филогенетических деревьях он образует самостоятельную ветвь, не входя в состав кластеров трех основных генотипов (рис. 1), и по уровню нуклеотидных и аминокислотных замен также «приближается к границе разделения генотипов» [8] (табл. 2).

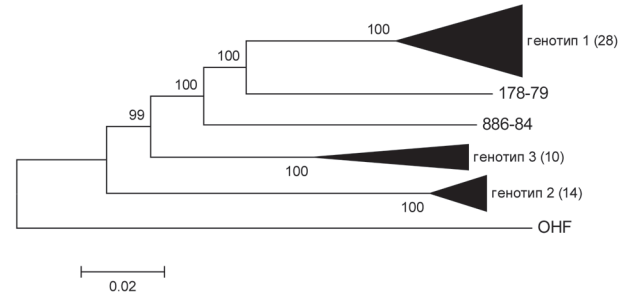


Рис. 1. Филогенетическое древо, демонстрирующее уровень генетического родства 54 штаммов ВКЭ, полученное на основании расшифровки кодирующей области полипротеина (10242 н.п.). Состав кластеров: генотип 1 - Sofjin [16] X07755, AV022703, AV001026, DQ989336, AY182009, AY217093, JF316707, JF316708, FJ997899, EU816450-EU816455, AY169390, FJ906622, GQ228395, FJ402885, FJ402886, DQ862460, GU121642, HQ201303, HQ901367, HQ901366, HM859894, HM859895, JN003205; генотип 2 - TEU27495, TEU27491, TEU39292, AF091010, EU106868, DQ401140, GV266392, HM535610, HM535611, HM120875, GU183379- GU183381, GU183383; генотип 3 - L40361, AF527415, DQ486861, FJ968751, JN003206- JN003209, GU183382, GU183384.

Анализ полной аминокислотной последовательности генома штамма 886-84 подтвердил, что его генетическая структура уникальна, она представляет собой «переплетение» из последовательностей, характерных для генотипов 1, 2 и 3. Например, в наборе из 22 позиций, однозначно дифференцирующих известные штаммы ВКЭ на три основных генотипа, для штамма 886-84 обнаружено чередование собственных (или уникальных) аминокислот (аланин (А) в позиции С-108, серин (S) – NS2А-127 и глицин (G) – NS3-258) с аминокислотами, характерными для каждого из основных генотипов (рис. 2).

Таблица 2

Уровень нуклеотидных и аминокислотных замен между генотипами ВКЭ и штаммом 886-84 (%) (кодирующая область полипротеина, длина 10242 н.о.)

Уровень нуклеотидных замен (%) (кодирующая область полипротеина, длина 10242 н.о.)			
	генотип 1	генотип 2	генотип 3
генотип 1	4,3		
генотип 2	16,4	2,3	
генотип 3	14,4	15,2	5,4
886-84	12,5	15,6	13,7
Уровень аминокислотных замен (%) (полная аминокислотная последовательность полипротеина, длина 3414 а.о.)			
	генотип 1	генотип 2	генотип 3
генотип 1	1,3		
генотип 2	6,9	0,9	
генотип 3	5,3	6,2	1,9
886-84	3,9	6,0	4,2

Примечание: серым цветом выделен уровень нуклеотидных и аминокислот замен внутри генотипа.

На настоящий момент с помощью МГНК и секвенирования нами выявлена группа из 13 изолятов, имеющих генетическую структуру, аналогичную штамму

белок	С		Е		NS1			NS2A					NS3			NS4B			NS5			
№ а.о. по белку	3	108	206	317	54	141	285	100	127	174	175	225	126	258	376	21	28	96	18	297	671	832
Генотип 1	G	V/L/I	S	I/T	T	S/G	R	N	A	M/V	L	I/V	I	V	I/T	H	E	A/R	G	R	V/G	A/V/T
Генотип 2	K	I	V	A	S	Q	T	S	D/E	V	C	A	L/I	A	A	R/Q	S	T	N	E/A	L	M
Генотип 3	R	T	L	T	N	G	K	G/S	G	I/v	I/F	T	M/T	M/V/A	V	Q	G	S	S	G/R	I	T/A
886-84	R	A	L	I	N	S	K	S	S	M	L	A	I	G	V	Q	G	A	S	G	V	A

Примечание. Каждый оттенок серого цвета в ячейке указывает на соответствие аминокислотного остатка одному из четырех генотипов ВКЭ. Черный цвет ячейки означает, что аминокислота характерна только для штамма 886-84.

Рис. 2. Отличия между штаммами вируса клещевого энцефалита разных генотипов в 22 позициях, выявленные путем сопоставления 54 полипротеиновых структур.

886-84. Для восьми штаммов из этой группы были получены фрагменты геномов длиной 1650 н.о., кодирующие белки С, М и часть белка Е (810 н.о.) (GenBank, №№ доступа: EF469662, EU878281-EU878283, JN936341, JN936347, JN936349-JN936350, JN936353-JN936355) (рис. 3). Гомология со штаммом 886-84 составила 98,2-99,8%, а уровень различий между штаммами «группы 886» и представителями трех основных генотипов варьировал от 13,1% со штаммом *Софьин* до 16,6% со штаммом *Найдорф*.

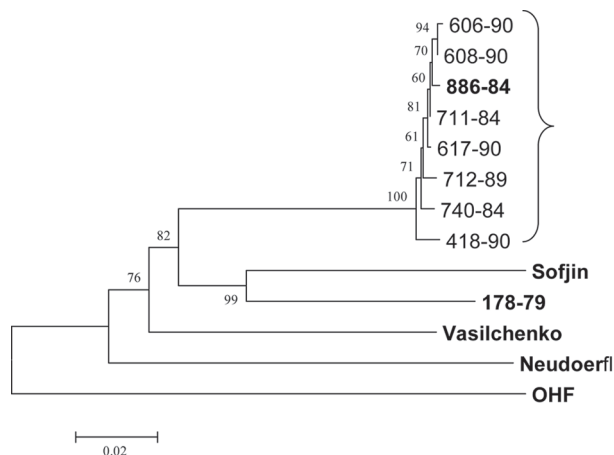


Рис. 3. Филогенетическое дерево (NJ, Kimura 2), построенное на основе анализа фрагмента генома ВКЭ, соответствующего генам С, М и части Е (1650 н.о.).

Проведенные нами исследования позволили установить, что ВКЭ «группы 886» имеет собственный ареал. Штаммы, входящие в состав данного варианта ВКЭ, были выделены из материала, собранного на территории Республики Бурятия, Иркутской области

и Забайкальского края. Об изоляции двух штаммов «группы 886» из клещей *I. persulcatus* (1999 г.) и одного из *Myodes rutilus* (2010 г.), отловленных на территории Национального парка «Алханай» Дудьдургинского района Забайкальского края сообщил Е.И. Андаев и соавт. [1]. Недавно в литературе описан случай менингоэнцефалита с летальным исходом в Булганском аймаке Монголии, который был вызван изолятом, имеющим генетическую структуру, аналогичную штамму 886-84 [15]. Общей особенностью вышеперечисленных территорий является то, что на каждой из них отмечается совмещение нескольких ландшафтных формаций, что обеспечивает большое разнообразие флоры и фауны.

Нами получены данные об экологической связи штаммов «группы 886» со всеми звеньями трансмиссивной цепи. Так, штаммы 712-89, 418-90, 606-90, 608-90, 617-90, 636-90, 691-90, 733-90 и 742-90 изолированы от клещей *I. persulcatus*, штаммы 711-84 и 740-84 – из мозга красно-серой полевки, штамм 886-84 – из мозга красной полевки.

Описанный в литературе летальный случай менингоэнцефалита в Монголии, вызванный штаммом, гомологичным штамму 886-84, свидетельствует в пользу

возможного участия данного варианта ВКЭ в инфекционной патологии человека, а изоляция штаммов «группы 886» на протяжении длительного периода времени (с 1983 по 2010 гг.) подтверждает стабильность его циркуляции на территории Восточной Сибири. Таким образом, штаммы «группы 886» обладают всеми необходимыми характеристиками для их

выделения в самостоятельный генотип ВКЭ. Ранее мы предположили, что два штамма 178-79 и 886-84, не вошедшие в состав трех основных генотипов ВКЭ и образовавших собственные ветви на филогенетическом древе, могут являться представителями генотипов 4 и 5 [5,6]. Представленные данные являются подтверждением и развитием данной гипотезы, и позволяют выделить в качестве нового генотипа 5 штаммы, обладающие комплексом свойств, присущих описанному в данной работе штаммам «группы 886» ВКЭ.

Наряду с установлением оригинальной генетической структуры штаммов «группы 886» мы сочли необходимым оценить их фенотипические характеристики, которые являются важной составляющей полноценного представления о природе и свойствах вируса, и имеют большое значение для практической вирусологии.

Оценку степени вирулентности штаммов ВКЭ «группы 886» проводили по двум показателям: среднему инфекционному титру при заражении молодых белых мышей в мозг и при периферическом введении. Периферическую активность характеризовали индексом инвазивности (И). Титры вируса при мозговом заражении мышей варьировали от 6,64 до 10,9 lgLD<sub>50</sub>/мл, а при периферическом введении – от 3,8 до 9,8 lgLD<sub>50</sub>/мл. Индексы инвазивности находились на уровне высоких и средних значений (от 0,8 до 3,04 lgLD<sub>50</sub>/мл). Шесть штаммов из «группы 886» обладали высокими инвазивными свойствами, что свидетельствует об их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножаться в ней. Наибольшими инвазивными свойствами обладали штаммы, изолированные от грызунов, а также штамм 712-89, изолированный от клещей из Красночикийского района Забайкальского края. Два штамма (606-90 и 608-90) из Бичурского района Республики Бурятия обладали низкой нейроинвазивной активностью.

Недавно в научной литературе появилось сообще-

ние о случае менингоэнцефалита с летальным исходом в Монголии, вызванного изолятом ВКЭ, уровень гомологии которого со штаммом 886-84 составил 98,5%. Заражение данного человека произошло на территории Булганского аймака, примыкающего с юга к четырем очагам, в которых был собран материал и изолированы штаммы «группы 886». Через 11 дней после укуса больной был госпитализирован с диагнозом «менингоэнцефалит» и скончался на 11-й день болезни [15]. Обнаружение РНК ВКЭ в образцах продолговатого мозга, коры головного мозга и мягкой мозговой оболочки указывает на многоуровневую локализацию поражения, которая присуща, по данным литературы, наиболее тяжелым формам острого КЭ, приводящим к летальному исходу и инвалидизации [13].

Учитывая уникальность генетических и антигенных свойств штамма 886-84, он сам и штаммы, входящие в данную группу, возможно, могут рассматриваться как кандидаты для создания универсальных, эффективных в отношении различных серотипов (субтипов) ВКЭ диагностикумов и вакцин, проблема создания которых до сих пор остается актуальной. Мы провели изучение штаммов ВКЭ «группы 886» по комплексу критериев, предложенных Л.С. Веретой и М.С. Воробьевой и предъявляемых к таким штаммам [3].

При исследовании штаммов в реакции гемагглютинации с гусиными эритроцитами все штаммы ВКЭ «группы 886» проявляли гемагглютинирующую активность (титр в РГА 1:1280-10240). В РДПА с перекрестно адсорбированными штаммоспецифическими сыворотками штамм 886-84 проявлял одинаковую степень родства со всеми подтипами ВКЭ. Высокая степень антигенного перекреста с восточносибирским и дальневосточным серотипами отмечена в РН у штаммов 886-84, 711-84 и 740-84. В РН штамм 886-84 проявлял антигенное родство со штаммом Лесопарк-11, штамм 740-84 – с дальневосточным штаммом Софьин и штаммом Лесопарк-11. Штамм 711-84 не удалось четко типировать в данной реакции.

Одним из важных генетических признаков, который учитывается при первоначальном отборе штаммов ВКЭ для производства инактивированных препаратов, является устойчивость вирусов к прогреванию. Показатель  $IgT_{50}$ /мл при 37°C варьировал от 3,5 до 8,26. По маркеру терморезистентности все изученные штаммы разделились на три группы: термостабильные ( $T^{50+}$ ) – девять штаммов, термолабильные ( $T^{50-}$ ) – один штамм и занимающие промежуточное положение ( $T^{50\pm}$ ) – три штамма. Все штаммы, изолированные от клещей *I. persulcatus*, собранных на территории Красночикокойского района Забайкальского края, оказались термостабильными.

При заражении культуры клеток СПЭВ все штаммы ВКЭ «группы 886» вызвали деструкцию клеточного моноста на 4-6-е сутки. Определение размера бляшек в культуре клеток под агаровым покрытием (S-признак)

показало гетерогенность изученных штаммов по данному маркеру. Так, штамм 740-84 формировал крупные бляшки диаметром 3,0 мм ( $S^+$ ), штамм 886-84 – средние  $d=2,0$  мм ( $S^+$ ), штамм 711-84 – мелкие бляшки  $d=1,-1,5$  мм ( $S^-$ ).

Изучение способности штаммов размножаться при 42°C показало гетерогенность штаммов ВКЭ «группы 886» по этому признаку. Пять изученных штаммов лучше размножались в культуре клеток СПЭВ при супраоптимальной температуре (42°). Причем из девяти «клещевых» штаммов – 8 имели  $rct_{42+}$ -признак. Среди штаммов «группы 886», изолированных от грызунов, наблюдалась большая гетерогенность. Штамм 740-84 обладал  $rct_{42+}$ -признаком, штамм 886-84 –  $rct_{42-}$ -признаком, штамм 711-84 –  $rct_{42+}$ -признаком. Все штаммы, изолированные от иксодовых клещей, отловленных на территории Красночикокойского района Забайкальского края, активно репродуцировались при температуре 42°C.

Таким образом, получены новые данные об оригинальном варианте ВКЭ, циркулирующем на территории Восточной Сибири. Показана уникальность генетической структуры штаммов ВКЭ «группы 886», которая представляет собой «переплетение» из аминокислотных последовательностей, характерных для генотипов 1, 2 и 3. Показано, что данный вариант ВКЭ может рассматриваться как самостоятельный генотип 5 ВКЭ (высокий уровень генетических отличий от других генотипов – более 12%, наличие собственного ареала, экологическая связь со всеми звеньями трансмиссивной цепи, участие в инфекционной патологии человека, стабильность и длительность циркуляции в природе). Выявленная способность развития очаговых форм КЭ с летальным исходом и результаты лабораторной оценки степени вирулентности свидетельствуют о высоком патогенном потенциале ВКЭ «группы 886». Изучение генетических маркеров, связанных с особенностями внутриклеточной репродукции, показало, что штаммы «группы 886» обладают хорошими адаптивными способностями и, следовательно, могут легко приспосабливаться к циркуляции в составе разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон. Среди исследованной выборки имеются штаммы, обладающие широким спектром антигенных связей, хорошей гемагглютинирующей и нейтрализующей активностью, высокой степенью вирулентности, устойчивостью к воздействию высоких температур. Они соответствуют основным критериям, используемым при первоначальном отборе штаммов на роль кандидатов для приготовления диагностических и вакцинных препаратов.

Авторы выражают благодарность коллегам, принимавшим участие в сборе полевого материала, а именно, сотрудникам отдела природно-очаговых инфекций ИЭМ: Е.В. Арбатской, И.В. Воронко, О.З. Горину, Н.А. Гусаровой, Г.А. Данчиновой, В.М. Коган, С.И. Липину, О.В. Мельниковой, А.Г. Трухиной.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андаев Е.И., Сидорова Е.А., Борисова Т.И. и др. Клещевой энцефалит в Забайкальском крае и молекулярно-биологическая характеристика возбудителя // Национальные приоритеты России. – 2011. – Т. 5. №2. Спец. выпуск. – С.148-150.
2. Бочкова Н.Г., Жезмер В.Ю., Трухина А.Г. и др. Изучение серотипа Айна/1448 вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. – 1985. – №5. – С.572-575.
3. Верета Л.А., Воробьева М.С. Природная гетерогенность и целенаправленный отбор штаммов вируса клещевого энцефалита. – М.: Медицина, 1990. – 124 с.
4. Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М. и др. Генетическая вариабельность и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов // Вопр. вирусол. – 2009. – №3. – С.33-42.
5. Злобин В.И., Демина Т.В., Мамаев Л.В. и др. Анализ генетической вариабельности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка

оболочки Е // Вопр. вирусол. – 2001. – №1. С.2-16.

6. Злобин В.И., Демина Т.В., Беликов С.И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки // Вопр. вирусол. – 2001. – №1. – С.16-21.

7. Злобин В.И., Беликов С.И., Джиоев Ю.П. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 271 с.

8. Карань Л.С., Маленко Г.В., Бочкова Н.Г. и др. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – №4. – С.34-40.

9. Кларк Д. Дальнейшие исследования антигенных связей между арбовирусами группы Б // Бюллетень ВОЗ. – 1964. – Т. 31. №1. – С.50-67.

10. Молекулярная клиническая диагностика: метод / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.

11. Овчинникова Э.А., Карпович Л.Г., Левкович Е.Н. Изучение терморезистентности штаммов вируса комплекса

клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирусностью для лабораторных животных // Вопр. вирусол. – 1967. – №5. – С.607.

12. *Погодина В.В., Савинов А.П.* Variation in the pathogenicity of viruses of the tick-borne encephalitis complex for different animal species. I. Experimental infection of mice and hamsters // Acta virologica. – 1964. – №8. – С.424-434.

13. *Погодина В.В., Левина Л.С., Карань Л.С. и др.* Летальные исходы клещевого энцефалита, вызванного сибирским подтипом возбудителя в европейской части России и на Урале // Мед. вирусология. – 2009. – Т. XXVI. – С.121-122.

14. *Трухина А.Г.* Особенности циркуляции возбудителя КЭ в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья: Дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 1989. – 176 с.

15. *Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Unursaikhan U., et al.* Characterization of tick borne encephalitis virus that

caused the lethal meningoencephalitis human in Mongolia // Inter. Conference Zoonotic infections disease and tourism. – Ulaanbaatar, 2009. – P.88-93.

16. *Pletnev A.G., Yamshikov V.F., Blinov V.M.* Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polypeptide of tick-borne encephalitis virus // Virology. – 1990. – Vol. 174. – P.250-263.

17. *Reed L., Muench H.A.* A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints // Am. J. Hyg. – 1938. – №27. – P.493-497.

18. *Rubin S.G., Chumakov M.P.* New data on the antigenic types of tick-borne encephalitis (TBE) virus // Arboviruses in the Mediterranean Countries. – Stuttgart, New York, 1980. – P.231-236.

19. *Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. №10. – P.2731-2739.

**Информация об авторах:** 664025, Иркутск, Карла Маркса, 3, ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, Институт эпидемиологии и микробиологии, лаборатория молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, тел. (3952) 333951, Козлова Ирина Валерьевна – д.м.н., руководитель лаборатории, e-mail: diwerhoz@rambler.ru; Верховина Марина Михайловна – к.б.н., биолог, тел. (3952) 234197, e-mail: diwerhoz@rambler.ru; Демина Татьяна Васильевна – к.б.н., с.н.с., e-mail: demina2006@mail.ru; Джигоев Юрий Павлович – к.б.н., с.н.с., e-mail: alanir07@mail.ru; Ткачев Сергей Евгеньевич – н.с., 630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, д. 8, тел. (383) 333677, e-mail: sergey.e.tkachev@mail.ru; Карань Людмила Станиславовна – с.н.с., тел. (495) 305-5424, e-mail: karan@prc.ru; Дорошенко Елена Константиновна – м.н.с., e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru; Лисак Оксана Васильевна – м.н.с., e-mail: lisak.lisa@rambler.ru; Сунцова Ольга Владимировна – н.с., e-mail: Olga\_syntsova@list.ru; Парамонов Алексей Игоревич – м.н.с., e-mail: paramonov\_a.i@mail.ru; Черноиванова Ольга Олеговна – м.н.с., e-mail: na\_sviazi@mail.ru; Ревизор Александр Олегович – аспирант, e-mail: alexandrrev@rambler.ru; Злобин Владимир Игоревич – академик РАМН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, e-mail: vizlobin@mail.ru.

© ДРУЖИНИНА Т.А., БАРАНОВА Н.С. – 2012  
УДК: 616-036.22

### КЛЕЩЕВОЙ ВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ В ЯРОСЛАВСКОЙ ОБЛАСТИ: ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, КЛИНИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ

*Татьяна Александровна Дружинина<sup>1</sup>, Наталия Сергеевна Баранова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Управление Роспотребнадзора по Ярославской области, руководитель – С.А. Мелюк,  
<sup>2</sup>Ярославская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. А.В. Павлов

**Резюме.** В статье представлены данные многолетнего эпидемиологического мониторинга клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) в Ярославской области, расположенной на территории Центрального Федерального округа. Проведен ретроспективный анализ динамики заболеваемости КВЭ, особенностей клиники заболеваний, антропогенных очагов. Представлены данные энтомологических и лабораторных исследований иксодовых клещей, свидетельствующие о потенциальной возможности заражения людей КВЭ через укусы клещей рода *Dermacentor*. Дана оценка результатов профилактики КВЭ в Ярославской области, позволяющей удерживать заболеваемость на низком уровне – иммунизации населения области, acaricidным обработкам мест массового пребывания, постоянного и временного проживания людей, в первую очередь, в активных очагах КВЭ.

**Ключевые слова:** клещевой вирусный энцефалит, эпидемиологический мониторинг, природные и антропогенные очаги, иксодовые клещи, вакцинопрофилактика, acaricidные обработки.

### TICK-BORNE VIRAL ENCEPHALITIS IN THE YAROSLAVL REGION: EPIDEMIOLOGY, CLINICAL AND PROPHYLAXIS DATA

*T.A. Druzhinina<sup>1</sup>, N.S. Baranova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Rospotrebnadzor of Yaroslavl region; <sup>2</sup>Yaroslavl State Medical Academy

**Summary.** In the article the facts of many years epidemiological monitoring of tick-borne viral encephalitis in the Yaroslavl region (the Central federal district) are presented. The retrospective analysis of dynamics of TVE sickness rate, the features of clinical picture of the disease and anthropological hotbeds of the infection was carried out. The facts about entomological and laboratory investigations of ticks (*Ixodidae*) were presented. They indicate the potential possibility of contamination with TVE by means of ticks genus *Dermacentor*. The estimate of the results of TVE prophylaxis in Yaroslavl region was given. The prophylaxis allows to hold the illness rate on the low level and includes: immunization of the population of the region, acaricid treatment of mass people places of constant and temporary residence, in the first place in the active hotbeds of TVE.

**Key words:** the tick-borne viral encephalitis, epidemiological monitoring, natural and anthropogenic hotbeds, ixodic ticks, vaccine prophylaxis, acaricid treatment.

Ярославская область является одной из эндемичных по вирусному клещевому энцефалиту (КВЭ) территорий в Центральном федеральном округе, где ежегодно регистрируются случаи этой тяжелой нейроинфекции.

По уровню заболеваемости регион находится на втором месте после Костромской области, граничащей с Ярославской областью. Интенсивность эпидемического процесса КВЭ на территории области на протяжении



всего периода наблюдения была обусловлена не только спецификой природных очагов этой инфекции, но и изменяющимися климатическими и социальными условиями.

Официальная регистрация заболеваний КВЭ санитарно-эпидемиологической службой в Ярославской области начата с 1947 года. С этого года за период 12 лет (до 1959 г.) было зарегистрировано 40 случаев КВЭ среди сельского населения в северных районах области (Пошехонский, Любимский, Даниловский), расположенных в лесной ландшафтной зоне.

Стремительный рост заболеваемости и более широкое распространение по территориям области КВЭ отмечалось в 1967 г., когда были зарегистрированы 58 заболеваний в 9 районах области и впервые множественные случаи заболеваний КЭ появились среди городских жителей: 8 – в г. Ярославле и 3 – в г. Рыбинске (19% от числа всех заболевших).

Однако более значительный подъем заболеваемости КВЭ в области, как и в целом по России [4] начался в 90-х годах прошлого столетия. Так с 1992 г., она увеличилась в сравнении с предыдущим годом в 3 раза и достигла показателя 1,2 на 100 тыс. населения. Уровни заболеваемости КВЭ в Ярославской области ежегодно, как правило, ниже средних показателей по России, однако они являются одними из самых высоких по Центральному федеральному округу [2].

Цель работы: выявление эпидемиологических особенностей очагов КВЭ на территории Ярославской области, оценка адекватности мер профилактики на основании данных многолетнего мониторинга.

### Материалы и методы

Материалами для исследования явились данные эпидемиологического мониторинга очагов КВЭ, осуществляемого Управлением Роспотребнадзора по Ярославской области в период 1996-2011 гг. В анализ включены результаты эпидемиологических, лабораторных, зоологических и энтомологических исследований, проводимых в природных и антропогенных очагах этой зоонозной нейротрофической, по данным годовых отчетов и государственных докладов «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Ярославской области» Центра Госсанэпиднадзора в Ярославской области, с 2005 г. – Управления Роспотребнадзора по Ярославской области.

Лабораторные исследования с целью выявления антигена вируса клещевого энцефалита (КВЭ) в клещах, снятых с людей в Ярославской области проводились методом иммуноферментного анализа (ИФА) в лаборатории особо-опасных болезней ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области», аккредитованной на проведение этих исследований в установленном порядке, вирусологические исследования материала от умерших от КВЭ, клещей и выделенных вирусов проводились в НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова.

В работе использовались методы оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа, опосредованная статистика, относительные величины. Математическую обработку материалов проводили с помощью прикладной программы Excel.

### Результаты и обсуждение

За период с 1996 по 2011 гг. в Ярославской области зарегистрирован 351 случай заболевания КВЭ. При анализе многолетней динамики заболеваемости КВЭ в период 1996-2011 гг. установлены ежегодные колебания показателей заболеваемости в пределах от 0,58 до 3,25 на 100 тыс. населения (рис. 1).

Следует отметить, что на фоне очевидной тенденции

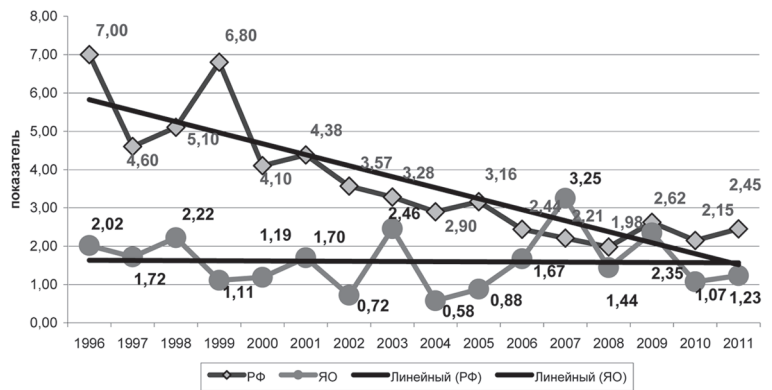


Рис. 1. Сравнительная динамика заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом за период 1996-2011 г. по России, Ярославской области (на 100 тыс. населения).

ежегодного снижения заболеваемости КВЭ в России в период с 1996 по 2010 гг., в Ярославской области произошла стабилизация ее на уровне средних многолетних показателей – 1,49 на 100 тыс. населения. Максимального уровня заболеваемости КВЭ достигала в 2007 г. (3,25 на 100 тыс. населения), когда активно реализовался алиментарный путь передачи инфекции. Фактором передачи послужило козье молоко, продаваемое фермером на рынке в г. Рыбинске, употребляемое населением без термической обработки.

В настоящее время стойкие природные и антропогенные очаги КВЭ сформировались на территориях большинства районов области. Исключение составляют города Переславль, Углич, Большесельский, а также Переславский, Угличский МО, расположенные в луго-лесо-полевой ландшафтной зоне и ополье. В последние 20 лет мозаичность активности природных очагов КВЭ на территории области увеличилась. Заражения этой инфекцией происходят на территориях 2-х из 5 ландшафтных зон, имеющих на территории области – лесной и пойменно-болотной [3].

Так ежегодно случаи заражений и заболеваний КВЭ в 2007-2011 гг. отмечались на территориях городов Рыбинска, Ярославля, а также Рыбинского, Некрасовского, Ярославского, Любимского, Даниловского районов, расположенных в этих зонах.

На протяжении последних 3-х лет происходит увеличение удельного веса заражений в антропогенных очагах – по месту постоянного проживания заболевших КВЭ – в 2009 г. – 35,5%, в 2010 г. – 21,4%, в 2011 г. – 37,5%, на дачах в 2010 г. – 42,8%, в 2011 г. – 56,0%.

По клиническому течению в Ярославской области преобладает лихорадочная форма заболевания, однако в последние три года увеличился удельный вес очаговых форм заболеваний с 16 до 25% на фоне циркуляции Сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита [2]. Периодически регистрируются летальные исходы от КВЭ у взрослых – 2008-2009 гг. – по 3 случая.

В феврале 2012 г. впервые в области зарегистрирована персистирующая форма КВЭ у ребенка 6 лет, проживающего в г. Ярославле в эндемичном по этому заболеванию районе. Ребенок заболел остро 02.02.2012 г., подъем температуры тела до 38°C, недомогание, кашель, первичный диагноз – ОРВИ. 08.02.2012 г. самочувствие резко ухудшилось, ребенок потерял сознание, появилась спутанная речь, нарушение походки. Родители вызвали скорую помощь, в этот же день ребенок был доставлен в реанимационное отделение ИКБ №1 с диагнозом гнойный менингит. 13.02.2012 г. получен результат исследования ликвора: методом ИФА выявлен антиген КВЭ. В ликворе – лимфоцитарный плеоцитоз до 100 клеток, содержание белка в норме. Эпидемиологический анамнез: против КВЭ не привит, козье молоко не употреблял. Родители факта присасывания клеща не отмечали.

По данным энтомологических исследований на территории региона наиболее распространенными пере-

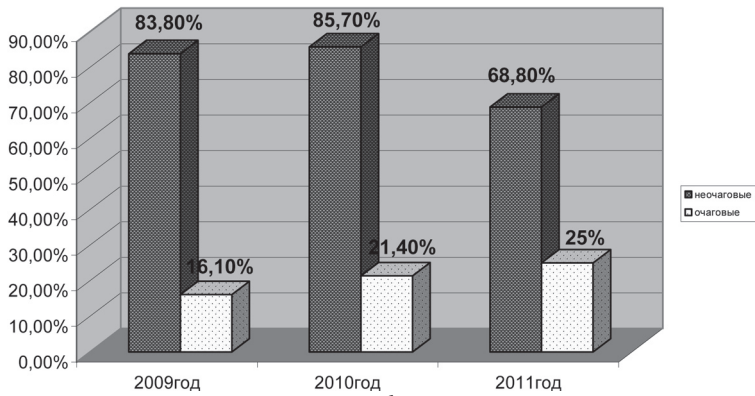


Рис. 2. Формы клещевого энцефалита за период 2009-2011 гг.

носчиками клещевых трансмиссивных инфекций являются клещи рода *Ixodes*, в частности вида *I. persulcatus*. Однако, следует отметить, что в весенне-летний период (с марта по июль) основными переносчиками ВКЭ и боррелий по данным энтомологических и вирусологических исследований являются клещи *I. persulcatus*, а в летне-осенний период (с августа по октябрь) переносчиками ВКЭ и боррелий являются клещи *Dermacentor reticulatus* и *I. ricinus*.

Так, в период с 10.10 по 01.11 гг. в лабораторию особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» были доставлены на исследование 47 клещей, снятых с людей, из которых 59,5% оказались *D. reticulatus*, остальные – *I. ricinus*. В клещах *D. reticulatus* в 14,2% выявлен антиген ВКЭ, причем только в самках. В клещах *I. ricinus* выявлены только боррелии в 16,7%.

Группой риска по заболеваниям КВЭ на протяжении всего периода наблюдения являются городские жители, непривитые и не применяющие средства индивидуальной защиты от клещей – их удельный вес в числе заболевших составляет 81,25% [1].

В возрастной структуре заболевших 43,7% составили люди пенсионного возраста. Дети в последние годы КВЭ не болеют, так как в большей части привиты вакциной. Охват иммунизацией против ВКЭ детей, проживающих в населенных пунктах на высокоэндемичных территориях пойменно-болотной и лесной ландшафтных зон, достигает 68-83%.

Эпидемиологический мониторинг КВЭ в Ярославской области предусматривал проведение лабораторных исследований материала от больных людей и клещей. В работе использовались наборы реагентов «ВектоВКЭ-антиген» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), предназначенные для иммуноферментного выявления антигена ВКЭ в клещах и ликворе человека и животных, которые на протяжении последних трех лет неоднократно совершенствовались производителем, изменялись подходы к вычислению критических значений оптической плотности.

Так 2008 и 2011 гг. в тест-системах был увеличен по-

Результаты исследований вирусозности клещей в Ярославской области в период с 2002 по 2011 гг.

Год	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Исследовано клещей (абс.)	272	1692	1477	2483	3502	4240	8706	10324	4445	5713
Полож. рез.	14	136	150	373	440	331	198	251	169	86
%	6,3	6,9	10,2	15,0	12,6	7,8	2,3	2,4	3,8	1,5

рог определения критического значения оптической плотности на 0,1, вследствие этого показатели заражен-

ности клещей в Ярославской области значительно снизились и составили соответственно 2,3% и 1,5%, тогда как в период 2002-2007 гг. удельный вес вирусозных клещей варьировал в пределах от 6,3 до 12,6% (табл. 1).

Вместе с тем заболеваемость ВКЭ людей при этом оставалась в пределах обычных, характерных для Ярославской области показателей – 1,01-1,23 на 100 тыс. населения. Это свидетельствует об относительном постоянстве удельного веса зараженных ВКЭ клещей. Лабораторные исследования клещей, проводимые современными наборами реагентов «ВектоВКЭ-антиген» позволяют выявлять вирусозных клещей с более высокой концентрацией антигена ВКЭ.

Гетерогенность степени вирусозности клещей выявляется в ходе лабораторных исследований. Эпидемиологические наблюдения и лабораторные исследования свидетельствуют о зависимости клинических проявлений ВКЭ от степени вирусозности клещей, концентрации антигена.

Так из числа заразившихся на территории Ярославской области и заболевших ВКЭ в мае 2010 г. четверо взрослых (возраст – 24, 43, 48 и 54 года) сдали клещей, которые были сняты с них после присасывания в лабораторию ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области» на исследование. По результатам исследований в ИФА превышение значений критической оптической плотности составило соответственно 31, 26,9, 30 и 30 раз. Следует отметить, что у больного К., 24 года положительный результат на IgM в сыворотке крови к вирусу клещевого энцефалита был получен на 5-й день после укуса клеща.

В 2011 г. параметры степени вирусозности клещей находились в пределах превышения значений критиче-

Таблица 2

Распределение лабораторно исследованных клещей по превышению показателей оптической плотности в ИФА на выявление антигена вируса клещевого энцефалита в 2011 г.

Показатели превышения оптической плотности	1,0-2,5 раз	2,6-4,5 раз	4,6-6,5 раз	6,6-8,0 раз	9,0-10,0 раз	11,0-12,0 раз	13,0-16,0 раз
Число вирусозных клещей	77	4	1	2	0	1	1
%	89,5	4,65	1,16	2,32		1,16	1,16

ской оптической плотности в ИФА от 1-2,5 до 16 раз. Наибольший удельный вес составляли клещи с превышением оптической плотности в ИФА на антиген ВКЭ в 1-2,5 раза – 89,5% (табл. 2). Число заболевших ВКЭ в 2011 г. составило 16 человек, на уровне 2010 г.

В профилактике КВЭ определяющее значение имеет вакцинопрофилактика населения. За период 2001-2011 гг. привито против ВКЭ 8% населения всей области, в том числе дети – 34%.

По мере реализации планов профилактики КВЭ, число вакцинированных ежегодно возрастает – с 1889 человек в 2002 г., до 27177 в 2011 г. (рис. 3). Следует отметить, что первоочередное значение придается специфической иммунизации детей на высокоэндемичных по КВЭ территориях области – их удельный вес в сумме привитых составляет более 70%. Привитость детского населения в городах Ярославле, Рыбинске и прилегающих к ним районах достигла в 2011 г. 68-83%.

Таблица 1

Иммунизация проводилась вакцинами «ЭнцеВир», «ЭнцеПур» взрослый, «ЭнцеПур» детский, ФСМЕ для детей, сухой культуральной производства ФГУП им. М.П. Чумакова (для детей применяется только детская вакцина).

Следует отметить, что в последние пять лет среди заболевших КВЭ лиц, ранее привитых вакциной, не было.

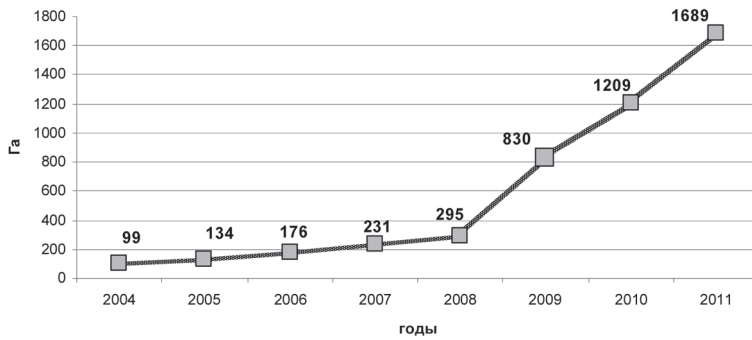


Рис. 4. Динамика проводимых акарицидных обработок на территории Ярославской области за период 2004-2011 гг.

В области ежегодно увеличиваются объёмы акарицидных обработок мест массового пребывания людей: загородных мест отдыха детей и взрослых, санаториев, лесопарковых зон, кладбищ, палаточных лагерей (рис. 4). План акарицидных обработок на 2011 г. – 1125,275 га выполнен в полном объеме. Это позволило исключить факты присасывания клещей в загородных учреждениях отдыха, снизить число укушенных клещами в населенных пунктах.

Таким образом, в условиях эндемичного по КВЭ региона, расположенного в Центральном федеральном округе, происходит увеличение удельного веса заражений КВЭ в антропоургических очагах – по месту проживания заболевших.

Следует отметить, что случаи заражений и заболеваний КВЭ в 2007-2011 гг. отмечались на территориях с высокой плотностью населения (г. Рыбинска, Ярославля), а также в сельской местности, прилегающей к городам, расположенным в лесной и пойменно-болотной ландшафтных зонах.

По клиническому течению в Ярославской области преобладает лихорадочная форма заболевания, однако в последние три года увеличился удельный вес очаговых форм заболеваний с 16% до 25%, имеются летальные исходы у взрослых, в 2012 г. зарегистрирован

один случай персистирующей формы КВЭ.

Группой риска по заболеваниям КВЭ на протяжении всего периода наблюдения являются городские жители, непривитые и не применяющие средства индивидуальной защиты от клещей – удельный вес которых в числе заболевших составляет 81,25% [1]. В возрастной структуре заболевших 43,7% составили люди пенсионного возраста. В комплексной работе по профилактике КВЭ в Ярославской области в настоящее время основное внимание уделяется вакцинопрофилактике населения, проживающего на эндемичных территориях, акарицидным обработкам мест массового пребывания людей, санитарно-разъяснительной работе с населением.

количество вакцинированных

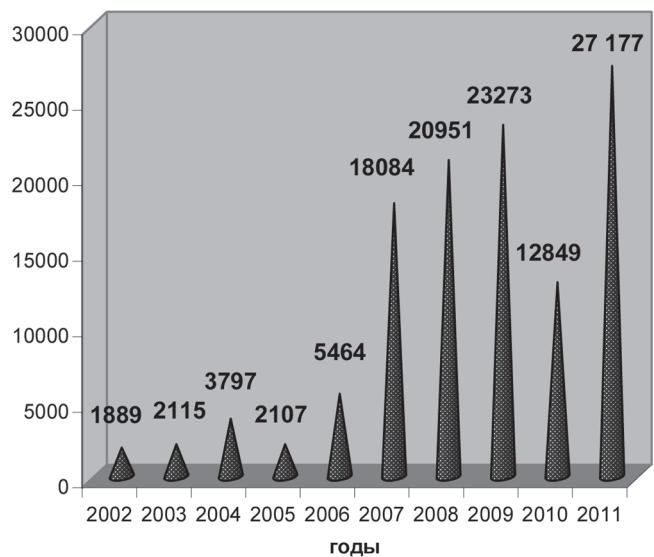


Рис. 3. Динамика вакцинации против клещевого энцефалита за период 2002-2011 гг.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баранова Н.С., Спиринов Н.Н., Дружинина Т.А. и др. Клещевые инфекции в Ярославской области // Вестник Уральской государственной медицинской академии. – 2010. – Вып. №21. – С.33.
2. Дружинина Т.А., Зайцева Л.А., Шалепов Е.В. и др. Клещевые трансмиссивные инфекции в Ярославской области – эпидемиология, лабораторная диагностика, совершенствование профилактики // Медицинская вирусология. – М., 2009. – Т. XXVI. – С.75.

3. Дружинина Т.А., Погодина В.В., Бочкова Н.Г. и др. Природно-очаговые инфекции, передаваемые иксодовыми клещами в Ярославской области. Эпидемиологические аспекты // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2003. – №2. – С.51.
4. Ястребов В.К., Хазова Т.Г. Оптимизация системы эпидемиологического надзора и профилактики клещевого вирусного энцефалита // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. – №1. – С.19-24.

**Информация об авторах:** Дружинина Татьяна Александровна – д.м.н., доцент, зам. руководителя Управления Роспотребнадзора по Ярославской области, адрес: 150003, Ярославль, ул. Войнова, 1, e-mail: druzhinina\_ta@76.rospotrebnadzor.ru; Баранова Наталья Сергеевна – к.м.н., доцент, адрес: 150000 Ярославль, ул. Революционная, 5, ЯГМА, e-mail: baranova\_ns@mail.ru.

© ГЛУШАКОВА Л.И., КОРАБЕЛЬНИКОВ И.В., ТЕРНОВОЙ В.А., ПРОТОПОПОВА Е.В., МИКРЮКОВА Т.П., КОНОНОВА Ю.В., КОНОВАЛОВА С.Н., ТУПОТА Н.Л., КАРТАШОВ М.Ю., ЧАУСОВ Е.В., ЛОКТЕВ В.Б., ЕГОРОВА Ю.И. – 2012  
УДК: 579.26; 579.8:616-036.22

#### ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ В *IXODES PERSULCATUS* НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КОМИ

Людмила Ивановна Глушакова<sup>1</sup>, Игорь Васильевич Корабельников<sup>2</sup>, Владимир Александрович Терновой<sup>3</sup>, Елена Викторовна Протопопова<sup>3</sup>, Тамара Петровна Микрюкова<sup>3</sup>, Юлия Владимировна Кононова<sup>3</sup>, Светлана Николаевна Коновалова<sup>3</sup>, Наталья Леонидовна Тупота<sup>3</sup>, Михаил Юрьевич Карташов<sup>3</sup>, Евгений Владимирович Чаусов<sup>3</sup>, Валерий Борисович Локтев<sup>3</sup>, Юлия Ивановна Егорова<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Управление Роспотребнадзора по Республике Коми, Сыктывкар, руководитель – д.м.н., проф. Л.И. Глушакова;  
<sup>2</sup>ФГУП «Дезинфекция», Роспотребнадзора, Сыктывкар, директор – д.м.н., проф. И.В. Корабельников;  
<sup>3</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово Новосибирской области, руководитель – д.м.н., проф. А.Н. Сергеев; <sup>4</sup>Сыктывкарский государственный университет, ректор – д.э.н., проф. В.Н. Задорожный)

**Резюме.** В Республике Коми в последние годы регистрируется рост числа заболевших клещевым энцефалитом и клещевым боррелиозом после контакта с таежным клещом. Проведено исследование клещей *Ixodes persulcatus*, собранных на территории республики Коми в 2010 г., методом полимеразной цепной реакции для выявления генетических маркеров возбудителей клещевых инфекций. В клещах *I. persulcatus*, собранных в биотопах Республики Коми, обнаружена РНК или ДНК восьми инфекционных агентов: вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ) и Западного Нила (ВЗН), *Borrelia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Anaplasma spp.* Уровень инфицированности клещей варьировал от 0,4% до 13,4% в зависимости от вида возбудителя, а уровень смешанных клещевых инфекций достигал 6,3%. Чаще всего встречалась микст-инфекция ВКЭ и *Borrelia spp.*

**Ключевые слова:** Республика Коми, клещи *Ixodes persulcatus*, вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила, *Borrelia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Anaplasma spp.*

#### DETECTION OF CAUSATIVE AGENTS IN IXODES PERSULCATUS IN THE KOMI REPUBLIC

L.I. Glushakova<sup>1</sup>, I.V. Korabelnikov<sup>2</sup>, V.A. Ternovoy<sup>3</sup>, E.V. Protopopova<sup>3</sup>, T.P. Mikrukova<sup>3</sup>, Yu.V. Kononova<sup>3</sup>, S.N. Konovalova<sup>3</sup>, N.L. Tupota<sup>3</sup>, M.Yu. Kartashov<sup>3</sup>, E.V. Chausov<sup>3</sup>, V.B. Loktev<sup>3</sup>, Yu.I. Egorova<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Department of Rospotrebnadzor of Komi Republic, Syktyvkar; <sup>2</sup>FGUP «Desinfection», Syktyvkar; <sup>3</sup>FGUN State Scientific Centre of Virusology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk region; <sup>4</sup>Syktyvkar State University, Syktyvkar)

**Summary.** The increase in tick-borne encephalitis and tick-borne borreliosis incidents after the tick bites in the Komi Republic were registered in recent years. The investigation of *Ixodes persulcatus* collected in the territory of the Komi Republic in 2010 was studied by the method of polymerase chain reaction for detection of genetic markers of pathogens of tick-borne infections. The presence of RNA or DNA of eight infectious agents was detected in *Ixodes persulcatus* collected in biotopes of the Komi Republic including viruses of tick-borne encephalitis and West Nile virus, *Borrelia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Anaplasma spp.* Infection rate of ticks are ranged from 0,4% to 13,4% depending on the type of pathogen, and the level of mixed tick-borne infections reached 6,3%. The mixed-infection of tick-borne encephalitis and *Borrelia spp.* were revealed more often.

**Key words:** Komi Republic, ticks *Ixodes persulcatus*, tick-borne encephalitis virus, West Nile virus, *Borrelia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Anaplasma spp.*

В РФ наиболее значимым переносчиком инфекционных заболеваний человека служит таежный клещ (*Ixodes persulcatus*). Клещи этого вида являются переносчиками многих инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной и протозойной природы [8]. Современные границы ареала таежного клеща простираются в направлении с востока на запад полосой в пределах зоны таежных лесов на территории севера Евразии [6]. На территории Республики Коми точные границы клещей вида *I. persulcatus* четко не определены, однако известно, что в последние десятилетия произошло резкое продвижение границы на север.

Цель работы: выявление спектра возбудителей основных клещевых инфекций в таежном клеще методами генетической диагностики и уточнение географии распространения клещевых инфекций и таежного клеща на территории Республики Коми.

#### Материалы и методы

В течение весенне-летнего периода 2010 г. собрано 1137 клещей в южных и центральных районах республики, где наиболее часто регистрируются укусы клещей. Сбор клещей проводился на флаг с растительности. Участки для сбора подбирались в типичных местах обитания клещей: лиственные и смешанные леса с хорошо развитым травянистым покровом, вырубки с естественным возобновлением лиственных пород, дуга, обочины дорог. Географические координаты участков сбора определяли при помощи навигационной системы NAVITEL с точностью до 10 метров. Периодичность сбора на флаг для оценки численности клещей составляла 7-14 дней. Собранные клещи помещались в индивидуальные пластиковые пробирки, и хранились в морозильной камере при температуре -18-24°C [9].

Для выявления генетического материала возбудителей клещевых инфекций в индивидуальных клещах использовался метод ПЦР в режиме реального времени

со специфическими праймерами для обнаружения РНК ВКЭ, ВЗН и ДНК *Borrelia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Anaplasma spp.* как описано ранее [11]. Выявление антигенов ВКЭ и ВЗН в гомогенатах клещей проводилось с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител как описано [9].

#### Результаты и обсуждение

В настоящее время в Республике Коми ведется регистрация заболеваемости по двум инфекциям, переносчиками которых служат иксодовые клещи – это клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) и клещевой боррелиоз (КБ). В течение последних трех лет наблюдения отмечается устойчивый рост заболеваемости КВЭ и КБ. По КВЭ показатель заболеваемости превышает среднероссийский уровень [2-5,8 раз]. В таблицах 1 и 2 приведены показатели заболеваемости КВЭ и КБ на территории Российской Федерации, Республики Коми и граничащих с республикой административных территориях, где регистрируется заболеваемость КВЭ и КБ.

Таблица 1  
Показатели заболеваемости клещевым энцефалитом в Российской Федерации, Республике Коми, Кировской и Архангельской областях и Пермском крае (на 100 тыс. населения)

Субъекты РФ	Показатель заболеваемости клещевым энцефалитом (на 100 тыс. населения)		
	2008	2009	2010
Российская Федерация	1,98	2,62	2,19
Республика Коми	0,42	1,80	3,30
Кировская область	9,60	18,47	7,71
Архангельская область	5,6	9,9	7,4
Пермский край	5,0	11,1	9,5

Заболееваемость КВЭ и КБ в субъектах РФ, граничащих с Республикой Коми, значительно выше, чем в ре-

Таблица 2  
Показатели заболеваемости клещевым энцефалитом в Российской Федерации, Республике Коми, Кировской и Архангельской областях и Пермском крае (на 100 тыс. населения)

Субъекты РФ	Показатель заболеваемости клещевым энцефалитом (на 100 тыс. населения)		
	2008	2009	2010
Российская Федерация	5,41	6,82	4,98
Республика Коми	0,21	0,95	1,59
Кировская область	37,42	55,90	33,11
Архангельская область	6,6	7,9	7,9
Пермский край	12,8	19,5	16,1

спублике. Но важно отметить, что тенденция роста заболеваемости превышает российские показатели и данные по соседним субъектам. Более высокий уровень заболеваемости на сопредельных территориях дает нам возможность предположить, что в ближайшем будущем в Республике Коми можно ожидать рост заболеваемости клещевыми инфекциями.

С целью уточнения спектра возбудителей клещевых инфекций, циркулирующих в Республике Коми, было предпринято исследование иксодовых клещей, собранных в различных биотопах республики. Все собранные на флаг клещи представлены имago одного вида – *I. persulcatus* (таежный клещ). Из 1137 исследованных клещей РНК ВЗН обнаружена у 152 (13,4%), РНК ВКЭ выявлена у 104 (9,1%), ДНК *Borrelia spp.* выявлена у 80 особей – 7%. ДНК риккетсий были обнаружены в 50 образцах (4,4%). Генетический материал возбудителей других клещевых инфекций: бабезиоза, эрлихиоза, анаплазмоза, бартонеллеза выявляется в клещах в 1,6-0,4% случаев. Смешанные инфекции также встречались достаточно часто. В 6,3% случаев обнаружено наличие двух и более патогенов. Установлены варианты сочетания двух, трех и четырех инфекций, но чаще всех встречается сочетание двух инфекций. Наиболее часто совместно встречаются ВКЭ и КБ, реже всего эрлихии и бабезии.

Распространенность клещевых инфекций на территории Республики Коми представлена на рисунке 1. Важно отметить, что северная граница распространения таежного клеща, далее которой обычно таежные клещи не нападают на человека, сейчас доходит до 63° с.ш. (граница средней и северной тайги) [1].

Известно, что ареал иксодовых клещей может быть тесно связан с климатическими условиями и может существенно изменяться.

Изменение природных ландшафтов в результате деятельности человека также весьма часто считается причиной изменения распространенности иксодовых клещей и возбудителей клещевых инфекций [12].

Контакт человека с клещами весьма часто возникает на границе естественных биотопов обитания иксодовых клещей – опушки, обочины дорог, дачные участки

### ЛИТЕРАТУРА

1. Глушак Л.И., Коробельников И.В., Егорова Ю.И. Распространение *Ixodes persulcatus* в южных и центральных районах Республики Коми // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2011. – №3. – С.48-50.
2. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2010 году» / www.rospotrebnadzor.ru/document/-/journal\_content/56\_INSTANCE\_Zzk8/10156/646520 (дата обращения 13.11.2011).
3. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Кировской области в 2010 году» / www.43.rospotrebnadzor.ru/documents/gosregdoklad/

[6,7]. Регистрируются постоянные контакты населения с клещами в пригородных районах больших городов и на городской территории. В России официально регистрируется до полумиллиона случаев нападения клещей на человека [7]. Реальное количество укусов человека значительно выше, поскольку не все обращаются за медицинской помощью. Ежегодно на территории республики Коми регистрируется около 2000 укусов, причем их количество возрастает с каждым годом, что требует осуществления диагностики клещевых инфекций у людей после укуса клеща и проведения необходимых профилактических и лечебных мер по предотвращению развития заболеваний.

Таким образом, энтомологическое обследование территории Республики Коми в 2010 г. выявило существование одного эпидемиологически значимого вида иксодид – таежный клещ (*Ixodes persulcatus*). По итогам изучения инфицированности клещей методами ИФА и ПЦР у клещей, собранных на территории РК, выявлено наличие восьми видов инфекционных агентов: вируса



Рис. 1. Территориальное распределение возбудителей клещевых инфекций в Республике Коми по итогам 2010 г.

клещевого энцефалита, вируса лихорадки Западного Нила, возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, клещевого риккетсиоза, бабезиоза, эрлихиоза, анаплазмоза, бартонеллеза. Все восемь видов инфекционных агентов встречаются в южных и центральных районах Республики. Необходимо систематическое проведение занятий среди лечебной сети по изучению эпидемиологии, клиники заболеваний различных видов инфекций, выявленных в клещах, для своевременной и качественной диагностики среди людей, пострадавших от укусов клещей. Получены первые результаты исследований и необходимо продолжать динамичное исследование эпидемиологических и энтомологических особенностей клещевых инфекций на территории Республики Коми.

publications/svoddokl2010.pdf (дата обращения 13.11.2011).

4. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Пермском крае в 2010 году» / www.59.rospotrebnadzor.ru/documents/regional/gos\_doklad (дата обращения 13.11.2011).
5. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Коми в 2010 году» / www.11.rospotrebnadzor.ru/documents/regional/gos/58197 (дата обращения 13.11.2011).
6. Злобин В.И. Эпидемиологическая обстановка и проблемы борьбы с клещевым энцефалитом в Российской Федерации // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.16-23.

7. Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе / Под ред. В.В. Власова, В.Е. Репина. – Новосибирск, 2011. – 395 с.

8. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микст инфекций, передающихся иксодовыми клещами // Вестник РАМН. – 2001. – №11. – С.41-45.

9. Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Терновой В.А. и др. Выявление вируса Западного Нила и его генотипирование в иксодовых клещах (*Parasitiformes: Ixodidae*) в Томске и его пригородах // Паразитология. – 2008. – Т. 42. №3. – С.210-225.

10. Региональный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке и защите прав потребителей в Архангельской области в 2010 году» / www.29.rospotrebnadzor.ru/documents/regional/doklad (дата обращения 13.11.2011).

11. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., et al. Genetic diversity of tick-borne pathogens in Tomsk city and environs // Entomological Review. – 2010. – Vol. 90. №2. – P.240-250.

12. Leonova G.N., Kondratov I.G., Ternovoi V.A., et al. The characterization of Powassan viruses from far eastern Russia // Arch. Virol. – 2009. – Vol. 154. – P.811-820.

**Информация об авторах:** Глушкова Людмила Ивановна – д.м.н., профессор, руководитель Управления Роспотребнадзора по Республике Коми, адрес: 167000, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Орджоникидзе, 71, тел. (8212) 218423. e-mail: tu@gsknkomu.ru; Корабельников Игорь Васильевич – д.м.н., профессор, директор ФГУП «Дезинфекция», тел. (8212) 43-38-56. e-mail: gigprof@list.ru; Терновой Владимир Александрович – к.б.н., заведующий лабораторией, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 3634825, e-mail: tern@vector.nsc.ru; Протопопова Елена Викторовна – к.б.н., вед. н.с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 363-47-53. e-mail: eprotopopova@ngs.ru; Микрюкова Тамара Петровна – н.с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 3634825, e-mail: mikryukova@ngs.ru; Кононова Юлия Владимировна – к.б.н., н.с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 3367540, e-mail: yuliavk@fromru.com; Коновалова Светлана Николаевна – н.с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 3634753, e-mail: ecoteka@yandex.ru; Тупота Наталья Леонидовна – н.с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», (383) 3634825, e-mail: tern@vector.nsc.ru; Карташов Михаил Юрьевич – стажёр-исследователь, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 3634825, e-mail: mikkartash@yandex.ru; Чаусов Евгений Владимирович – к.б.н., зав. сектором, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 3634825, e-mail: egchausov@gmail.com; Локтев Валерий Борисович – д.б.н., профессор, заведующий отделом, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 3634753, e-mail: loktev@vector.nsc.ru; Егорова Юлия Ивановна – аспирант ФГ БОУ ВПО СыктГУ, тел. (8212) 433215, e-mail: yuliakomi@yandex.ru.

© РУДАКОВ Н.В., ЯСТРЕБОВ В.К., ШПЫНОВ С.Н. – 2012  
УДК: 579.26; 579.8:616-036.22

### ТРАНСМИССИВНЫЕ КЛЕЩЕВЫЕ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: ТЕНДЕНЦИИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА, АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРОФИЛАКТИКИ

Владимир Константинович Ястребов, Николай Викторович Рудаков, Станислав Николаевич Шпынов  
(Омский НИИ природно-очаговых инфекций, директор – д.м.н., проф. Н.В. Рудаков)

**Резюме.** Природно-очаговые клещевые инфекции характеризуются нарастающим эпидемиологическим значением. Это обусловлено отсутствием устойчивой тенденции к снижению заболеваемости, расширением нозоареалов и увеличением круга выявленных патогенов и нозологических форм болезней. Сочетанность природных очагов нескольких заболеваний предопределяет микст-патологию у населения. На территории Российской Федерации наибольшее значение имеют сочетанные природные очаги клещевых инфекций: клещевого вирусного энцефалита, иксодовых клещевых боррелиозов, клещевых риккетсиозов и др. Указанные обстоятельства ставят новые дополнительные задачи при осуществлении эпидемиологического надзора, выработке алгоритма этиологической лабораторной диагностики заболеваний и оптимизации терапии.

**Ключевые слова:** трансмиссивные клещевые природно-очаговые инфекции, сочетанность природных очагов.

### TRANSMISSIVE TICK-BORNE NATURAL FOCAL INFECTIONS IN THE RUSSIAN FEDERATION: TRENDS OF THE EPIDEMIOLOGICAL PROCESS, ACTUAL PROPHYLAXIS PROBLEMS

V.K. Yastrebov, N.V. Rudakov, S.N. Shpynov  
(Omsk Research Institute of Natural Foci Infections of Rospotrebnadzor)

**Summary.** Natural focal infections are characterized by an increasing epidemiological importance. This is due to the lack of a stable downward trend in incidence, expanding of nozoarea and increasing range of identified pathogens and nosological forms of diseases. The combination of natural foci of disease determines the number of mixed-pathology in the population. On the territory of the Russian Federation are the most important combined natural foci of tick-borne infections: tick-borne encephalitis, tick-borne borreliosis, tick-borne rickettsioses, etc. This requires improved epidemiological surveillance, the algorithm of etiologic laboratory diagnosis, and therapy optimization.

**Key words:** vector-borne natural foci of infection, a combination of natural foci.

Трансмиссивные клещевые природно-очаговые инфекции представляют несомненную актуальность для здравоохранения Российской Федерации, так как они занимают значительный удельный вес в инфекционной патологии населения и зачастую характеризуются выраженной тяжестью клинического течения, высокой частотой инвалидизации переболевших и летальностью.

Кроме того, следует учитывать, что трансмиссивные клещевые природно-очаговые инфекции, как свидетельствует современная ситуация, являются инфекциями с нарастающим эпидемиологическим значением, так как они не имеют устойчивой тенденции к снижению заболеваемости, наблюдается расширение нозоареалов

и увеличение круга выявленных патогенов и нозологических форм болезней. Серьезной современной проблемой трансмиссивных клещевых природно-очаговых инфекций является сочетанность природных очагов нескольких заболеваний и связанная с этим микст-патология у населения, что ставит новые дополнительные задачи при осуществлении эпидемиологического надзора, выработке алгоритма этиологической лабораторной диагностики заболеваний и оптимизации терапии. Наибольшее значение имеют сочетанные природные очаги клещевых инфекций: клещевого вирусного энцефалита (КВЭ), иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), клещевых риккетсиозов и др. По тяжести кли-

нического течения и прогностическим данным наибольшей значимостью среди болезней с природной очаговостью имеют КВЭ и ИКБ.

Цель работы: анализ эпидемиологической обстановки, сложившейся в Российской Федерации в отношении трансмиссивных клещевых инфекций за период с 1999 по 2011 гг.

### Материалы и методы

В основу работы положены результаты многолетних наблюдений (1999-2011 гг.) за динамикой эпидемического процесса и структурой заболеваемости трансмиссивными клещевыми природно-очаговыми инфекциями населения Российской Федерации и федеральных округов. Методами эпидемиологического анализа определено доленое значение отдельных географических регионов в распределении заболеваемости клещевыми инфекциями. Проанализированы результаты, полученные в Омском НИИ природно-очаговых инфекций, по зараженности иксодовых клещей патогенами и установлена сочетанность природных очагов инфекций, переносимых клещами.

### Результаты и обсуждение

Клещевой вирусный энцефалит продолжает оставаться одной из актуальных природно-очаговых инфекций в РФ. КЭ регистрируется на 48 из 92 административных территорий России. В 1999-2011 гг. ежегодное число случаев заболеваний составляло от 2817 до 9783, интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения ( $^0/_{0000}$ ) находился в пределах от 1,98 до 6,67 (рис. 1). В последний период в Сибирском Федеральном округе регистрировалось до 45% случаев заболеваний КВЭ от общей суммы в РФ, 21,1% – в Приволжском, 14,3% – в Северо-Западном, 14,1% – в Уральском, 3,8% – в Центральном и 1,5% – в Дальневосточном федеральном округах.

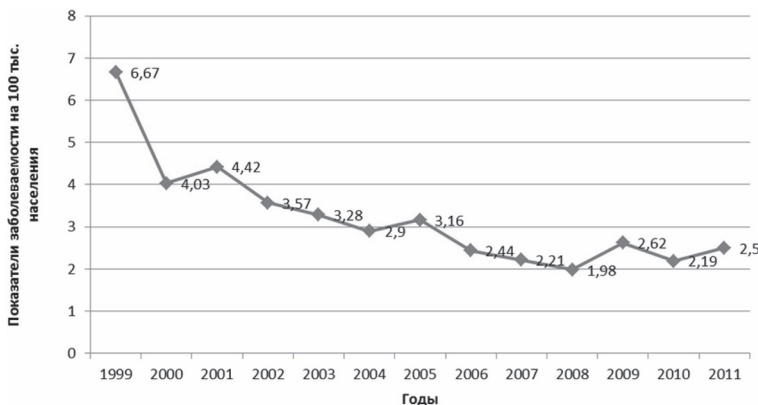


Рис. 1. Показатели заболеваемости клещевым энцефалитом на 100 тыс. населения в РФ в период с 1999 по 2011 гг.

В 2010 г. наиболее высокие показатели заболеваемости КВЭ зарегистрированы в Республике Алтай (21,43), Томской области (20,94), Красноярском крае (16,36) и Курганской области (15,37). До 66% заболеваний КВЭ в РФ приходилось на городское население.

В Омском НИИ природно-очаговых инфекций разрабатывались практически все аспекты проблем КВЭ, которые были отражены в нормативных и методических документах, патентах на изобретения и нашли широкое практическое применение в лабораторной диагностике, лечении, профилактике КВЭ, эпидемиологическом надзоре и молекулярной эпидемиологии вируса КЭ [1].

Иксодовые клещевые боррелиозы регистрируются

на 72 административных территориях РФ. Ежегодное число заболевших в 1999-2011 гг. составляло от 6381 до 9957 (от  $4,45^0/_{0000}$  до  $7,02^0/_{0000}$ ) (рис. 2). Работами сотрудников института впервые в Западной Сибири выявлены природные очаги и диагностированы случаи заболева-

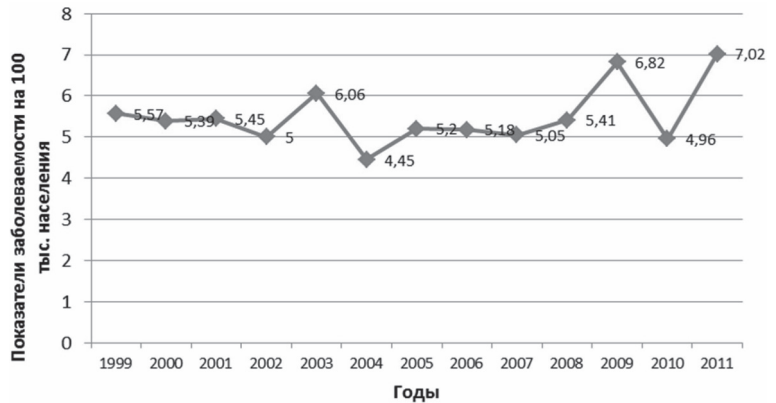


Рис. 2. Показатели заболеваемости иксодовыми клещевыми боррелиозами на 100 тыс. населения в РФ в период с 1999 по 2011 гг.

ния населения ИКБ. Установлено, что заболеваемость населения в Западной Сибири этиологически связана с двумя основными геновидами боррелий – *Borrelia garinii* и *B. afzelii*.

Клещевой риккетсиоз регистрируется на 17 территориях РФ. С 1999 по 2011 гг. диагностировалось от 1365 до 3554 случаев этой инфекции в год (от  $0,96^0/_{0000}$  до  $2,42^0/_{0000}$ ). На территориях Алтайского и Красноярского краев регистрируется до 80% случаев этой инфекции. В результате проведенных в ФГУН Омский НИИПИ исследований получены новые научные данные, свидетельствующие о широком распространении в Сибири и на Дальнем Востоке новых видов риккетсий, экологически связанных с иксодовыми клещами.

Высокой научной новизной отличаются результаты генотипирования риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки. Впервые установлено, что на территориях России и Казахстана с иксодовыми клещами экологически связаны не только широко известные *Rickettsia sibirica*, но и *R. conorii* subsp. *caspia*, *R. slovaca*, «*R. heilongjiangensis*», *R. aeschlimannii* и *R. helvetica*, отнесенные к «новым» патогенам человека, и риккетсии с неизученной патогенностью для человека – *R. raoultii*, «*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*» и риккетсия, близкая *R. tamurae* [2].

Установлена зараженность иксодовых клещей эрлихиями и анаплазмами [3]. На многих очаговых территориях России наибольшее распространение имеют сочетанные природные очаги КВЭ, ИКБ, гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) и моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) в ареале обитания клещей *I. persulcatus*.

Такая сочетанность очагов создает предпосылки для реализации полиэтиологического риска заражения клещевыми инфекциями и развития микст-патологии у населения, что требует применения особого алгоритма лабораторных исследований для дифференциальной диагностики. Двойные инфекции КЭ и ИКБ наблюдались в различных регионах России и за рубежом.

Подтверждена возможность микстинфицирования у людей в различных сочетаниях: ИКБ + ГАЧ + МЭЧ и др. В связи с проблемой микст-патологии создан алгоритм дифференциальной диагностики инфекций, передающихся иксодовыми клещами, позволяющий осуществлять раннюю верификацию заболевания и проводить адекватные лечебные и профилактические мероприятия [1].

Кроме того, на территории Западной Сибири впервые выявлены природные очаги трансмиссивных протозоозов (бабезиоз), а так же бартонеллез и их сочетанные очаги.

Приведенные материалы свидетельствуют о необходимости дальнейшей разработки проблемы клещевых природно-очаговых инфекций в Российской Федерации с целью обеспечения эпидемиологического благополучия населения по этой группе заболеваний.

Из числа клещевых инфекций в настоящее время специфическая вакцинопрофилактика разработана

только в отношении КВЭ.

Что касается объемов вакцино- и иммуноглобулинопрофилактики КВЭ, то они должны конкретизироваться на каждой административной территории с учетом степени риска заражения различных групп населения [4]. Вакцинопрофилактику целесообразно проводить в группах населения, систематически посещающих очаговые территории в период эпидсезона по профессиональным и бытовым причинам, а так же лицам, систематически выезжающим в период эпидсезона на территории, эндемичные по КВЭ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Рудаков Н.В., Ястребов В.К. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций: история и достижения (к 90-летию со дня основания) // Современные аспекты природной очаговости болезней: Материалы Всероссийской конференции с международным участием. – Омск, 2011. – С. 11-15.
2. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Выявление новых генотипов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки на юге Урала, в Сибири, на Дальнем

Востоке и в Казахстане // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2005. – №1. – С.23-27.

3. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в искодовых клещах в России и Казахстане // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2004. – №2. – С.10-14.

4. Ястребов В.К., Хазова Т.Г. Оптимизация системы эпидемиологического надзора и профилактики клещевого вирусного энцефалита // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2012. – №1. – С.19-24.

**Информация об авторах:** Ястребов Владимир Константинович – д.м.н., заместитель директора по научной работе, Омский НИИ природно-очаговых инфекций, 644080, г. Омск, Проспект Мира, 7, тел. (3812) 651281; Рудаков Николай Викторович – д.м.н., профессор, директор института, e-mail: rickettsia@mail.ru; Шпынов Станислав Николаевич – д.м.н., ученый секретарь, e-mail: stan63@inbox.ru.

© АНДАЕВ Е.И., БОРИСОВА Т.И., СИДОРОВА Е.А., АДЕЛЬШИН Р.В., НИКИТИН А.Я., БАЛАХОНОВ С.В. – 2012  
УДК: 616.995.42:575

### ИЗОЛЯЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ОТ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ С ОСТРОВА РУССКИЙ (ПРИМОРСКИЙ КРАЙ)

Евгений Иванович Андаев, Татьяна Ивановна Борисова, Елена Александровна Сидорова, Ренат Викторович Адельшин, Алексей Яковлевич Никитин, Сергей Владимирович Балахонov  
(Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, директор – д.м.н. проф. С.В. Балахонov, лаборатория природно-очаговых вирусных инфекций зав. – д.м.н. Е.И. Андаев)

**Резюме.** В работе представлены результаты исследования на зараженность вирусом клещевого энцефалита (КЭ) искодовых клещей, собранных с растительности при комплексном эпизоотолого-эпидемиологическом обследовании на природно-очаговые инфекции острова Русский, проведенного в связи с предстоящим саммитом АТЭС (2012 г.). Имаго клещей *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi* индивидуально исследованы методами ПЦР (455 экз.) и ИФА (259 экз.). Зараженность клещей составила соответственно 7,5% и 1,5%. В культуре клеток СПЭВ из 190 индивидуальных суспензий клещей изолировано 9 (4,7%) штаммов вируса клещевого энцефалита. Все штаммы изолированы от клещей, собранных в одном природном биотопе, окружающем бухту Рында. По результатам секвенирования гена E длиной 1330 п.н. выявлено, что они принадлежат к сибирскому генотипу.

**Ключевые слова:** клещевой энцефалит, вирус клещевого энцефалита, ген белка E, секвенирование.

### ISOLATION AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS FROM IXODES TICKS AT RUSSIAN ISLAND (PRIMORYE TERRITORY)

E.I. Andaev, T.I. Borisova, E.A. Sidorova, R.V. Adelshin, A.Ya. Nikitin, S.V. Balakhonov  
(Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor)

**Summary.** Ixodes ticks collected from plants were examined for tick-borne encephalitis virus infections during epizootological-epidemiological examination at the Russian island in connection with forthcoming APEC summit in 2012. The results of this investigation are presented in this work. Imago ticks of four species (*Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*) were individually examined by PCR (n = 455) and ELISA (n = 259). Infected ticks were 7,5% and 1,5%, respectively. Nine (4,7%) strains of tick-borne encephalitis virus were isolated from 190 individual tick suspensions in cell cultures. All of them were isolated from ticks collected in one natural biotope surrounding Rynda Bay. The strains belonged to the Siberian subtype have been defined by the results of gene E 1330 bp sequencing.

**Key words:** tick-borne encephalitis, tick-borne encephalitis virus, gene E, nucleotide sequence.

Заболееваемость клещевым энцефалитом (КЭ) встречается на обширной территории Российской Федерации от западных областей до дальневосточного региона, ежегодно регистрируется около или более трех тысяч случаев [10]. Дальневосточный регион имеет собственные эпидемиологические особенности КЭ, отличные от Сибири и европейской части России, обусловлен-

ные, прежде всего циркуляцией высокопатогенных для человека вариантов вируса [7,8]. Во второй половине XX века на Дальнем Востоке болезнь протекала тяжело, летальность достигала 30% [7]. В настоящее время здесь регистрируется 1,7% больных от общероссийского показателя. В последние годы наметилась тенденция увеличения удельного веса неочаговых форм на фоне



относительно низких показателей заболеваемости. Среднепогодный (2009–2011 гг.) интенсивный показатель заболеваемости составляет 0,8. Однако в сравнении с другими регионами сохраняется высокая летальность (10,7%) [10].

Эпидемиологическая ситуация по КЭ в г. Владивостоке считается благополучной (интенсивный показатель 0,82 при среднепогодном 1,95). В 2011 г. выявлено два случая заболевания КЭ в результате присасывания клещей, когда пострадавшие находились на о. Русский [9].

Для вируса КЭ характерен высокий уровень генетической гетерогенности [2]. Установлена преимущественная циркуляция вируса дальневосточного генотипа на Дальнем Востоке, европейского – в европейской части страны, тогда как на территории Урала, Сибири преобладает сибирский генотип [1,3,7]. По современным представлениям сибирский генотип неоднороден, а образует две клады: азиатскую и европейскую [4].

Г.Н. Леоновой с соавт. выявлено, что на Дальнем Востоке преобладающая часть популяции вируса при попадании в организм не вызывает манифестную инфекцию, другая, меньшая часть, вызывает острые формы заболевания с типичной картиной КЭ и летальными исходами [6,7,8].

Известно, что на о. Русский существуют самостоятельные природные очаги инфекционных болезней [12]. Несмотря на близость острова к г. Владивостоку, его территория остается недостаточно изученной в отношении КЭ. В связи с этим представляет интерес мониторинг острова с оценкой инфицированности иксодовых клещей вирусом КЭ, изоляция вируса и изучение его молекулярно-генетических свойств. В данной работе представлены результаты исследования на КЭ, проведенного в рамках Программы эпизоотолого-эпидемиологического обследования о. Русский (май 2011 г.) на комплекс природно-очаговых инфекционных болезней в связи с предстоящим саммитом АТЭС (2012 г.).

Цель работы: оценка инфицированности иксодовых клещей на острове Русский, изоляция вируса КЭ и изучение его молекулярно-генетических свойств.

### Материалы и методы

Имаго иксодовых клещей пяти видов: *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskiyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*, *Dermacentor silvarum* в количестве 497 экземпляров (102 особи *Ixodes persulcatus*, 34 – *I. pavlovskiyi*, 323 – *Haemaphysalis concinna*, 17 – *H. japonica*, 3 – *Dermacentor silvarum*) были собраны с растительности на флаг в природных биотопах, окружающих бухты Воеводиха, Рында и на п-ове Саперный, в мае 2011 г. сотрудниками Приморской противочумной станции (А.В. Алленов, В.Н. Краснощек, Е.А. Борисенко, Н.С. Гордейко, Т.В. Зверева, О.Г. Шалейко) и Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Координаты точек массовых сборов клещей определены по GPS-навигатору «Garmin»: N 43,00° E 131,79°; N 43,02° E 131,80°; N 42,98° E 131,91°.

Для обнаружения вируса КЭ в клещах применяли параллельно три метода. Антиген вируса КЭ в индивидуальных суспензиях клещей выявляли в ИФА на тест-системе ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область п. Кольцово в соответствии с инструкцией изготовителя. Результаты учитывали на спектрофотометре «Мультискан» (Ascent) при длине волны 450 нм. Детекцию РНК вируса КЭ проводили с помощью мультиплексной ПЦР тест-системы для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передаваемых клещами (АмплиСенс ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва), согласно инструкции.

Изоляцию вируса из индивидуальных суспензий клещей осуществляли на перевиваемой культуре клеток СПЭВ, выращенной во флаконах «Linbro». При первом заражении каждую суспензию клещей инокулировали в два флакона. После адсорбции в течение 60

мин во флаконы вносили среду поддержки Игла МЕМ с 2% сыворотки плода коров и помещали в термостат при 37°С. При появлении цитопатогенного эффекта (ЦПЭ) флаконы замораживали при минус 70°С. В случае отсутствия ЦПЭ проводили еще два слепых пассажа.

Изоляты вируса идентифицировали непрямой метод флюоресцирующих антител (НМФА). Инфицированный клеточный монослой снимали с помощью версен-трипсина и из суспензии клеток готовили слайд-антигены по общепринятой методике. После инкубации с иммунной сывороткой и антивидовым флюоресцирующим иммуноглобулином просматривали при помощи люминесцентного микроскопа «МТ 6300Н» (Meiji Techno). Яркое изумрудное свечение гранул в цитоплазме клеток оценивали как положительный результат.

Выделение РНК из вирусосодержащей культуральной жидкости осуществляли набором реагентов «Рибо-преп», обратную транскрипцию – набором «Реверта-L-100» производства АмплиСенс (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Амплификацию кДНК проводили набором реагентов АмплиСенс с праймерами, соответствующими гену E длиной 1491 п.н., любезно предоставленными Л.С. Карань. Расшифровку нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе «ABI Prism DNA Sequencer 3130» (Applied Biosystems, США) с набором реактивов «ABI Prism Big Dye Terminator Kit v.3.1.». Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы BioEdit v.7.0.9.0. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA v.5 методом Maximum Likelihood. Для сравнения использовали последовательности гена E вируса КЭ разных подтипов, взятые из GenBank. Для статистической обработки материалов использованы стандартные методы вариационной статистики [11].

### Результаты и обсуждение

Остров Русский расположен в заливе Петра Великого в Японском море, административно входит во Фрунзенский район г. Владивостока. Является крупнейшим островом в российской акватории Японского моря. Население – 5,2 тысячи человек. Берег острова изрезан бухтами, крупнейшая из которых Новик, делит его территорию на две части: юго-западную (более крупную) и северо-восточную, носящую название полуостров Саперный.

Обследованные биотопы по характеру растительных комплексов разделены на две группы. Первая – лугополевая зона включает территорию освоенных земель, находится в непосредственной близости к населенным пунктам. Для нее характерен обедненный травяно-кустарниковый состав растительности. Вторая группа представлена вторичными широколиственными лесами (основной вид – дуб монгольский с примесью берез маньчжурской и даурской).

Иксодовые клещи в сборах с растительности представлены: *I. persulcatus* – 21,2%, *I. pavlovskiyi* – 7,1%, *H. concinna* – 67,4%, *H. japonica* – 3,5%, *D. silvarum* – 0,6%.

Результаты определения вирусифорности клещей различными методами представлены в таблице 1. Для выявления вируса КЭ индивидуально исследованы клещи четырех видов методами ПЦР (455 экз.) и ИФА (259 экз.). Методом биопробы в культуре клеток изучены клещи двух видов – *I. persulcatus* (72 экз.) и *H. concinna* – 118 экз. Инфицированность отдельных особей по данным ПЦР значительно выше, чем в ИФА и биопробе и составила 7,5% от общего количества исследованных клещей. С наибольшей частотой (21,2%) РНК вируса КЭ обнаружена в клещах *I. persulcatus* и *I. pavlovskiyi* (11,5%), с наименьшей у *H. concinna* – 2,8% (при большем числе исследованных особей – n=318).

В ИФА антиген обнаружен только в 4 (4,08%) особях

Таблица 1

Результаты изучения вирусофорности клещей разными методами

Вид клещей	Методы изучения вирусофорности клещей		
	ПЦР	ИФА	биопроба в культуре клеток
	всего исследовано/ из них положительные (%) /доверительный интервал*	всего исследовано/ из них положительные (%) /доверительный интервал*	всего исследовано/ из них положительные (%) /доверительный интервал*
<i>I. persulcatus</i>	99/21/ 21,2 13,2 ÷ 29,2	98/4/4,1 / 04 ÷ 7,8	72/1/1,4 / 0 ÷ 4,1
<i>I. pavlovskyi</i>	26/3/11,5 0 ÷ 24,3	27/0/ -	н.и.
<i>H. concinna</i>	318/9/2,8 1,0 ÷ 4,6	121/0/ -	118/9/7,6 0 ÷ 22,7
<i>H. japonica</i>	12/1/8,3 0 ÷ 25,5	13/0/ -	н.и.
Всего	455/34/ 5,1 ÷ 9,9	259/4/1,5 / 0,1 ÷ 2,9	190/9/4,7/ 1,8 ÷ 7,6

Примечание: н.и. – не исследовали; \* – возможные границы изменения доли зараженных особей при доверительной вероятности 0,95.

*I. persulcatus*. Средний уровень суммарной инфицированности всех видов клещей по результатам ИФА составил 1,54% и соответствует данным, полученным при изучении клещей, снятых с людей: в Приморском крае – учреждениями Роспотребнадзора (по среднемноголетним наблюдениям 2,4-4,5%), на о. Русский – исследователями НИИЭМ СО РАМН г. Владивосток (от 0 до 4,1% в 2007-2011 гг.) и специалистами Роспотребнадзора в 2011 г (4,5%) [9,12].

Из 190 образцов суспензий клещей разных видов из различных биотопов в культуре клеток изолировано 9 штаммов вируса КЭ – один от *I. persulcatus* и 8 – от *H. concinna*. Репродукция вируса в клетках сопровождалась ЦПЭ, появляющимся на третьи сутки на втором-третьем пассажах. В НМФА на слайд-антигенах выявлено характерное для вируса КЭ ярко-изумрудное свечение гранул в цитоплазме инфицированных клеток в лунках с рабочими разведениями иммунной сыворотки 1:64-1:128. Титр вируса на 6-7 сутки после заражения культуры клеток составил от 10<sup>4.5</sup> до 10<sup>6.0</sup> ТЦПД<sub>50/мл</sub>.

Анализ территориальной приуроченности мест сбора клещей показал, что все штаммы изолированы от клещей, собранных в одном биотопе в окружающей бухту Рында лугополевой зоне в непосредственной близости к населенному пункту, площадь территории сбора клещей составила около 1500 м<sup>2</sup>. Изоляция вируса КЭ преимущественно из клещей *H. concinna* может быть объяснена их преобладанием в сборах на этом участке.

Для изучения структуры популяции вируса КЭ на острове Русский проведено молекулярно-генетическое исследование всех выделенных штаммов вируса КЭ. По результатам анализа нуклеотидных последовательностей фрагмен-

та гена белка E длиной 1330 п.н. изученные штаммы отнесены к сибирскому генотипу вируса КЭ (рис. 1). Филогенетический анализ полученных последовательностей показал, что все штаммы внутри сибирского генотипа группируются с прототипным штаммом Vasilchenko (AF069066) – гомология 99,5-99,7%. Кроме того, штаммы расположились в единой кладистической группе со штаммом Aina

(JN003206) с бутстреп-поддержкой 100%. У штаммов RusIsl-370 и RusIsl-331 обнаружена синонимичная замена в позиции 206 гена E (CTG→TTG), оба триплета

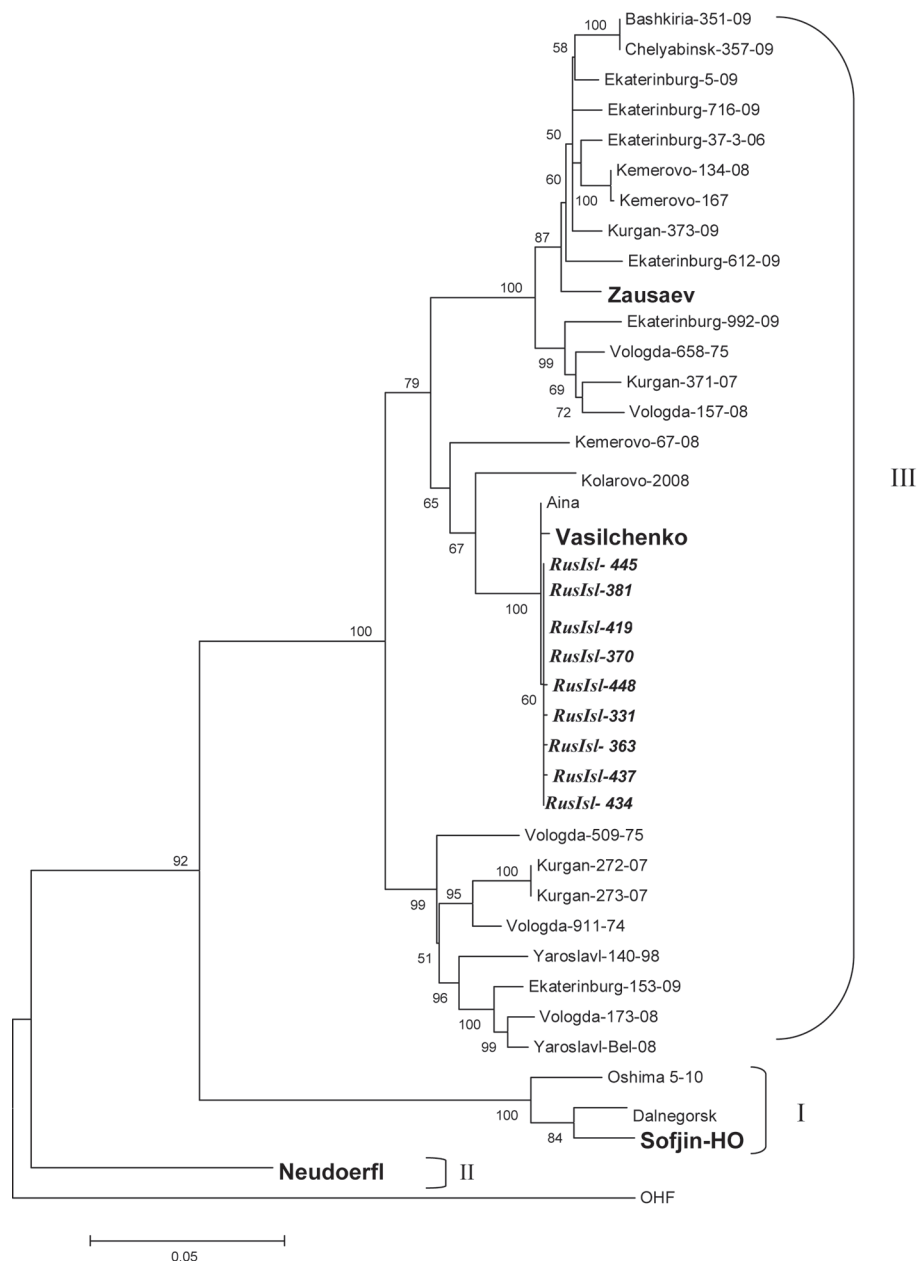


Рис. 1. Филогенетическое древо вируса клещевого энцефалита. Построено на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена белка E (1330 п.н.) с помощью метода Maximum Likelihood. Изученные штаммы выделены полужирным курсивом.

кодируют аминокислоту лейцин. Замена полярной аминокислоты аспарагин на неполярный изолейцин в позиции 381 отмечена у штамма RusIs-363 и не встречается у других, взятых в анализ штаммов вируса КЭ. Все девять штаммов имеют замену (Arg→His) в позиции 216, что отличает их от прототипного штамма Vasilchenko, но не от Aina.

В результате проведенных исследований все изолированные нами от клещей штаммы с о. Русский отнесены к сибирскому генотипу (прототипный штамм Vasilchenko) с высоким уровнем гомологии со штаммом Aina, достигающим у некоторых из них 100%. Штаммы Aina и Vasilchenko имеют близкое эволюционное проис-

хождение, несмотря на временные и территориальные различия их выделения [5].

Таким образом, от клещей, собранных в природном биотопе, окружающем бухту Рында, изолированы штаммы вируса КЭ сибирского генотипа. Впервые получены данные о генетической структуре природной популяции вируса на территории о. Русский. В связи с преобладанием в Приморье дальневосточного подтипа, вызывающего тяжелые формы болезни, представляет интерес дальнейшее изучение биологических свойств изолятов сибирского генотипа, что позволит оценить их эпидемиологическую значимость.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М. и др. Генотипирование вируса клещевого энцефалита в природных и антропогенных очагах Евразии по результатам мультилокусной гибридизации // Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе / Под ред. В.В. Власов, В.Е. Репин; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т хим. биол. и фунд. медицины. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. – 395 с.
2. Злобин В.И., Беликов С.И., Джиоев Ю.П. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 272 с.
3. Злобин В.И., Верхозина М.М., Демина Т.В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. – 2007. – № 6. – С.4-13.
4. Карань Л.С., Шопенская Т.А., Платонов А.Е. и др. Молекулярные методы в алгоритме мониторинга очагов клещевых трансмиссивных инфекций // Генодиагностика инфекц. болезней – 2007: Сб. трудов VI Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием – М., 2007. – Т.2. – С.316-317.
5. Кулакова Н.В., Беликов С.И., Андаев Е.И. и др. Полногеномный анализ штамма Айна – прототипного варианта сибирского субтипа вируса клещевого энцефалита // Современные аспекты природной очаговости болезней: матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 90-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (1-2 ноября 2011., Омск) // Национальные приоритеты России. – Омск, 2011. – № 2(5). Спецвыпуск. – С.145.
6. Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Борисевич В.Б. и др. Антигемия у людей, инфицированных вирусом клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 1996. – №6. – С.260-263.
7. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае. Вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты. – Владивосток: Дальнаука, 1997. – 190 с.
8. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Павленко Е.В. и др. Биологическая и молекулярно-генетическая характеристика дальневосточной популяции вируса клещевого энцефалита и ее патогенное значение // Вопросы вирусологии. – 2007. – №6. – С.13-17.
9. Маслов Д.В., Полякова М.В., Духова А.Ю. Об организации государственного надзора за объектами саммита АТЭС за 9 месяцев 2011 г. // Матер. расшир. засед. Коллегии при Управл. Роспотребнадзора по Приморскому краю. – Владивосток, 2011. – С.3-27.
10. Носков А.К., Никитин А.Я., Пакскина Н.Д. и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации (2009-2011 гг.) и прогноз на 2012 г. // Пробл. особо опасных инф. – 2012. – Вып. 111 (1). – С.30-34.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйшая школа, 1967. – 328 с.
12. Сомова Л.М. Задачи НИИЭМ СО РАМН по обеспечению эпидемиологического благополучия в период проведения саммита АТЭС в 2012 году // Матер. расшир. засед. Коллегии при Управл. Роспотребнадзора по Приморскому краю. – Владивосток, 2011. – С.61-73.

**Информация об авторах:** Андаев Евгений Иванович – заместитель директора по общим вопросам и организационно-методической работе, заведующий лабораторией, 664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78, тел. (3952) 220134, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru; Борисова Татьяна Ивановна – к.б.н., с.н.с., Сидорова Елена Александровна – м.н.с.; Адельшин Ренат Викторович – к.б.н., ст.н.с., тел. (3952) 220139; Никитин Алексей Яковлевич – д.б.н., вед.н.с., Балахонов Сергей Владимирович – д.м.н., профессор, директор, тел. (3952) 220137.

# НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

© ПАВЛОВА Л.С., ЗЫКОВА Т.А. – 2012  
УДК 616.43; 616-008.9; 616.39

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА У ПАЦИЕНТОВ С АКРОМЕГАЛИЕЙ ДО И ПОСЛЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

*Людмила Сергеевна Павлова, Татьяна Алексеевна Зыкова*

(Северный государственный медицинский университет, Архангельск, ректор – д.м.н., проф., акад. РАМН П.И. Сидоров, кафедра факультетской терапии с курсом эндокринологии, зав. – д.м.н., проф. О.А. Миролюбова)

**Резюме.** Рассматриваются патогенетические факторы нарушений метаболизма у пациентов с акромегалией до и после лечения. Обсуждаются вопросы инсулинорезистентности, дислипидемии, изменения в уровне адипокинов, маркеров воспаления и костного метаболизма. Также рассматривается вопрос недостаточности соматотропного гормона, возникшей в результате лечения акромегалии, и факторов риска, ассоциированных с ней.

**Ключевые слова:** акромегалия, инсулинорезистентность, дислипидемия, адипокины.

## THE FEATURES OF METABOLISM IN PATIENTS WITH ACROMEGALY BEFORE AND AFTER PATHOGENETIC THERAPY

*L.S. Pavlova, T.A. Zyкова*

(Northen State Medical University, Arkhangelsk)

**Summary.** The pathogenetic factors of metabolic disorders in patients with acromegaly before and after therapy are considered. The problems of insulin resistance, dyslipidemia, changers in adipokines, markers of inflammation and bone metabolism are discussed. The growth hormone deficiency, as a result of treatment of acromegaly, and risk factors, associated with it, are also discussed.

**Key words:** acromegaly, insulin resistance, dyslipidemia, adipokines.

Акромегалия ассоциирована с целым спектром значимых нарушений метаболизма, обуславливающих повышенную заболеваемость и смертность пациентов [11,15]. Влияние метаболических дисфункций в когорте больных акромегалией тем больше, чем выше степень активности заболевания, однако многие больные в процессе лечения не достигают критериев, соответствующих «полной ремиссии», несмотря на использование современных методик. В лучших центрах полная ремиссия достигается в 80-90% при наличии у пациента микроаденомы и составляет около 50% при макроаденомах, еще более снижаясь в случаях инвазии опухоли [41]. Эти данные позволяют рассматривать проблему метаболических нарушений у пациентов с акромегалией как актуальную и определяют необходимость изучения ассоциированных с ними факторов риска преждевременной смерти как до применения патогенетической терапии, так и после нее, поскольку почти у половины пациентов невозможно достижение полной ремиссии заболевания.

1. *Активная акромегалия и инсулинорезистентность.* Для активной стадии акромегалии особенно характерны различные нарушения метаболизма глюкозы, и наиболее часто у данных пациентов выявляют нарушение толерантности к глюкозе и сахарный диабет [14,39]. Известно, что этим пациентам свойственна инсулинорезистентность, сопровождающаяся гиперинсулинемией [20], более высокие показатели индекса инсулинорезистентности HOMA-IR и отношения триглицеридов к липопротеинам высокой плотности [62,60]. В нескольких исследованиях была показана прямая взаимосвязь между уровнем соматотропного гормона и степенью нарушения толерантности к глюкозе, а также с выраженностью инсулинорезистентности как печеночной, так и периферической [35]. Все эти данные подтверждают возможность формирования у пациентов с акромегалией комплекса метаболических отклонений, относящихся к факторам риска атеросклероза. Имеются данные о том, что достижение компенсации активной акромегалии в результате оперативного лечения или терапии аналогами соматостатина сопровождается снижением

соматотропного гормона (СТГ) и инсулиноподобного фактора роста 1 типа и способствует снижению инсулинорезистентности, оцениваемой с помощью индекса HOMA-IR [42]. Патогенез СТГ-индуцированной инсулинорезистентности недостаточно изучен. Получены данные, что гормон роста ингибирует фосфорилирование рецептора инсулина и одну из главных сигнальных молекул пострецепторного пути инсулина – IRS-1, что сопровождается снижением периферической инсулинорезистентности. Кроме того, было показано, что избыток соматотропного гормона стимулирует глюконеогенез и липолиз, что приводит к повышению уровня свободных жирных кислот в крови, которые, в свою очередь, подавляют инсулин-стимулированное окисление глюкозы и усугубляют инсулинорезистентность [13]. Интересно, что инсулиноподобный фактор роста 1 типа, наоборот, улучшает чувствительность к инсулину и тем самым «противостоит» неблагоприятным эффектам соматотропного гормона на чувствительность к глюкозе [13,49]. В патогенезе нарушений метаболизма глюкозы значимая роль принадлежит дисфункции  $\beta$ -клеток. В клинических исследованиях дисфункция  $\beta$ -клеток чаще всего оценивается по индексу HOMA-B, который позволяет оценить секрецию инсулина в состоянии натощак. При плохой компенсации акромегалии и повышенных уровнях соматотропного гормона и инсулиноподобного фактора роста 1 типа резервные возможности  $\beta$ -клеток истощаются, что клинически проявляется нарушенной толерантностью к глюкозе или сахарным диабетом [14,39].

2. *Акромегалия и липидный профиль.* Много исследований было посвящено изучению липидного профиля у пациентов с акромегалией. Уровни триглицеридов и общего холестерина у пациентов с акромегалией в большинстве исследований были повышены [7,20,28,35,62], а содержание липопротеинов высокой плотности либо понижено [52], либо не изменено [7,19]. Также, имеются данные, что у пациентов с акромегалией часто определяются повышение уровня липопротеинов низкой и очень низкой плотности [35,62] и аполипопротеина В [7]. По данным выполненных исследований, уровень триглицеридов у пациентов с акромегалией снижается

при терапии аналогами соматостатина с достижением хорошего контроля заболевания [17]. Вышеописанные нарушения липидного профиля при акромегалии во многом обусловлены инсулинорезистентностью, но, вместе с тем, гормон роста имеет и прямое влияние на метаболизм липидов. Соматотропный гормон ингибирует липопротеин-липазу жировой ткани и стимулирует гормон-чувствительную липазу, причем последняя отвечает за высвобождение свободных жирных кислот из жировой ткани, которые в последующем используются печенью для синтеза триглицеридов [21,43,44].

3. *Факторы воспаления и акромегалия.* В исследовании М. Kałuzny и соавт. (2010) были оценены показатели фибриногена, как одного из провоспалительных факторов. Оказалось, что как в группе активной акромегалии, так и в группе с достигнутой ремиссией заболевания, показатели фибриногена были выше относительно группы контроля без акромегалии. Таким образом, отсутствовала существенная разница по концентрации фибриногена между группой активной акромегалии и группой с достигнутой ремиссией заболевания, что свидетельствует о сохраняющемся риске сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний в когорте пациентов с акромегалией. Авторы данной работы обнаружили корреляцию между минимальным уровнем соматотропного гормона (СТГ) в процессе выполнения орального глюкозотолерантного теста и уровнем фибриногена в группе активной акромегалии, что может свидетельствовать о возможном влиянии повышенного уровня СТГ на концентрацию фибриногена. Более высокий уровень фибриногена у пациентов с активной акромегалией в сравнении с контрольной группой подтверждается и результатами других исследований [20,62]. Вместе с тем, в некоторых из них было получено значимое снижение содержания фибриногена у пациентов после достижения хорошего контроля акромегалии [62]. Уровень С-реактивного белка у пациентов с активной акромегалией был более низким в сравнении с группой акромегалии, в которой достигнута компенсация заболевания [20,35,62]. Лишь в одном исследовании такой разницы получено не было [28]. Также было показано, что пациенты с акромегалией имеют более низкие значения С-реактивного белка (СРБ) по сравнению с контрольной группой здоровых, которые повышаются после терапии пегвисомантом [52]. При терапии аналогами соматостатина уровень СРБ также значимо повышается в сравнении со значением до терапии [20]. Необходимо отметить, что по результатам многих исследований уровень СРБ отрицательно коррелировал с уровнем соматотропного гормона [8,26,37]. С-реактивный белок продуцируется в печени активированными моноцитами при воздействии цитокинов. Соматотропный гормон действует через рецепторы, принадлежащие к надсемейству цитокиновых рецепторов, и активация его рецептора вызывает молекулярный сигнал, аналогичный цитокиновому. Высокие концентрации гормона роста могут конкурировать с провоспалительными цитокинами и, таким образом, могут снижать уровень С-реактивного белка [6,35]. Можно предположить, что через этот механизм соматотропный гормон защищает эндотелий и сосуды. Существует и другая гипотеза взаимосвязи уровня С-реактивного белка и соматотропного гормона: гормон роста обладает липолитической активностью. Жировая ткань же является источником продукции интерлейкина-6, который стимулирует синтез С-реактивного белка [36]. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что в исследовании М. Kałuzny и соавт. (2010) уровень С-реактивного белка у пациентов с акромегалией отрицательно коррелировал с индексом массы тела. Так или иначе, можно допустить, что низкие уровни С-реактивного белка при активной акромегалии в своем роде препятствуют другим параметрам сердечно-сосудистого риска, таким как дислипидемия, артериальная гипертензия, сахарный диабет и др. Данное предположение может быть поводом для размышления при оценке того факта, что пациенты с акромегалией имеют меньшую толщину интима-медиа, чем та, которую пред-

полагало наличие их факторов риска [45].

4. *Жировая ткань и акромегалия.* У пациентов с активной акромегалией снижено содержание жировой ткани и повышено содержание тощей массы вследствие липолитического и анаболического эффектов соматотропного гормона (СТГ) [24,25,34,56,60], причем в исследовании P.U. Freda и соавт. (2008) были получены интересные данные: при акромегалии снижено содержание висцеральной и подкожной жировой ткани, но повышено содержание межмышечной жировой ткани. Последнее, вероятно, может быть ассоциировано с СТГ-индуцированной инсулинорезистентностью. До конца не ясно, каким образом повышение содержания межмышечной жировой ткани снижает чувствительность к инсулину, но существуют гипотезы, что причиной может служить нарушение кровотока в мышцах, снижение диффузионной способности инсулина или повышение локальной концентрации свободных жирных кислот [24]. Жировая ткань секретирует множество цитокинов, которые могут вызвать дисфункцию адипоцитов и способствовать инсулинорезистентности (в частности, измененная активность в системе интерлейкина-1 и интерлейкина-6 и др.), а также дисфункции  $\beta$ -клеток [22,58,66]. Например, интерлейкин-1 $\beta$  вызывает нарушение функции  $\beta$ -клеток и их апоптоз, а антагонист рецептора интерлейкина-1 защищает клетки от действия последнего, и его содержание снижено при сахарном диабете 2 типа [40,51]. В исследовании T. Ueland и соавт. (2010) было показано, что у пациентов с активной акромегалией в сравнении с группой контроля было низкое содержание антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и повышено содержание интерлейкина-1 $\beta$ , при этом сниженный показатель IL-1Ra положительно коррелировал со сниженным общим содержанием жировой ткани. Одновременно в макрофагах инсулиноподобный фактор роста 1 типа (ИФР-1) и соматотропный гормон (СТГ) значительно снижали высвобождение антагониста рецептора интерлейкина-1 и повышали высвобождение интерлейкина-1 $\beta$ . Таким образом, повышение уровня ИФР-1/СТГ может вести к нарушению функции  $\beta$ -клеток через влияние на жировую ткань и цитокин интерлейкин-1 $\beta$ .

Логично предположить, что изменения в составе жировой ткани ведут и к изменению в обмене таких гормонов как лептин, грелин и адипонектин. Получены данные о том, что избыток гормона роста ассоциирован со сниженным уровнем лептина [18,31,54,60]. Нормализация соматотропного гормона и инсулиноподобного фактора роста 1 типа может способствовать увеличению уровня циркулирующего лептина, независимо от изменений индекса массы тела [18], в то же время гормон роста может напрямую взаимодействовать с жировой тканью и снижать экспрессию гена лептина в жировой ткани [32], что и дает возможность предположить наличие как прямого, так и непрямого эффектов. T. Ueland и соавт. (2010) выявили отрицательную корреляционную связь между содержанием лептина и уровнем гормона роста. В другом исследовании уровень лептина у пациентов с акромегалией коррелировал с индексом массы тела как до, так и после нормализации соматотропного гормона и инсулиноподобного фактора роста 1 типа [46], причем после нормализации уровень лептина повышался [18,46]. В здоровой популяции уровень лептина выше у женщин. При акромегалии уровень лептина также оказался более высоким у женщин, чем у мужчин, как при активной, так и при контролируемой формах заболевания [46]. В популяции здоровых инсулин стимулирует выработку лептина [1]. Положительная корреляция между лептином и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR, наблюдаемая в группе контроля, не выявляется в группе акромегалии [54]. Лептин снижен у пациентов с акромегалией, несмотря на имеющуюся гиперинсулинемию. Таким образом, инсулин, по-видимому, не является главным регулятором уровня лептина при акромегалии. Назначение же лептина способно умень-

шить инсулинорезистентность и дислипидемию. При липоатрофическом диабете так же, как и при акромегалии, наблюдаются низкие уровни лептина ввиду отсутствия жировой ткани при наличии инсулинорезистентности вследствие нарушения процессов депонирования жира в адипоцитах и жировой дистрофии печени [5]. Низкий уровень лептина при акромегалии, по аналогии с липоатрофическим диабетом, может играть роль в развитии инсулинорезистентности.

Грелин способствует высвобождению гормона роста из передней доли гипофиза, так как является лигандом для рецептора стимулятора (GHS-R) его секреции. Ацилированная (активная) форма грелина активирует экспрессию клеток GHS-R [19]. Помимо гормона роста на продукцию грелина влияют многие факторы, в том числе и уровень инсулина: инсулин действует как ингибитор грелина [50]. Подавление грелина плазмы происходит независимо от профиля соматотропного гормона: уровень грелина снижается как у пациентов с активной акромегалией [23], так и у здоровых людей [10,23]. Вследствие отрицательной обратной связи между соматотропным гормоном и инсулиноподобным фактором роста 1 типа с одной стороны, и грелином с другой, пациенты с активной стадией акромегалии имеют более низкие значения последнего в сравнении с контрольной группой здоровых [12]. Уровень инсулина и индекс инсулинорезистентности HOMA-IR отрицательно коррелируют с уровнем грелина у пациентов с акромегалией до терапии [42]. Уровень грелина у пациентов с активной стадией акромегалии значительно возрастает после оперативного лечения, но при этом концентрации как общего, так и активного грелина не достигают показателей здоровых лиц в течение раннего послеоперационного периода при нормализации соматотропного гормона непосредственно после операции, что, вероятно, может быть связано с замедленным восстановлением функции клеток и замедленной нормализацией инсулиноподобного фактора роста 1 типа [42,57]. При терапии же аналогами соматостатина уровень грелина снижается на фоне терапии (в среднем на 47%) без взаимосвязи с уровнем подавления соматотропного гормона (СТГ) и инсулиноподобного фактора роста 1 типа (ИФР-1), что может говорить о многофакторном влиянии на концентрацию грелина у пациентов с акромегалией, а не только повышенного содержания СТГ/ИФР-1. Как до лечения, так и после хирургического вмешательства и терапии аналогами соматостатина, уровень грелина остается подавленным в ходе орального глюкозотолерантного теста [42].

Особенно много разночтений в данных литературы о содержании и реакции адипонектина на разные факторы. Адипонектин синтезируется в печени и мышцах, причем экспрессия их рецепторов и содержание адипонектина снижается под воздействием инсулина [59]. Научные работы, целью которых было изучение адипонектина у пациентов с акромегалией, имели противоречивые результаты. Ранее упоминалось, что пациенты с акромегалией имеют более низкий процент содержания жировой ткани по сравнению со здоровыми лицами с тем же весом. Так как адипонектин имеет отрицательную корреляцию с содержанием жировой ткани, то теоретически пациенты с акромегалией должны иметь более высокие уровни адипонектина относительно контрольной группы, подобранной по индексу массы тела. В то же время инсулинорезистентность и гиперинсулинемия, свойственные пациентам с акромегалией, должны наоборот, снижать концентрацию адипонектина. В исследовании J.V. Silva и соавт. (2003) были получены результаты, свидетельствующие о повышении содержания адипонектина, несмотря на тенденцию к повышению инсулинорезистентности в группе акромегалии в сравнении с группой контроля здоровых, подобранной по возрасту, полу и индексу массы тела. В контрольной группе адипонектин имел слабую корреляцию с белком, связывающим инсулиноподобный фактор роста 1 типа. Так как последний регулируется инсулином, результат предполагает, что в

норме адипонектин имеет связь с чувствительностью к инсулину. Данная корреляция не была получена в группе акромегалии. В другом исследовании также были получены данные о повышении содержания адипонектина у пациентов с акромегалией в сравнении с контрольной группой [53]. В то же время другие авторы, наоборот, выявили снижение его содержания [56], а удаление опухоли при активной акромегалии привело к повышению сывороточной концентрации адипонектина [64]. В исследовании же T. Ueland и соавт. (2010) вообще не было выявлено различия в содержании адипонектина между группой акромегалии и контрольной.

5. *Энергетический гомеостаз и костный метаболизм у больных акромегалией.* Интерес исследователей в последнее время привлекают механизмы взаимодействия энергетического и костного метаболизма. В ряде исследований было показано, что дефицит остеокальцина ассоциирован со сниженной секрецией инсулина, инсулинорезистентностью, гипергликемией и ожирением, предполагая взаимосвязь между костным метаболизмом и метаболизмом глюкозы [38,48]. Более того, терапия остеокальцином стимулировала экспрессию инсулина в  $\beta$ -клетках *in vitro* и улучшила толерантность к глюкозе *in vivo*. Известно, что костный обмен повышен при акромегалии, а биохимические маркеры костеобразования и резорбции костной ткани коррелируют с уровнями циркулирующих соматотропного гормона и инсулиноподобного фактора роста 1 типа, предполагая их прямой эффект на остеоласты и остеокласты [9,61,65]. T. Ueland и соавт. (2006) выявили снижение минеральной плотности костной ткани у женщин с активной акромегалией в сравнении с группой контроля (но не у мужчин) независимо от степени активности заболевания и уровня половых гормонов. M. Wolanowski и соавт. (2006) выявили, что анаболический эффект гормона роста на костную ткань распространяется только на проксимальную часть бедра у мужчин. В исследовании же N. Suncunza и соавт. (2009) результаты свидетельствовали о повышении содержания только остеокальцина в сравнении с контрольной группой, а содержание С-концевого телопептида было снижено, причем пациенты с активной формой акромегалии имели более высокую минеральную плотность костной ткани в сравнении с пациентами с ремиссией заболевания [56]. В исследовании T. Ueland и соавт. (2010) у пациентов с активной акромегалией в сравнении с контрольной группой здоровых, подобранной по полу, возрасту и индексу массы тела, было значительно повышено содержание остеокальцина, причем его уровень коррелировал с активностью заболевания (оцениваемой по уровню инсулиноподобного фактора роста 1 типа), а также отрицательно коррелировал с уровнем антагониста рецептора интерлейкина-1. По результатам множественной регрессии только остеокальцин был определен как положительный предиктор инсулинорезистентности и функции  $\beta$ -клеток у пациентов с активной акромегалией. Также добавление соматотропного гормона и инсулиноподобного фактора роста 1 типа к остеокальцину *in vitro* в данном исследовании приводило к подавлению секреции инсулина, тогда как один остеокальцин стимулировал секрецию этого гормона. Таким образом, положительная корреляция инсулинорезистентности и остеокальцина отражает, вероятно, повышение функции бета клеток в ответ на инсулинорезистентность при акромегалии. Подтверждением данной теории являются результаты исследования, доказывающие, что гормон роста стимулирует пролиферацию  $\beta$ -клеток и продукцию инсулина [30].

6. *Соматотропная недостаточность – как положительный результат лечения или ухудшение отдаленного прогноза у больных акромегалией?*

В процессе течения акромегалии у пациентов возникают клинические ситуации, обусловленные не только избытком соматотропного гормона (СТГ), но и его недостатком – дефицит СТГ, как правило, возникает на

фоне лечения.

Как избыток, так и недостаток гормона роста оказывают негативный эффект на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы [2,16,27]. Данная проблема – не редкая ситуация в клинической практике. В исследовании S. Pekic и соавт. (2006) доля пациентов с недостаточностью соматотропного гормона составила 43% среди подвергнутых радикальной терапии (оперативное лечение или оперативное лечение и лучевая терапия) [47]. Логично предположить, что в группах с достигнутым в результате лечения хорошим контролем акромегалии могут быть выявлены пациенты с соматотропной недостаточностью. Во многих исследованиях были предоставлены доказательства того, что снижение смертности при акромегалии в процессе терапии наблюдалось при снижении среднего уровня соматотропного гормона менее 2,5 мкг/л [3,4,29]. Одновременно при значениях гормона роста ниже целевого уровня наблюдалось увеличение смертности. Более того, существуют исследования, доказывающие, что низкий уровень инсулиноподобного фактора роста 1 типа в общей популяции ассоциирован с повышенным риском ишемической болезни сердца, застойной сердечной недостаточностью и увеличением толщины интима-медиа, что отражает инициацию про-

цессов субклинического атеросклероза [33,55].

На сегодняшний день отсутствуют данные, доказывающие, что заместительная терапия недостаточности соматотропного гормона вообще и при акромегалии в частности способствует снижению смертности. В исследовании T. Wexler и соавт. (2009) были получены данные о снижении качества жизни у вылеченных пациентов в случаях исхода терапии в виде недостаточности соматотропного гормона, относительно группы больных, в которой уровень гормона роста соответствовал нормальным значениям.

Таким образом, пациенты с акромегалией нуждаются в тщательном пожизненном наблюдении с оценкой и возможной коррекцией имеющихся у них нарушений метаболизма, так как не все из них достигают критериев ремиссии, и, в то же самое время, многие метаболические нарушения сохраняются и при неактивной стадии заболевания. Также значимым для пациентов является оценка наличия недостаточности соматотропного гормона даже в случаях успешного применения радикальных методов лечения акромегалии в силу того, что недостаточность соматотропного гормона, как и его избыток, ассоциирована с повышенной смертностью и снижением качества жизни.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Aas A.M., Hanssen K.F., Berg J.P., et al. Insulin-stimulated increase in serum leptin levels precedes and correlates with weight gain during insulin therapy in type 2 diabetes // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2009. – №94(8). – P.2900-2906.
2. Abs R., Feldt-Rasmussen U., Mattsson A.F., et al. Determinants of cardiovascular risk in 2589 hypopituitary GH-deficient adults – a KIMS database analysis // *Eur J Endocrinol.* – 2006. – №155(1). – P.79-90.
3. Arita K., Kurisu K., Tominaga A., Eguchi K., et al. Mortality in 154 surgically treated patients with acromegaly – a 10-year follow-up survey // *Endocr J.* – 2000. – №50(2). – P.163-172.
4. Ayuk J., Clayton R.N., Holder G., et al. Growth hormone and pituitary radiotherapy, but not serum insulin-like growth factor-I concentrations, predict excess mortality in patients with acromegaly // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2004. – №89(4). – P.1613-1617.
5. Beltrand J., Lahlou N., Le Charpentier T., et al. Resistance to leptin-replacement therapy in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy: an immunological origin // *Eur J Endocrinol.* – 2010. – Vol. 162. №6. – P.1083-1091.
6. Bergad P.L., Schwarzenberg S.J., Humbert J.T., et al. Inhibition of growth hormone action in models of inflammation // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2000. – № 279(6). – P.1906-1917.
7. Boero L., Cuniberti L., Magnani N., et al. Increased oxidized low density lipoprotein associated with high ceruloplasmin activity in patients with active acromegaly // *Clinical Endocrinology.* – 2010. – №72. – P.654-660.
8. Boero L., Manavella M., Go´mez Rosso L., et al. Alterations in biomarkers of cardiovascular disease in active acromegaly // *Clinical Endocrinology.* – 2009. – Vol. 70. – P.88-95.
9. Bolanowski M., Daroszewski J., Medraś M., Zadrozna-Sliwka B. Bone mineral density and turnover in patients with acromegaly in relation to sex, disease activity, and gonadal function // *J Bone Miner Metab.* – 2006. – №24(1). – P.72-78.
10. Broglio F., Koetsveld P.P., Benso A., et al. Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – №87(10). – P.4829-4832.
11. Cannavo S., Almoto B., Cavalli G., et al. Acromegaly and coronary disease: an integrated evaluation of conventional coronary risk factors and coronary calcifications detected by computed tomography // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2006. – №9. – P.3766-3772.
12. Cappelletto V., Ronchi C., Morpurgo P.S., et al. Circulating ghrelin levels in basal conditions and during glucose tolerance test in acromegalic patients // *European Journal Endocrinology.* – 2002. – №147(2). – P.189-194.
13. Clemmons D.R. Roles of insulin-like growth factor-I and growth hormone in mediating insulin resistance in acromegaly // *Pituitary.* – 2002. – №5(3). – P.181-183.
14. Coculescu M., Niculescu D., Lichiardopol R., Purice M. Insulin resistance and insulin secretion in non-diabetic

acromegalic patients // *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* – 2007. – №115(5). – P.308-316.

15. Colao A., Baldelli R., Marzullo P., et al. Systemic hypertension and impaired glucose tolerance are independently correlated to the severity of the acromegalic cardiomyopathy // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2000. – №85(1). – P.193-199.

16. Colao A., Di Somma C., Savanelli M.C., et al. Beginning to end: cardiovascular implications of growth hormone (GH) deficiency and GH therapy // *Growth Horm IGF Res.* – 2006. – №16 (Suppl A). – P.41-48.

17. Colao A., Marzullo P., Lombardi G. Effect of six months treatment with lanreotide on cardiovascular risk factors and arterial intima-media thickness in patients with acromegaly // *Eur J Endocrinol.* – 2002. – №146. – P.303-309.

18. Damjanović S.S., Petakov M.S., Raicević S., et al. Serum leptin levels in patients with acromegaly before and after correction of hypersomatotropism by trans-sphenoidal surgery // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2000. – №85(1). – P.147-154.

19. Date Y., Kojima M., Hosoda H., et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans // *Endocrinology* 2000. – Vol.141(11). – P.4255-4261.

20. Delaroudis S.P., Efstathiadou Z.A., Koukoulis G.N., et al. Amelioration of cardiovascular risk factors with partial biochemical control of acromegaly // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2008. – Vol. 69(2). – P.279-284.

21. Djurhuus C.B., Gravholt C.H., Nielsen S., et al. Additive effects of cortisol and growth hormone on regional and systemic lipolysis in humans // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2004. – №286(3). – P.488-494.

22. Fève B., Bastard J.P. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus // *Nat Rev Endocrinol.* – 2009. – №5(6). – P.305-311.

23. Freda P.U., Reyes C.M., Conwell I.M., et al. Serum ghrelin levels in acromegaly: effects of surgical and long-acting octreotide therapy // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – №88(5). – P.2037-2044.

24. Freda P.U., Shen W., Heymsfield S.B., et al. Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor I excess due to acromegaly // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – № 93(6). – P. 2334-2343.

25. Gibney J., Wolthers T., Burt M.G., et al. Protein metabolism in acromegaly: differential effects of short- and long-term treatment // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2007. – №92(4). – P.1479-1484.

26. Graham M.R., Evans P., Thomas N.E., et al. Changes in endothelial dysfunction and associated cardiovascular disease morbidity markers in GH-IGF axis pathology // *Am J Cardiovasc Drugs.* – 2009. – №9(6). – P.371-381.

27. Graham M.R., Evans P., Davies B., Baker J.S. Arterial pulse wave velocity, inflammatory markers, pathological GH and IGF states, cardiovascular and cerebrovascular disease // *Vasc Health*

Risk Manag. - 2008. - №4(6). - P.1361-1371.

28. Hekimsoy Z., Ozmen B., Ulusoy S. Homocysteine levels in acromegaly patients // *Neuro Endocrinol Lett.* - 2005. - №26(6). - P.811-814.

29. Holdaway I.M., Rajasoorya C.R., Gamble G.D., Stewart A.W. Long-term treatment outcome in acromegaly // *Growth Horm IGF Res.* - 2003. - №13(4). - P.185-192.

30. Höglund E., Mattsson G., Tyrberg B., et al. Growth hormone increases beta-cell proliferation in transplanted human and fetal rat islets // *JOP.* - 2009. - №10(3). - P.242-248.

31. Iozaki O., Tsushima T., Miyakawa M., et al. Interaction between leptin and growth hormone (GH)/IGF-I axis // *Endocr J.* - 1999. - №46 (SupplS). - P.17-24.

32. Iozaki O., Tsushima T., Miyakawa M., et al. Growth hormone directly inhibits leptin gene expression in visceral fat tissue in fatty Zucker rats // *J Endocrinol.* - 1999. - Vol. 161. №3. P.511-516.

33. Juul A., Scheike T., Davidsen M., et al. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study // *Circulation.* - 2002. - №106(8). - P.939-944.

34. Katznelson L. Alterations in body composition in acromegaly // *Pituitary.* - 2009. - №12(2). - P.136-142.

35. Kaluzny M., Bolanowski M., Daroszewski J., Szuba A. The role of fibrinogen and CRP in cardiovascular risk in patients with acromegaly // *Endokrynol Pol.* - 2010. - №61(1). - P.83-88.

36. Kramer F., Torzewski J., Kamenz J., et al. Interleukin-1beta stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NFkappaB- and C/EBPbeta-dependent autocrine interleukin-6 loop // *Mol Immunol.* - 2008. - №45(9). - P.2678-2689.

37. Lanes R., Marciano H., Villaroel O., et al. Circulating levels of high-sensitivity C-reactive protein and soluble markers of vascular endothelial cell activation in growth hormone-deficient adolescents // *Horm Res.* - 2008. - №70(4). - P.230-235.

38. Lee N.K., Sowa H., Hinoi E., et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton // *Cell.* - 2007. - №130(3). - P.456-469.

39. Lindberg-Larsen R., Møller N., Schmitz O., et al. The impact of pegvisomant treatment on substrate metabolism and insulin sensitivity in patients with acromegaly // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2007. - №92(5). - P.1724-1728.

40. Maedler K., Sergeev P., Ehses J.A., et al. Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2004. - №101(21). - P.8138-8143.

41. Nomikos P., Buchfelder M., Fahlbusch R. The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical 'cure' // *Eur J Endocrinol.* - 2005. - №152(3). - P.379-387.

42. Nørrelund H., Hansen T.K., Ørskov H., et al. Serum ghrelin levels in acromegaly: effects of surgical and long-acting octreotide therapy // *Clin Endocrinology.* - 2002. - №57(4). - P.539-546.

43. Ottosson M., Lönnroth P., Björntorp P., Edén S. Effects of cortisol and growth hormone on lipolysis in human adipose tissue // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2000. - №85(2). - P.799-803.

44. Ottosson M., Vikman-Adolfsson K., Enerbäck S., et al. Growth hormone inhibits lipoprotein lipase activity in human adipose tissue // *J Clin Endocrinol Metab.* - 1995. - №80(3). - P.936-941.

45. Otsuki M., Kasayama S., Yamamoto H., et al. Characterization of premature atherosclerosis of carotid arteries in acromegalic patients // *Clin Endocrinol.* - 2001. - №54(6). - P.791-796.

46. Parkinson C., Whatmore A.J., Yates A.P., et al. The effect of pegvisomant-induced serum IGF-I normalization on serum leptin levels in patients with acromegaly // *Clin Endocrinol (Oxf).* - 2003. - Vol. 59. №2. - P.168-174.

47. Pekic S., Doknic M., Miljic D., et al. Ghrelin test for the assessment of GH status in successfully treated patients with acromegaly // *Eur J Endocrinol.* - 2006. - Vol. 154. №5. - P.659-666.

48. Pittas A.G., Harris S.S., Eliades M., et al. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2009. - №94(3). - P.827-832.

49. Resmini E., Minuto F., Colao A., Ferone D. Secondary diabetes associated with principal endocrinopathies: the impact of new treatment modalities // *Acta Diabetol.* - 2009. - №46(2). - P.85-95.

50. Saad M.F., Bernaba B., Hwu C.M., et al. Insulin regulates plasma ghrelin concentration // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2002. - №87(8). - P.3997-4000.

51. Sauter N.S., Schulthess F.T., Galasso R., et al. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia // *Endocrinology* 2008. - №149(5). - P.2208-2218.

52. Sesmilo G., Fairfield W.P., Katznelson L., et al. Cardiovascular risk factors in acromegaly before and after normalization of serum IGF-I levels with the GH antagonist pegvisomant // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* - 2002. - №87(4). - P.1692-1699.

53. Siemińska L., Lenart J., Cichoń-Lenart A., et al. Serum adiponectin levels in patients with acromegaly // *Pol Merkuri Lekarski.* - 2005. - №19(112). - P.514-516.

54. Silha J.V., Krsek M., Hana V., et al. Perturbations in adiponectin, leptin and resistin levels in acromegaly: lack of correlation with insulin resistance // *Clin Endocrinol (Oxf).* - 2003. - №58(6). - P.736-742.

55. Spilcke-Liss E., Friedrich N., Dörr M., et al. Serum Insulin-like Growth Factor-I and its Binding Protein 3 in their Relation to Intima Media Thickness: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP) // *Clin Endocrinol.* - 2011. - №9. - P.1365-2265.

56. Sucunza N., Barahona M.J., Resmini E., et al. A link between bone mineral density and serum adiponectin and visfatin levels in acromegaly // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2009. - Vol. 94. №10. - P.3889-3896.

57. Kawamata T., Inui A., Hosoda H., et al. Perioperative plasma active and total ghrelin levels are reduced in acromegaly when compared with nonfunctioning pituitary tumours even after normalization of serum GH // *Clinical Endocrinology.* - 2007. - №67. - P.140-144.

58. Tilg H., Moschen A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance // *Mol Med.* - 2008. - Vol. 14. №3-4. - P.222-231.

59. Tsuchida A., Yamauchi T., Ito Y., et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity // *J Biol Chem.* - 2004. - Vol. 279. №29. - P.30817-30822.

60. Ueland T., Fougner S.L., Godang K., et al. Associations between body composition, circulating interleukin-1 receptor antagonist, osteocalcin, and insulin metabolism in active acromegaly // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2010. - Vol. 95. №1. - P.361-368.

61. Ueland T., Fougner S.L., Godang K., et al. IGF-I are significant determinants of bone turnover but not bone mineral density in active acromegaly: a prospective study of more than 70 consecutive patients // *Eur J Endocrinol.* - 2006. - Vol. 155. №5. - P.709-715.

62. Vilar L., Naves L.A., Costa S.S., et al. Increase of classic and nonclassic cardiovascular risk factors in patients with acromegaly // *Endocr Pract.* - 2007. - Vol. 13. №4. - P.363-372.

63. Wexler T., Gunnell L., Omer Z., et al. Growth hormone deficiency is associated with decreased quality of life in patients with prior acromegaly // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2009. - Vol. 94. №7. - P.2471-2477.

64. Wiesli P., Bernays R., Brändle M., et al. Effect of pituitary surgery in patients with acromegaly on adiponectin serum concentrations and alanine aminotransferase activity // *Clin Chim Acta.* - 2005. - Vol. 352. №1-2. - P.175-181.

65. Zgliczynski W., Kochman M., Misiowski W., Zdurowski P. In acromegaly, increased bone mineral density (BMD) is determined by GH-excess, gonadal function and gender // *Neuro Endocrinol Lett.* - 2007. - № 28(5). - P.621-628.

66. Zhao Y.F., Feng D.D., Chen C. Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes // *Int J Biochem Cell Biol.* - 2006. - № 38(5-6). - P.804-819.

**Информация об авторах:** Павлова Людмила Сергеевна – врач-эндокринолог, аспирант, 163000, г. Архангельск, пр. Троицкий, дом 51, СГМУ, кафедра факультетской терапии, e-mail: LyudmilaPavlova1983@yandex.ru; Зыкова Татьяна Алексеевна – д.м.н., профессор, заведующий курсом.



## ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ВНЕДРЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ БЕЗМЕТАЛЛОВЫХ КОНСТРУКЦИЙ В ПРАКТИКУ ВРАЧА-СТОМАТОЛОГА

Тимур Олегович Вартанов

(Московский государственный медико-стоматологический университет,  
ректор — д.м.н., проф. О.О. Янушевич)

**Резюме.** В статье представлен обзор внедрения различных видов цельнокерамических материалов, а также способов их изготовления, в практику врача-стоматолога.

**Ключевые слова:** цельнокерамические конструкции, адгезия, виниры, прессованная керамика, оксид циркония, Cad/Cam технологии.

## THE BASIC STAGES OF INTRODUCTION OF TECHNOLOGY OF METALLESS DESIGNS IN THE PRACTICE OF STOMATOLOGIST

T.O. Vartanov

(Moscow State Medical Stomatologic University)

**Summary.** In the paper the review of ceramic materials and ways of their manufacturing and introduction to the practice of stomatologist has been presented.

**Key words:** wholly ceramic designs, adhesion, veneer, the pressed ceramics, oxide of zirconium, Cad/Cam technologies.

Более 30 лет для реставрации зубов используются металлокерамические протезы. Реставрации этой категории стали популярны благодаря предсказуемости результата и приемлемой эстетике. Однако, несмотря на успех этой технологии, спрос на более высокий эстетический результат и озабоченность биологической совместимостью с металлом привели к распространению безметалловых, или цельнокерамических реставраций. На сегодняшний день керамические материалы являются основой эстетической стоматологии. Быстрое совершенствование керамических материалов и технологий их применения позволило максимально эффективно имитировать естественный вид зубов.

Безметалловые керамические реставрации впервые стали появляться в практике врачей-стоматологов в 1980-х. До этого времени основная проблема в стоматологии заключалась в точном воспроизведении параметров препарированного зуба. В последующем было разработано множество вариантов конструкций металлокерамических коронок, которые были использованы при изготовлении цельнокерамических конструкций.

С появлением протравливания эмали (Вуносоге, 1955) в качестве средства ретенции, стали доступными новые возможности реставрации полимерными материалами. Вследствие того, что проникновение полимеров в микроскопические неровности протравленной эмали обеспечивало настолько надежную ретенцию, отпала необходимость полагаться на высечки и механическую ретенцию для удержания реставрации. С применением адгезивной технологии, интеграция в зубную структуру реставраций стала намного лучше и обеспечила непрерывность перехода от структуры зуба к реставрации. Использование цельнокерамических конструкций открыло новую эру в развитии эстетической стоматологии [3,5,6,11,18].

Первые керамические массы были достаточно примитивны и не могли удовлетворить даже невзыскательных врачей. В 1965 году Mclean и Hughes опубликовали методику работы со спеченным оксидом алюминия, который был предложен в качестве заготовок для коронок, мостовидных протезов малой протяженностью и индивидуальных промежуточных частей. Однако, этот материал обладал достаточно высоким показателем усадки, что повлияло на его использование в практике врачей-стоматологов. В 1968 году McCulloch предложил метод изготовления коронок и виниров из стеклокерамики. Изменение цвета таких реставраций было возможно только с помощью поверхностных красителей, которые достаточно быстро стирались. Еще одним

минусом этого вида реставрации, стала недостаточно правильная техника адгезивной фиксации в то время, а также отсутствие адгезивных цементов, что приводило к высокому результату неудач. Адгезия к поверхности дентина являлась более трудной задачей, чем бондинг к эмали. Лишь в 1979 году в Японии ввели концепцию тотального протравливания, что позволило увеличить качество сцепления керамических реставраций с поверхностью зуба. Большое количество красивых цельнокерамических реставраций ломались через несколько месяцев после их фиксации [1,3,9,13,20].

Очевидное исключение к этому явлению – успех прессованных цельнокерамических реставраций. Методика прессования была создана для изготовления керамических вкладок, накладок, виниров и коронок. На стоматологическом факультете университета Цюриха была разработана керамика Импресс, усиленная кристаллами лейцита, которая стала одной из первых систем горячего прессования керамики. Этот материал представляет собой лейцитную стеклокерамику. Методика горячего прессования Импресс стала обширно использоваться для создания одиночных реставраций с полным покрытием во фронтальной области. Импресс-керамика, которая имеет низкую прочность на изгиб – 120 МПа, что ограничивает ее использование. Спустя несколько лет на рынке стоматологических материалов появилась новая стеклокерамика для горячего прессования Импресс 2. В ее основе содержится литий-дисиликатная стеклокерамика, которая характеризуется повышенной прочностью на изгиб. Таким образом, этот материал значительно расширил возможности врачей-стоматологов для создания высокоэстетичных и в то же время достаточно прочных реставраций. И Импресс, и Импресс 2 рекомендовались в тех случаях, когда необходима транслюцентность от средней до высокой. В 2005 году компания Ivoclar Vivadent разработала и представила на стоматологическом рынке усовершенствованный Импресс e.max Press. Он обладает прочностью на изгиб порядка 460 МПа и является более совершенным стеклокерамическим материалом, по сравнению с предшественниками [2,4,6,14,19].

Прессованная керамика менее прочная, чем оксид алюминия, однако, является наиболее подходящим вариантом для восстановления витальных зубов вкладками, жакетными коронками и винирами, в связи с сочетанием высокой эстетики и достаточной прочности.

Цельнокерамические вкладки, накладки, виниры, а также одиночные коронки из прессованной керамики стали надежным методом восстановления утраченных

структур зуба и по сей день. Благодаря соблюдению протокола адгезивной фиксации цельнокерамических конструкций, удается воспроизвести биомеханические свойства зуба, а также восстановить его структурную целостность, что доказывает наличие у керамики биомиметических свойств [4,9,11,16].

Появление метода шликерного литья каркасов из оксида алюминия для последующей инфльтрации стеклом, с целью повышения прочности и снижения пористости, дало новый толчок использования этого вида реставрации в сравнении с полевошпатным фарфором. Полноценной цельнокерамической системой, как вид реставрации зубов, инфльтрированный стеклом оксид алюминия стал использоваться с конца 80-х годов, когда на рынке появился материал Ин-церам Алюминия. Он стал первой цельнокерамической системой, которую можно было использовать для реставрации зубов полноценными коронками и даже небольшой протяженностью (не более 3-х единиц) передних частичных несъемных зубных протезов, что стало важной вехой в развитии безметалловых реставраций. Методика шликерного литья получила дальнейшее развитие в 1994 году, когда был предложен материал Ин-церам Шпинелль. Он должен был преодолеть показатели опакости Ин-церам Алюминия. Однако увеличение прозрачности Ин-церам Шпинелль, по сравнению с Ин-церам Алюминия, повлекло за собой снижение прочности почти в два раза, что значительно уменьшило объем его использования [12,16,18].

Более 35 лет назад некоторые стоматологические компании озаботились также изготовлением керамических реставраций, путем машинной обработки. Для ее проведения должны были использоваться заводские керамические блоки, которые должны были обладать лучшими механическими свойствами для изготовления керамических реставраций. Процесс производства разделился на копирующе-фрезерное производство (механическое) и автоматизированное (Cad/Cam). Копирующе-фрезерное производство заключалось в изготовлении дубликата реставрации из композитного материала. Оптическое устройство сканирует дубликат, которое служит точной копией реставрации, фрезеруемой из керамического блока. Однако, недостатком этой системы стал ограниченный спектр показаний и требование достаточно большого количества времени для ручного производства [3,6,7,13,17].

Cad /Cam системы появились еще в 1970-х годах, однако в стоматологии они стали использоваться только в 90-х. С их помощью задается программа для изготовления смоделированного на компьютере каркаса. Такой подход позволяет избежать необходимости физического выполнения некоторых процедур. Внедрение в стоматологическую практику некоторых Cad/Cam систем стало настоящей революцией в зубном протезировании и потребовало от зубного техника освоения совершенно новых навыков и знаний.

Первой системой Cad/Cam стала система Церек. Популярность этих технологий значительно возросла после появления более прочной оксидной керамики (оксид алюминия, оксид циркония). Cad/Cam системы используются главным образом для изготовления реставраций из плотно спеченных керамических блоков. Системы позволяют сканировать одиночные культы для создания как одиночных коронок, так и несъемных ча-

стичных протезов. Во всех подобных системах процесс изготовления включает в себя три основных этапа: сбор параметров, компьютерное моделирование и компьютерное производство реставрации. Из-за крайне высокой стоимости Cad/Cam-систем отмечается тенденция к созданию на сегодняшний день специализированных фрезерных центров, благодаря чему зуботехнические лаборатории могут ограничиться приобретением только сканирующих устройств [8,10,15].

На сегодняшний день в продаже имеются заготовки из оксидов алюминия и циркония, которые предназначены для использования с технологией Cad/Cam. Наибольшую популярность получила керамика на основе диоксида циркония, которая обладает отличными механическими свойствами. Так, она имеет большую, в сравнении с другими видами стоматологической керамики, прочность на изгиб (1200 МПа). Оксид иттрия добавляют в цирконий, чтобы стабилизировать в дальнейшем растрескивание керамики. Кроме высокой прочности, диоксид циркония обладает высокой вязкостью разрушения, которая почти в два раза выше, чем у оксида алюминия. Керамика на основе оксида циркония показана для изготовления коронок, частичных несъемных зубных протезов и отдельных абатментов имплантатов. Распространению этого материала также способствовал факт наличия сходных с природными зубами показателей цвета. К сожалению, показатели транслюцентности лучше рассмотреть у других материалов [3,6,14].

Появление в практике врачей-стоматологов возможности использования фрезерованной керамики на основе диоксида циркония позволяет создавать более легкие и стабильные реставрации с высокими эстетическими показателями и достаточной прочностью.

При выборе стратегии лечения очень важно рассмотреть имеющиеся данные о долговечности цельнокерамических материалов. Учитывая многочисленность безметалловых систем на рынке и расхождения в определенных показателях прочности, вязкости, цветовых характеристик, эта задача может оказаться весьма легкой [10,11,19].

Уникальные возможности комбинирования видов керамики и способов изготовления, дали возможность стоматологу заместить любые дефекты твердых тканей зубов, витальных и девитализированных, дефекты зубных рядов, а также увеличить сроки их дальнейшей службы, благодаря положительным свойствам этих материалов. Преимущество керамических масс обеспечивает лучшее качество и цветостойкость реставрации. Керамика не аккумулирует зубной налет, вследствие своей глянцевой поверхности. Керамика характеризуется полной инертностью и высокой биосовместимостью, что практически исключает развитие аллергических реакций у пациентов. Оксидная керамика является наиболее высококачественной керамикой. Это связано с однофазностью микроструктуры, высокой прочностью по сравнению со стеклокерамикой и автоматизированным фрезерованием заводских спеченных заготовок. Однако, несмотря на быстрый прогресс технологий, окончательный успех или неудача лечения с использованием цельнокерамических реставраций непосредственно связаны с квалификацией стоматолога и зубного техника.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Conrad H.J., Seong W.J., Pesun I.J. Current ceramic materials and systems with clinical recommendations: a systematic review // J. Prosthet. dent. – 2007. – Vol. 98. – P.389-404.
2. Donovan T.E. Factors essential for successful all-ceramic restorations. // J. Am. Dent. Assoc. – 2008. – Vol. 139. – P.14-18.
3. Douglas T.A. Aesthetic and restorative dentistry. – Houston: Everest. – 2009. – P.174-179.
4. Duarte S., Phark J.H., Blatz M. Ceramic systems: An ultrastructural study // Quintessence Dent. Technol. – 2010. – Vol. 33. – P.42-60.

5. Gurel G. The science and art of porcelain laminate veneers. – Chicago: Quintessence. – 2003. – P.33-43.
6. Hammerle C. Dental ceramics. – Berlin: Quintessence. – 2010. – P.6-23.
7. Jones D.W. Development of dental ceramics. An historical perspective // Dent. Clin. North. Am. – 1985. – Vol. 294. – P.621-644.
8. Kelly J.R. Dental ceramics: what is this stuff anyway? // J. Am. Dent. Assoc. – 2008. – Vol. 139. – P.4-7.
9. Kelly J.R., Nishimura I., Campbell S.D. Ceramics in dentistry: historical roots and current perspectives // J. Prosthet. dent. – 1996. – Vol. 75. №1. – P.18-32.

10. Kina S., Brugera A. Invisible: Esthetic ceramic restorations. – Sao Paulo: Arte Medicas. – 2009. – P.23-48.
11. Magne P., Magne M. Treatment of extended anterior crown fractures using type IIIA bonded porcelain restorations. // J. Calif Dent. Assoc. – 2005. – Vol. 33. – P.387-396.
12. Mclean J.W. Development of esthetics in aluminous porcelain restoration // J Esthet. Dent. – 1997. – Vol. 9. – P.208-214.
13. Mclean J.W. The science and art of dental ceramics. Bridge design and laboratory procedures in dental ceramics. – Chicago: Quintessence. – 1982. – P.21-27.
14. Massironi D. Precision in dental esthetics. – Milan: Quintessence. – 2008. – P.342-374.
15. Raptis N.V., Michalakakis K.X., Hirayama H. Optical behavior of current ceramic systems // Int. J. Periodontics Restorative Dent. – 2006. – Vol. 26. – P.31-41.
16. Sulamain F., Chai J., Jameson L.M. A comparison of the marginal fit of In-ceram, IPS Empress and Procera crowns // Int. J. Prosthodont. – 1997. – Vol. 10. – P.478-484.
17. Tinscert J. Marginal fit of alumina-and zirconia-based fixed partial dentures produced by a Cad/Cam system // Oper dent. – 2001. – Vol. 26. – P.367-374.
18. Touati B., Miara P., Nathanson D. Esthetic dentistry and ceramic restorations. – London: Martin Dunitz. – 1999. – P.11-61.
19. Williams T. Porcelain veneer fabrication. Platinum foil and refractory model techniques // Ont. Dent. – 1989. – Vol. 10. – P.635-637.
20. Yeo I.S., Yans J.H., Lee J.B. In vitro marginal fit of three all-ceramic crown systems // J. Prosthet. dent. – 2003. – Vol. 90. – P.459-464.

**Информация об авторе:** Вартанов Тимур Олегович – аспирант, 127473, Москва, Дегагская ул., 20/1, e-mail: vartanovt@mail.ru.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ХОХЛОВА Н.И., ТОЛОКОНСКАЯ Н.П., ВАСИЛЕЦ Н.М., ПРОВОРОВА В.В. – 2012  
УДК 616.36-002.1-099-036:51

### МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПРОГНОЗА ТЯЖЕЛЫХ ФОРМ ОСТРОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В НА ОСНОВЕ ИНТЕГРАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Наталья Игоревна Хохлова<sup>1</sup>, Наталья Петровна Толоконская<sup>1,2</sup>, Наталья Михайловна Василец<sup>1</sup>,  
Вероника Валерьевна Проворова<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Новосибирский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.О. Маринкин, кафедра инфекционных болезней, зав. – д.м.н., проф. Н.П. Толоконская; <sup>2</sup>НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, директор – член-корр. РАМН, д.м.н., проф. Л.М. Непомнящих, отдел региональных проблем инфекционной патологии, зав. – д.м.н., проф. Н.П. Толоконская)

**Резюме.** С использованием теоремы Байеса разработана математическая модель прогноза тяжелой формы острого вирусного гепатита В с учетом интегральной клинической оценки эндогенной интоксикации (ЭИ). Установлена прогностическая значимость ряда клинических и биохимических симптомов раннего периода болезни, данных о характере и взаимосвязях определенных видов исходной соматической патологии и лабораторных показателей ЭИ – содержания малонового диальдегида в сыворотке крови, эффективной концентрации альбумина и резерва связывания альбумина. Определена величина суммы прогностических коэффициентов (8 баллов и более), которая с вероятностью 95% и более свидетельствует о риске развития тяжелой формы острого вирусного гепатита В.

**Ключевые слова:** острый вирусный гепатит В, математическая модель прогноза, эндогенная интоксикация.

### THE MATHEMATICAL MODEL OF PROGNOSIS OF THE ACUTE VIRAL HEPATITIS B SEVERE FORMS ON THE BASE OF INTEGRAL CLINICAL VALUATION OF ENDOGENIC INTOXICATION

N.I. Khokhlova<sup>1</sup>, N.P. Tolokonskaya<sup>1,2</sup>, N.M. Vasilez<sup>1</sup>, V.V. Provorova<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University of Roszdrav; <sup>2</sup>SI RI for Regional Pathology and Pathomorphology of SB RAMS)

**Summary.** The mathematical model of prognosis of the acute viral hepatitis B severe form was created using Bayes' theorem on the base of integral clinical valuation of endogenous intoxication (EI). The prognostic value of the early period of clinical and biochemical manifestations, data about the character and communications of previous somatic diseases and the laboratory indicators of EI (malone dialdehyde level in serum, albumin effective concentration, albumin binding reserve) were established. The sum of prognostic coefficients greater or equal 8 points testifies to the risk of the acute viral hepatitis B severe form with the probability  $\geq 95\%$ .

**Key words:** acute viral hepatitis B, mathematical model of prognosis, endogenous intoxication.

В последнее десятилетие в России на фоне значительного распространения в популяции персистирующей HBV-инфекции отмечено существенное снижение заболеваемости острым вирусным гепатитом В (ОВГВ), однако при этом возросли доля его тяжелых форм и трудности прогнозирования риска фульминантного ВГВ и летальных исходов [1]. Острые вирусные гепатиты (ОВГ) в большинстве случаев развиваются на фоне сочетанной соматической патологии, что предполагает наличие исходной эндогенной интоксикации (ЭИ) на

уровне внеклеточного матрикса и клеток, меняющей характер физиологических реакций организма. Это напрямую связано с негативными изменениями реактивности и иммунитета организма и существенно влияет на характер клинических проявлений заболевания [9-11].

В этих условиях внешние симптомы ОВГ, весьма сходные у больных в ранний период болезни, еще менее информативны для диагноза и прогноза ее тяжелых и фульминантных форм [6]. Стандартные биохимические

и гематологические показатели также не имеют высокой прогностической значимости и не характеризуют выраженности ЭИ, являющейся ведущим критерием тяжести болезни [4,13,14]. С этих позиций целесообразно применение разработанной нами ранее интегральной клинической оценки ЭИ, в которой особое значение приобретают данные о характере и взаимосвязях различных соматических заболеваний больного.

В рамках интегральной оценки ЭИ представляется перспективным использование ее суммарных лабораторных показателей: уровня малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови, характеризующего гидрофильный компонент ЭИ, эффективной концентрации альбумина (ЭКА) и резерва связывания альбумина (РСА), отражающих гидрофобный компонент ЭИ, что было показано нами ранее при ОВГ [9,10].

Простое суммирование клинических и лабораторных данных недостаточно для целостного представления о нарушениях в организме больного и прогноза тяжелого течения болезни. Системный подход в клинической диагностике обеспечивается созданием математических моделей, определяющих прогностическую значимость каждого из используемых показателей и формирующих на их основе интегральную оценку [3,5,7,8].

Цель исследования: разработать математическую модель раннего прогноза тяжелых форм ОВГВ с учетом интегральной оценки ЭИ.

### Материалы и методы

В исследование были включены 102 больных ОВГВ в возрасте от 17 до 68 лет (средний возраст  $27,5 \pm 0,97$  лет), находившихся на лечении в МБУЗ г. Новосибирска ГИКБ №1. Диагноз ОВГВ был подтвержден определением маркеров ОВГВ методом ИФА: НВsAg, НВeAg, IgMНВсog при отсутствии IgG к антигенам НВV. У 18 больных была диагностирована микст-инфекция: ОВГВ+С (17 случаев) и ОВГВ+С+D (1 случай). В числе 102 больных ОВГВ тяжелая форма была у 38 больных (из них в 2 случаях – фульминантный ОВГВ, в одном – с летальным исходом), среднетяжелая – у 64 больных. Степень тяжести ОВГВ устанавливалась по совокупности клинико-биохимических показателей, учтенных за весь период острой фазы болезни [6].

В работе применялась разработанная нами многофакторная система клинической диагностики вирусных гепатитов, учитывающая интегральные показатели ЭИ [9,10]. Данная система предусматривает изучение симптомов острой фазы болезни и стандартных функциональных проб печени в сопоставлении с клиническими данными о характере, хронологии развития и взаимосвязях соматических заболеваний, свидетельствующих об исходной ЭИ и негативных изменениях реактивности организма. Так, в значительном временном масштабе оценивались частота, характер и взаимосвязи острых инфекционных заболеваний (ОИЗ), хронических заболеваний, обусловленных эндогенными инфекциями (ХЗОЭИ), заболеваний пищеварительной системы, хронических заболеваний дегенеративного характера (заболеваний с выраженными атрофическими, склеротическими процессами и опухолей); а также токсические воздействия на организм в анамнезе (алкоголизм, наркомания).

Интегральная оценка ЭИ дополнялась определением содержания МДА в сыворотке крови, исследовали по методике Н. Esterbauer [12], ЭКА и ОКА сыворотки крови – флуоресцентным методом Ю.А. Грызунова и соавт. [2] на флюориметре «Hitachi MPF-4» с использованием набора реактивов «Альбумин-Зонд» (г. Москва). РСА рассчитывался как соотношение ЭКА и ОКА в усл. ед. Исследование показателей ЭИ осуществлялись в 1-3-й день желтушного периода болезни.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы «STATISTICA-6» с применением критерия Манна-Уитни для средних величин ( $M \pm m$ ) и критерия  $\chi^2$  для относительных величин.

Риск развития тяжелой формы ОВГВ прогнозировали по формуле вероятности гипотез (теореме Байеса) [7,8]. Прогностические коэффициенты каждого фактора риска рассчитывали по методике Е.В. Гублера [4]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В разработку математической модели прогноза были включены те показатели и их градации, в отношении которых были установлены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) между группами тяжелого и среднетяжелого ОВГВ в ранние сроки болезни (в преджелтушном периоде и в 1-3-й дни желтушного периода).

Так, в эти сроки болезни при тяжелом ОВГВ статистически значимо чаще, чем при среднетяжелом, отмечались такие симптомы, как рвота (63,2% и 34,4% соответственно), анорексия (52,6% и 14,1%), головная боль (47,4% и 25%), головокружение (31,6 и 9,4%), нарушение сна (36,8% и 12,5%), смена субфебрилитета на фебрилитет (13,2% и 3,1%), геморрагические проявления (21,2% и 6,3%) и интенсивная желтуха (52,6% и 21,9%),  $p < 0,05$ .

В группе больных тяжелым ОВГВ по сравнению с оппозитной группой была установлена статистически значимо большая частота изменений характера ОИЗ, выражающихся в отсутствии фебрильной температуры, утрате цикличности (57,9% и 39,1%); отсутствия любых ОИЗ в течение 5 лет и более (13,2% и 1,5%), что было сопряжено с наличием хронических соматических заболеваний и свидетельствовало о негативных изменениях реактивности организма. Также у больных тяжелым ОВГВ статистически значимо чаще отмечались токсические воздействия в анамнезе (21,1% и 9,4%), хронические заболевания, обусловленные эндогенными инфекциями (68,4% и 43,7%), заболевания желчевыводящей системы (47,4% и 25,0%), в том числе их сочетание с запорами (20,9% и 3,1%), и дегенеративные заболевания (15,8% и 3,1%),  $p < 0,05$ . Частота микст-инфекции статистически значимо не отличалась в группах.

Из числа показателей функционального состояния печени между группами тяжелого и среднетяжелого ОВГВ в первые 3 дня желтушного периода достоверно отличались средние показатели активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) –  $2785,7 \pm 174,5$  и  $2110,5 \pm 88,8$  ед/л соответственно, аспартатаминотрансферазы (АСТ) –  $1954,5 \pm 147,7$  и  $1285,0 \pm 88,0$  ед/л, содержания общего билирубина (Обил) –  $198,0 \pm 12,3$  и  $147,2 \pm 6,5$  мкмоль/л, прямого билирубина (Пбил) –  $122,0 \pm 11,5$  и  $78,1 \pm 4,2$  мкмоль/л, протромбинового индекса (ПТИ)  $73,2 \pm 2,3$  и  $84,6 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,05$ ). Статистически значимые различия при тяжелой и среднетяжелой форме болезни в эти сроки болезни были также установлены в отношении средних величин изученных показателей ЭИ: уровнем МДА –  $9,3 \pm 0,3$  и  $8,2 \pm 0,3$  ммоль/л соответственно, ЭКА –  $32,1 \pm 0,8$  и  $36,2 \pm 0,7$  г/л и РСА –  $0,74 \pm 0,01$  и  $0,8 \pm 10,01$  усл. ед. ( $p < 0,05$ ). Для указанных лабораторных показателей были также выделены градации значений, в отношении которых были получены статистически значимые различия между тяжелой и среднетяжелой формой ОВГВ (табл. 1).

Для определения прогностической значимости выбранных показателей по методике Е.В. Гублера [4] для каждого из них были рассчитаны коэффициенты правдоподобия, отражающие отношение риска развития тяжелого ОВГВ при данной градации фактора к риску среднетяжелой формы. С использованием полученного коэффициента отношения правдоподобия были рассчитаны прогностические коэффициенты (PK) по следующей формуле:

$$PK = \log(KП) \times 10,$$

где КП – коэффициент отношения правдоподобия. Полученные прогностические коэффициенты были округлены до целого числа (табл. 1).

Таблица 1

Прогностические коэффициенты (РК) клинических и лабораторных показателей у больных ОВГВ (в баллах)					
Показатели	Градации	РК	Показатели	Градации	РК
Смена субфебрилитета на фебрилитет	есть	7	Дегенеративные заболевания	есть	8
	нет	0		нет	-1
Анорексия	есть	7	Токсические воздействия	есть	4
	нет	-3		нет	-1
Рвота	есть	3	Активность АЛТ (ед/л)	≥ 3000	7
	нет	-3		< 3000	-3
Головная боль	есть	6	Активность АСТ (ед/л)	≥ 2500	7
	нет	-1		< 2500	-3
Головокружение:	есть	6	Обил (мкмоль/л)	≥ 200	9
	нет	-1		< 200	-3
Нарушения сна	есть	5	ПБил (мкмоль/л)	≥ 150	4
	нет	-1		< 150	-3
Геморрагические проявления	есть	5	ПТИ (%)	< 80	6
	нет	-1		≥ 80	-3
ОИЗ без фебрильной температуры	есть	2	ЭКА (г/л)	< 30	5
	нет	-2		30-34,5	-1
Отсутствие ОИЗ в течение 5 лет и более	есть	8	РСА (усл.ед.)	≥ 35	-2
	нет	-1		< 0,65	10
ХЗОЭИ	есть	2	МДА (ммоль/л)	0,65-0,80	0
	нет	-4		≥ 0,80	-2
Заболевания желчевыводящих путей	в сочетании с запорами	9	МДА (ммоль/л)	≥ 10	3
	без запоров	3		< 10	-1
	нет	-4			

Интегральная оценка вероятности развития тяжелой формы ОВГВ выражалась суммой прогностических коэффициентов у каждого больного. Значения суммы прогностических коэффициентов у больных ОВГВ находились в диапазоне от -46 до 72 баллов. У больных с тяжелой формой ОВГВ эта сумма составляла от -8 до 72 баллов (в среднем 24,5±3,6 балла), со среднетяжелой – от -46 до 8 баллов (в среднем 19,6±1,6 балла),  $p < 0,01$ .

Таблица 2

Вероятность развития тяжелой формы ОВГВ (в %)

Сумма	Вероятность развития тяжелой формы ОВГВ
12 баллов и более	100% (абсолютная)
8 баллов и более	95% и более (очень высокая)
от -3 до 7 баллов	70% (высокая)
-4 и менее	5% и менее (низкая)
-9 и менее	0% (отсутствует)

## ЛИТЕРАТУРА

- Асратян А.А., Исаева О.В., Михайлов М.И. Тенденция и анализ эпидемической ситуации по парентеральным вирусным гепатитам В и С в Российской Федерации и отдельных регионах // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунологии. – 2005. – №4. – С.40-45.
- Грызунов Ю.А., Миллер Ю.И., Добрецов Г.Е., Пестова А.Б. Флюоресцентный способ определения массовой концентрации альбумина сыворотки крови человека // Клин. лаб. диагностика. – 1994. – №5. – С.27-31.
- Гублер Е.В. Информатика в патологии, клинической медицине и педиатрии. – Л.: Медицина, 1990. – 176 с.
- Литвинова О.С., Рослый И.М. Патогенетические механизмы и диагностическое значение биохимических показателей у больных вирусными гепатитами тяжелой течения // Инф. болезни. – 2006. – №1. – С.11-13.
- Проворова В.В. Значение эпидемиологических и клинических данных в раннем прогнозе при клещевом энцефалите: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2010. – 23 с.
- Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. – СПб.: Теза, 1997. – 306 с.
- Флетчер Р., Вагнер Э. Основы доказательной медицины. – Пер. с англ. – М.: МедиаСфера, 2004. – 352 с.

**Информация об авторах:** Хохлова Наталья Игоревна – к.м.н., доцент, научный сотрудник, 630099, Новосибирск, ул. Семьи Шамшиных, 40, e-mail: talita@bk.ru, тел. (383) 2181995; Толоконская Наталья Петровна – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, заведующий отделом; Василец Наталья Михайловна – к.м.н., ассистент кафедры, м.н.с.; Проворова Вероника Валерьевна – к.м.н., ассистент кафедры, научный сотрудник.

Далее полученный диапазон был разделен на интервалы в соответствии с разной вероятностью (риском) развития тяжелой формы ОВГВ (табл. 2). Установлено, что с вероятностью 95% и более можно прогнозировать развитие тяжелого ОВГВ у больных с суммой баллов 8 и более. У двух больных с фульминантным ОВГВ сумма баллов составила 51 и 43 соответственно (с летальным исходом во втором случае).

При создании математической модели раннего прогноза тяжелых форм ОВГВ мы исходили из идеи интегральной клинической оценки ЭИ, для чего была использована разработанная нами ранее многофакторная система клинической диагностики ОВГ, выходящая за рамки данной нозологической формы [9,10]. Применение интегральной клинической оценки ЭИ позволило включить в математическую модель прогноза не только клинические симптомы и показатели функционального состояния печени, характеризующие нозологическую форму, но и клинические факты о характере и взаимосвязях соматических заболеваний, свидетельствующие об исходной ЭИ, что было дополнено информативными современными лабораторными показателями ЭИ.

Таким образом, с применением теоремы Байеса определены клинические и лабораторные показатели и их градации, значимые для прогноза развития тяжелой формы ОВГВ в ранние сроки болезни. Установлена величина суммы прогностических коэффициентов (8 баллов и более), свидетельствующая с вероятностью 95% и более о риске развития тяжелой формы ОВГВ. В противовес тому, что обычная оценка совокупности симптомов острой фазы ОВГВ и стандартных лабораторных показателей позволяет достоверно верифицировать степень тяжести лишь в поздние сроки болезни, разработанная нами математическая модель с учетом интегральной клинической оценки ЭИ существенно расширяет возможности клинического диагноза и раннего прогноза при ОВГВ и, тем самым, служит основой своевременной качественной терапии.

8. Шиган Е.Н. Применение современных математических методов и вычислительной техники для изучения здоровья населения. – М., 1973. – 135 с.

9. Хохлова Н.И., Путьшев А.Б., Толоконская Н.П. и др. Значение показателей связывающей способности сывороточного альбумина в клинической оценке эндогенной интоксикации при острых вирусных гепатитах // Клин. лаб. диагностика. – 2007. – №8. – С.35-39.

10. Хохлова Н.И., Толоконская Н.П., Лапицкая Н.М. и др. Критерии оценки эндогенной интоксикации при остром вирусном гепатите В и их клиническое значение // Инфекционные болезни. – 2007. – №2. – С.11-15.

11. Чуйкова К.И., Катанахова Л.Л., Якимов В.Л. и др. Острый гепатит А в Томске в 2005-2006 гг. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. – №1. – С.8-10.

12. Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal // Methods Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P.407-420.

13. Svirtilih N., Simonovic J., Dokic L., et al. Characteristics of patients dying from acute viral hepatitis in Serbia // Turk. J. Gastroenterol. – 2011. – Vol. 22. №2. – P.152-154.

14. Yoshida M. Accurate prediction of fulminant hepatic failure in severe acute viral hepatitis: multicenter study // J. Gastroenterol. – 2002. – Vol. 37. №11. – P.916-921.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЙ И ПРОТИВОГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ Г-ОКСИ- И Г-АМИНОМАСЛЯНЫХ КИСЛОТ***Денис Владимирович Куркин, Елена Владимировна Волотова, Андрей Андреевич Литвинов, Дмитрий Александрович Бакулин, Александр Александрович Озеров**(Волгоградский государственный медицинский университет, ректор – акад. РАМН, д.м.н., проф. В.И. Петров, кафедра фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей, зав. – член корр. РАМН, д.м.н., проф. И.Н. Тюренков, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, зав. – д.м.н., проф. А.А. Озеров)*

**Резюме.** Проведено экспериментальное исследование по изучению церебропротекторной и противогипоксической активности производных  $\gamma$ -оксимасляной и  $\gamma$ -аминомасляной кислот. Установлено, что магниевая, литиевая и натриевая соль  $\gamma$ -оксимасляной кислоты и соединения с лабораторными шифрами РГПУ-189, РГПУ-151 и РГПУ-152, являющиеся производными  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, оказывают выраженное церебропротекторное и противогипоксическое действие в условиях экспериментальной ишемии и гипоксии, превосходящее по эффективности препараты кавинтон и мексидол.

**Ключевые слова:** гамма-оксимасляная кислота, гамма-аминомасляная кислота, экспериментальная ишемия головного мозга, гипоксия, крысы.

**EXPERIMENTAL STUDY OF CEREBROPROTECTIVE AND ANTIHYPOXIC ACTIVITY OF  $\gamma$ -HYDROXYBUTYRIC AND  $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID DERIVATIVES***D.V. Kurkin, E.V. Volotova, A.A. Litvinov, D.A. Bakulin, A.A. Ozerov  
(Volgograd State Medical University)*

**Summary.** Experimental study of cerebroprotective and antihypoxic activity of  $\gamma$ -hydroxybutyric and  $\gamma$ -aminobutyric acid derivatives was carried out. It has been concluded that magnesium, lithium and sodium salts of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid and the derivatives of  $\gamma$ -aminobutyric acid - RGPU -189, RGPU-151 and RGPU-152, showed a significant cerebroprotective and antihypoxic actions during experimental ischemia and hypoxia. New substances showed more marked efficacy in comparing with mexidol and cavinton drugs.

**Key words:** gamma-hydroxybutyric acid, gamma-aminobutyric acid, an experimental cerebral ischemia, hypoxia, rats.

В патогенезе практически всех видов нарушений мозгового кровообращения, гипоксия и индуцированные ею процессы являются неотъемлемой частью патобиохимических реакций в условиях дефицита кислорода [3,4]. На эффективность церебропротекторных средств существенно влияет их способность нивелировать последствия, либо смягчать течение гипоксии [6]. В настоящее время большое внимание уделяется созданию церебропротекторных средств на основе эндогенных метаболитов. Препараты, производные нейромедиаторных аминокислот (ГАМК, глицин, таурин, глутаминовая кислота и т.д.), проявляют широкий спектр церебропротективной активности, реализующийся в наличии у них ноотропного и ноотропоподобного, стресспротекторного, адаптогенного и противогипоксического действия. Несомненный интерес в качестве платформы для создания новых церебропротекторов представляет  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК) и ее активный метаболит  $\gamma$ -оксимасляная кислота (ГОМК), образующаяся в цикле Робертса, которые в настоящее время уже используются в клинической практике при генерализованной гипоксии, черепно-мозговой травме, отеке и ишемии головного мозга [3,6,7]. Механизм церебропротекторного действия ГАМК и ГОМК и как следствие их производных может реализовываться за счет их противогипоксических эффектов [3,5].

Цель работы: изучить противогипоксическую активность ряда новых производных ГОМК и ГАМК.

**Материалы и методы**

Эксперимент был проведен на среднеактивных (в тесте «открытое поле») половозрелых линейных (Wistar) крысах самцах массой 200-220 г и беспородных мышках самцах средней массы 20±2 г. Экспериментальные животные отбирались в группы с учетом требований к созданию репрезентативных выборок, по принципу рандомизации. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу Минздрава РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении

правил лабораторной практики».

Церебропротекторное действие исследуемых соединений изучали на модели неполной ишемии головного мозга, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерий (нарколизация хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг), при этом критерием эффективного действия исследуемых соединений являлось увеличение выживаемости животных через 72 часа после операции по сравнению с контрольной группой [1].

В качестве моделей экспериментальной гипоксии использовались нормобарическая гипоксия с гиперкапнией и гемическая гипоксия. Для создания первой животных помещали в герметически замкнутые камеры объемом 80 куб.см. и регистрировали латентный период наступления апноэ. Гемическую гипоксию вызывали путем однократного подкожного введения нитрита натрия в дозе 250 мг/кг. Об антигипоксическом действии исследуемых соединений судили по увеличению времени наступления апноэ у мышей опытных групп по сравнению с контрольной группой животных [2].

В ходе проведенного исследования были изучены следующие соединения:

- 1) производные ГОМК – натрия оксибутират (100 мг/кг), лития оксибутират (200 мг/кг), магния оксибутират (150 мг/кг);
- 2) производные ГАМК – РГПУ-189 (30 мг/кг), РГПУ-151 (50 мг/кг), РГПУ-152 (50 мг/кг), фенибут (50 мг/кг);
- 3) препараты сравнения – мексидол (100 мг/кг), кавинтон (3,2 мг/кг), магния сульфат (300 мг/кг).

Указанные дозы были выбраны на основании результатов ранее проведенных исследований, в которых они оказались наиболее эффективными (диапазон доз производных ГОМК включал в себя от 25 до 250 мг/кг). Исследуемые вещества и препараты сравнения вводились однократно внутривентриально в подвздошную область, болюсно, в наиболее эффективных дозах с учетом пика их фармакологической активности. Животные ложнооперированной и контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора.

Обработку полученных результатов проводили с по-

мощью пакета программ Microsoft Excel и BioStat 2008 5.2.5.0. Использовались ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений, критерий  $\chi^2$ . Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Суммированные данные влияния исследуемых соединений и препаратов сравнения на выживаемость животных при экспериментальной ишемии головного мозга, вызванной необратимой двусторонней перевязкой общих сонных артерий представлены в таблице 1.

Влияние исследуемых соединений на выживаемость животных и количество летальных исходов после двусторонней перевязки общих сонных артерий

Группа животных	Время регистрации, часы после операции						% летальных исходов
	3	6	12	24	48	72	
ЛО	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	0%
Контроль – ишемия	20/0	18/2	14/6	10/10	8/12	7/13	65%
РГПУ-189	10/0	10/0	9/1	<b>9/1*</b>	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>20%*</b>
РГПУ-151	10/0	9/1	9/1	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>20%*</b>
РГПУ-152	10/0	9/1	9/1	<b>9/1*</b>	7/3	7/3	30%
Натрия оксибутират	6/4	6/4	6/4	6/4	6/4	6/4	40%
Лития оксибутират	9/1	9/1	8/2	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>20%*</b>
Магния оксибутират	8/2	8/2	8/2	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>20%*</b>
Фенибут	10/0	9/1	8/2	7/3	6/4	6/4	40%
Кавинтон	10/0	10/0	8/2	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>8/2*</b>	<b>20%*</b>
Мексидол	9/1	9/1	9/1	5/5	5/5	5/5	50%
Магния сульфат	10/0	9/1	7/3	6/4	5/5	5/5	50%

Примечание. ЛО – группа ложнооперированных животных, N – число выживших животных; n – число умерших животных; \* –  $p \leq 0,01$  – различия статистически значимы по сравнению с группой контрольных животных (критерий  $\chi^2$ ).

Так в контрольной группе, животные которой получали физиологический раствор, большинство крыс погибло в течение первых суток, и через 72 часа после операции число выживших составило 35%. Исследуемые соединения обладали выраженной церебропротекторной активностью. Предварительное введение животным новых производных ГАМК (соединений РГПУ-189, РГПУ-151, РГПУ-152), а так же литиевой и магниевой солей  $\gamma$ -оксимасляной кислоты значимо увеличивало число выживших животных к 72-му часу после операции относительно животных, получавших эквивалентный объём физиологического раствора, что свидетельству-

Влияние исследуемых соединений на время до наступления апноэ при моделировании нормобарической гипоксии с гиперкапнией и гемической гипоксии

Группы	Доза, мг/кг	Модель гипоксии	
		Нормобарическая гипоксия	Гемическая гипоксия
Контроль гипоксия	-	1423,2±25,9	782,4±44,1
РГПУ-189	30	<b>2175,5±86,8**#</b>	<b>1027,5±63,9**#</b>
РГПУ-151	50	<b>2205,3±67,3**#</b>	<b>1099,5±84,2**#</b>
РГПУ-152	50	<b>1986,3±126,6*</b>	<b>1071,9±55,4**#</b>
Натрия оксибутират	100	<b>1970,4±71,8**</b>	<b>985±31,4*</b>
Лития оксибутират	200	<b>1858,2±43,4**</b>	<b>974,7±28,6*</b>
Магния оксибутират	150	<b>2154,2±111,3**#</b>	<b>1020,3±31,5**#</b>
Фенибут	25	1628,4±54,4	934,5±44,1
Кавинтон	3,2	1802,4±81,45	794,1±44,04
Мексидол	100	1739,5±87,5	847,6±45,9
Магния сульфат	300	1587,8±81,2	877,5±43,5

Примечание. Данные статистически значимы по отношению: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  – к показателю контрольной группы животных; # – к показателю животных, получавших мексидол при  $p < 0,05$  (ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений).

ет об их выраженном церебропротекторном действии. Указанные соединения превосходили аналогичное действие препаратов сравнения, не уступая в эффективности кавинтону.

Исследование противогипоксической активности производных ГАМК и ГОМК показало следующее. При воспроизведении нормобарической гипоксии с гиперкапнией апноэ, у животных контрольной группы, фиксировалось в среднем на 24 минуте (табл. 2). Введение всех соединений в различной степени способствовало увеличению времени наступления апноэ. Среди производных ГОМК наиболее эффективным оказался магния оксибутират.

Применение этого соединения приводило к статистически значимому увеличению времени наступления апноэ у мышей на 52% относительно контроля, при этом, значительно превосходя по эффективности препарат сравнения мексидол. Лития и натрия оксибутираты статистически значимо ( $p < 0,01$ ) увеличивали латентный период наступления апноэ в среднем на 31-39% относительно контроля и так же, как и магния оксибутират превосходили по выраженности антигипоксической активности фенибут, мексидол, кавинтон, магния сульфат.

Производные ГАМК, соединения с лабораторными шифрами РГПУ-189, РГПУ-151 и РГПУ-152 проявили выраженную противогипоксическую активность, удлиняя латентный период наступления апноэ на 53%, 55% и 40% относительно контрольной группы животных, также превосходя по степени выраженности защитного эффекта препараты сравнения.

Сходная закономерность отмечалась и при использовании другого варианта гипоксии – гемической (истинной). При воспроизведении данной модели гипоксии у животных наблюдалась более тяжелая форма поражения, чем при нормобарической. Введение нитрита натрия контрольной группе вызывало гибель всех животных в среднем к 13-й минуте наблюдения. Исследуемые соединения (как производные ГАМК, так и производные ГОМК) так же, как и на предыдущей модели, оказали выраженное защитное действие (табл. 2). Введение РГПУ-189 и магния оксибутирата увеличивало время наступления апноэ у них в среднем на 31% и 30% (при  $p < 0,01$  по сравнению с показателями контрольной группы). Значимое увеличение времени наступления апноэ, относительно контрольной группы животных при  $p < 0,05$ , наблюдалось в группах, получавших РГПУ-151 и РГПУ-152, лития оксибутират и магния оксибутират, их эффекты не уступали аналогичным у натрия оксибутирата и фенибута.

Таким образом, производные ГАМК и ГОМК оказывали выраженное церебропротекторное действие при экспериментальной ишемии головного мозга, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерий, значимо увеличивая число выживших животных к 72-му часу после операции, превосходя действие препаратов сравнения: мексидола и магния сульфата при этом, не уступая в эффективности кавинтону. Производные ГАМК (соединения с лабораторными шифрами РГПУ-189, РГПУ-151, РГПУ-152), а также лития и магния оксибутираты проявили выраженное противогипоксическое действие на моделях нормобарической гипоксии с гиперкапнией и гемической гипоксии, значимо увеличивая время до наступления апноэ, превосходя при этом препараты сравнения, не уступая по эффективности оксибутирату натрия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Волотова Е.В., Куркин Д.В., Тюренков И.Н., Литвинов А.А. Церебропротективное действие новых производных гамма-аминомасляной кислоты при острой ишемии головного мозга крыс // Вестник ВолгГМУ. – Волгоград, 2011. – №2. – С.72-75.
2. Воронина Т.А., Островская Р.У. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2000. – С.153-161.
3. Евсеева М.А., Евсеев А.В., Правдивцев В.А., Шабанов П.Д. Механизмы развития острой гипоксии и пути ее фармакологической коррекции // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – М., 2008. – Т. 6. №1. – С.3-25.
4. Зарубина И.В. Принципы фармакотерапии гипоксических состояний антигипоксантами – быстро действующими корректорами метаболизма // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – М., 2002. – Т. 1. №1. – С.19-28.
5. Лелевич В.В., Виночкина А.Г., Лелевич С.В. Современные представления об обмене  $\gamma$ -аминомасляной кислоты в головном мозге // Нейрохимия. – М., 2009. – Т. 2., №4. – С.275-281.
6. Новиков В.Е., Катунина Н.П. Фармакология и биохимия гипоксии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – М., 2002. – Т. 1. №2. – С.73-87.
7. Тюренков И.Н., Багметова В.В., Кривицкая А.Н. и др. Спектр психотропного действия некоторых солей и комбинаций фенибута с органическими кислотами // Экспериментальная и клиническая фармакология. – М., 2011. – Т. 74. №2. – С.3-7.

**Информация об авторах:** 400001, г. Волгоград, ул. Пугачевская, 3, ВолгГМУ, кафедра фармакологии и биофармации ФУВ, тел. (8442) 97-81-80, e-mail: fibfuv@mail.ru, Куркин Денис Владимирович – ассистент кафедры; Волотова Елена Владимировна – ассистент кафедры, к.м.н.; Литвинов Андрей Андреевич – соискатель кафедры; Бакулин Дмитрий Александрович – студент; Озеров Александр Александрович – заведующий кафедрой, д.м.н., профессор.

©ГОРБУНОВА Е.В., СИЗОВА И.Н., МАМЧУР С.Е., ЖУЧКОВА Е.А., МАМЧУР И.Н. – 2012  
УДК 616-084

### ПОКАЗАТЕЛИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ КАК КРИТЕРИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБУЧАЮЩЕЙ ПРОГРАММЫ У ПАЦИЕНТОВ С ПРОТЕЗИРОВАННЫМИ КЛАПАНАМИ СЕРДЦА

Елена Владимировна Горбунова, Ирина Николаевна Сизова, Сергей Евгеньевич Мамчур, Татьяна Юрьевна Сергеева, Елена Александровна Жучкова, Ирина Николаевна Мамчур (НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г.Кемерово, директор – д.м.н., профессор О.Л. Барбараш, отдел диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, зав.отд. – д.м.н. С.Е. Семенов)

**Резюме.** Оценивалось влияние обучающей программы на показатели центральной гемодинамики у пациентов с протезированными клапанами сердца по поводу недостаточности митрального клапана. В основную группу (n=65) вошли пациенты, прошедшие обучающую программу, в контрольную (n=74) – без обучения. Проводилось эхокардиографическое исследование до операции, через 3, 6 и 12 месяцев после кардиохирургического вмешательства. Обучающая программа, повышающая приверженность к лечению и информированность в вопросах профилактики протезного инфекционного эндокардита и осложнений антикоагулянтной терапии, способствовала уменьшению у пациентов клинических проявлений сердечной недостаточности и улучшению показателей центральной гемодинамики.

**Ключевые слова:** обучающая программа, протезированные клапаны сердца, эхокардиографическое исследование, центральная гемодинамика.

### THE CENTRAL HEMODYNAMICS PARAMETERS AS A CRITERION FOR EDUCATIONAL PROGRAM EFFECTIVENESS IN PATIENTS WITH PROSTHETIC HEART VALVES

E.V. Gorbunova, I.N. Sizova, S.E. Mamchur, T.Y. Sergeeva, E.A. Zhuchkova, I.N. Mamchur (Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases SB of RAMS, Kemerovo, Russia)

**Summary.** The influence of the educational program on the central haemodynamics in patients with prosthetic mitral heart valves was evaluated. 65 patients, who had had the training, constituted the main group. 74 patients, who did not take part in the training, formed the control group. Echocardiographic imaging was performed preoperatively and 3, 6 and 12 months after the surgery. The educational program, which aim was to increase a patient's compliance and awareness on the prevention of infectious prosthetic valve endocarditis and anticoagulant therapy complications, helped to reduce clinical signs of heart failure and improve central haemodynamics.

**Key words:** educational program, prosthetic heart valves, echocardiographic imaging, central haemodynamics.

В последние годы в деятельность лечебных учреждений все чаще внедряются так называемые «школы здоровья» – групповые образовательные программы для пациентов [8]. В настоящее время разработаны и внедрены обучающие программы для пациентов с различными заболеваниями сердечно-сосудистой системы [4-6,10].

В НИИ КПССЗ СО РАМН с апреля 2010 г. разработана и внедрена обучающая программа для пациентов с протезированными клапанами сердца, построенная на принципе преемственности амбулаторного и стационарного этапов ведения больных. Получены

данные, подтверждающие эффективность обучающей программы в повышении приверженности к лечению в результате улучшения информированности пациентов в вопросах профилактики протезного инфекционного эндокардита и осложнений антикоагулянтной терапии [2]. Однако не были изучены показатели центральной гемодинамики на фоне обучающей программы у пациентов с протезированными клапанами сердца.

Цель исследования – оценить показатели центральной гемодинамики как критерий эффективности обучающей программы у пациентов с протезированными клапанами сердца.



## Материалы и методы

В исследовании приняли участие пациенты (n=159) с протезированными клапанами сердца по поводу недостаточности митрального клапана. Пациентам прово-

Клиническая характеристика пациентов

Показатель	Группы сравнения	
	Основная (n=65)	Контрольная (n=74)
Возраст, лет	54,8 ± 5,1	55,1 ± 9,2
Пол	–	–
мужской	34(52%)	39(53%)
женский	31 (48%)	35 (47%)
Ревматическая болезнь сердца	23(35%)	27 (36%)
Инфекционный эндокардит	23(35%)	26(35%)
Синдром соединительнотканной дисплазии	19(30%)	21(29%)
Хроническая сердечная недостаточность (NYHA):	–	–
ФК III	42(65%)	47(64%)
ФК IV	23(35%)	27 (36%)
Фибрилляция предсердий	23(35%)	27(36%)
Протезированный клапан :	–	–
Биологический	36(55%)	40(54%)
Механический	29(45%)	34(46%)
Аннулопластика трикуспидального клапана	33(51%)	37(50%)
Тромбэктомия из левого предсердия	3(5%)	4(5%)

дилась стандартная медикаментозная терапия, включающая в себя ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента или блокаторы рецепторов к ангиотензину II, блокаторы бета-адренергических рецепторов, антагонисты альдостерона, диуретики, по показаниям назначались амиодарон или дигоксин. Всем пациентам назначался варфарин с учетом вида протезированного клапана сердца [3]. В основную группу (n=65) вошли пациенты, прошедшие школу пациентов с протезированными клапанами сердца, в контрольную (n=74) – без обучения, так как им проводилось хирургическое лечение до внедрения обучающей программы в нашем центре. Группы сравнения сопоставимы по клиническим характеристикам, представленным в таблице 1.

При обследовании оценивались клинические данные, толерантность к физической нагрузке – с помощью 6-минутного теста ходьбы [7]. Проводилось эхокардиографическое (ЭхоКГ) исследование с оценкой показателей гемодинамики и функции протезов клапанов сердца исходно – до операции, через 3, 6 и 12 месяцев после кардиохирургического вмешательства. Использовался эхокардиограф Vivid-7 Dimension (General Electric, США) с датчиком 2.5 МГц и синхронной регистрацией ЭКГ.

Рассчитывали стандартные размеры и объемы камер сердца [13], оценивали функцию протезов клапанов сердца. Определяли среднее и систолическое давление в легочной артерии [12] по максимальному градиенту регургитации на трикуспидальном клапане. Для исключения тромбоза левого предсердия проводили чреспищеводное эхокардиографическое исследование.

Обучающая программа включала групповые занятия по разработанной программе [2]. Первый урок обучающей программы проводился в стационаре за 3-5 дней до предстоящей операции, второй урок – после кардиохирургического лечения перед выпиской из стационара. Последующие три урока проводились на амбулаторном этапе. Через 1 и 3 месяца после выписки из стационара продолжалось обучение правилам назначения антикоагулянтной терапии и профилактики протезного эндокардита, проводилась коррекция психологического статуса пациентов. На заключительном уроке через 6 месяцев оценивался уровень знаний пациентов, вручался диплом об окончании школы.

Анализ данных проводился при помощи пакета Statistica 6.0. При статистической обработке количественных показателей рассчитывались среднее значе-

ние и его стандартная ошибка. Внутригрупповые различия оценивались с помощью критерия Вилкоксона, межгрупповые различия – по критерию Манна-Уитни. При оценке различий качественных показателей использовался  $\chi^2$  Пирсона. Критическим уровнем статистической значимости принимались 95% ( $p < 0,05$ ), при  $0,1 > p > 0,05$  выявлялась тенденция к различиям.

Таблица 1

## Результаты и обсуждение

При анализе полученных данных в группах сравнения выявлено уменьшение клинических проявлений хронической сердечной недостаточности (ХСН) после кардиохирургического лечения. При этом более значимые положительные результаты достигнуты на фоне обучающей программы, способствующей повышению приверженности к лечению (табл. 2.).

На фоне обучающей программы регистрировалось статистически значимое увеличение толерантности к физической нагрузке через 6 и 12 месяцев: дистанция шестиминутного теста ходьбы увеличилась с  $198,0 \pm 32,8$  до  $378,5 \pm 15,6$  ( $p < 0,05$ ) и  $405 \pm 18,3$  ( $p < 0,01$ ) метров, соответственно.

Не вызывает сомнения, что после успешного выполненного протезирования клапанов сердца у

Таблица 2

Динамика проявлений сердечной недостаточности

Группы сравнения	Функциональный класс ХСН (NYHA)			
	Исходно	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
Основная	3,35±0,3	2,63±0,3	2,05±0,7**	1,56±0,5**
Контрольная	3,33±0,2	2,62±0,6	2,23±0,4*	1,84±0,6*

Примечание: \* – статистическая значимость внутригрупповых различий ( $p < 0,05$ ), \*\* – статистическая значимость внутригрупповых различий ( $p < 0,01$ ) в сравнении с исходными результатами.

пациентов в послеоперационном периоде сохраняются структурные изменения миокарда [11]. И только адекватная медикаментозная терапия способствует обратному ремоделированию миокарда [7].

По данным литературы [9], в качестве критерия оценки эффективности обучающей программы могут быть использованы не только клинические, но и эхокардиографические характеристики. Результаты проведенного анализа показателей центральной гемодинамики с помощью ЭхоКГ подтверждали эффективность обучающей программы для пациентов с протезированными клапанами сердца. В таблице 3 представлены показатели, статистически значимо различающиеся в тех или иных контрольных точках за период наблюдения.

В группах сравнения до операции значения КДР ЛЖ статистически значимо не различались. В основной группе на фоне обучения через 6 месяцев имелась тенденция к уменьшению КДР ЛЖ, через 12 месяцев выявлено статистически значимое уменьшение КДР ЛЖ при тенденции к уменьшению КДО ЛЖ, свидетельствующему о процессах обратного ремоделирования миокарда левого желудочка.

На фоне обучающей программы регистрировалось уменьшение ПЗР ЛП и объема ЛП через 6 и 12 месяцев ( $p < 0,05$ ). Имелась тенденция к уменьшению данных показателей и в контрольной группе больных. В основной группе при проведении обучения выявлено уменьшение ДЛАСис и ДЛАСред через 6 и 12 месяцев ( $p < 0,05$ ), в контрольной уменьшение давления в малом круге кровообращения регистрировалось только через 12 месяцев наблюдения ( $p < 0,05$ ).

Анализ полученных данных свидетельствует, что в группе пациентов, участвовавших в обучающей программе, способствующей повышению привержен-

Таблица 3

Динамика показателей центральной гемодинамики

Показатели	Сроки исследования	Группы сравнения		p<
		Основная (n=65)	Контрольная (n=74)	
КДР ЛЖ, мм	1	60±4,6	58±2,9	0,2
	2	55±5,2	54±4,7	0,4
	3	50±6,4	52±5,5	0,06
	4	48±3,9*	50±5,8	0,05
КДО ЛЖ, мл	1	171±23	172±34	0,3
	2	168±31	167±45	0,4
	3	165±48	166±58	0,1
	4	160±86	165±75	0,06
ПЗР ЛП, мм	1	52±5,8	51±4,9	0,3
	2	51±3,2	50±5,5	0,08
	3	45±8,5*	48±6,9	0,05
	4	43±7,5*	46±8,9	0,04
Объем ЛП, мл	1	119±43	118±51	0,3
	2	112±53	117±45	0,1
	3	95±39*	105±43	0,03
	4	88±63*	95±58	0,05
ДЛАСист, мм рт.ст.	1	35±4,8	34±5,1	0,4
	2	29±4,3	28±4,8	0,3
	3	24±2,6*	32±3,0	0,02
	4	21±3,0*	23±2,8*	0,06
ДЛАСред, мм рт.ст.	1	23±7,8	23±5,3	0,8
	2	22±6,3	22±4,9	0,4
	3	16±3,8*	21±3,9	0,03
	4	13±4,2*	14±7,8*	0,07

Примечания: КДР ЛЖ – конечнодиастолический размер левого желудочка, КДО ЛЖ – конечнодиастолический объем левого желудочка, ПЗР ЛП – передне-задний размер левого предсердия, объем ЛП – левого предсердия, ДЛАСист – систолическое давление в легочной артерии, ДЛАСред – среднее давление в легочной артерии. Сроки исследования: 1 – исходно, 2 – через 3 месяца, 3 – через 6 месяцев, 4 – через 12 месяцев; p – статистическая значимость межгрупповых различий, \* – статистическая значимость внутригрупповых различий (p<0,05) в сравнении с исходными результатами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Барбараш О.Л., Тавлуева Е.В., Кротиков Ю.В. и др. Применение энлаприла у больных после протезирования митрального клапана // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – Т. 2. №2. – С.57-64.
2. Горбунова Е.В., Горшкова Т.В., Макаров С.А. и др. Первые результаты внедрения обучающей программы для пациентов с протезированными клапанами сердца // Медицина в Кузбассе. – 2011. – №3. – С.35-39.
4. Журавлева И.Ю., Рутковская Н.В., Одаренко Ю.Н., Горбунова Е.В. Основные принципы ведения пациентов с искусственными клапанами сердца: методические рекомендации. – Кемерово, 2011. – 101 с.
4. Калягин А.Н., Иманова Н.Т. Организация сестринских школ для больных хронической сердечной недостаточностью // Альманах сестринского дела. – Иркутск, 2009. – №2. – С.22-28.
5. Калягин А.Н. Организация школ для больных с ревматическими пороками сердца // V Съезд ревматологов России: Сборник материалов Съезда, Москва, 23-27 марта 2009 г. – М., 2009. – С.50.
6. Муромкина А.В., Интякова Ю.В., Назарова О.А. Методика и эффективность обучения в «Школе для пациентов с фибрилляцией предсердий» // Вестник аритмологии. – 2008. – №52. – С.37-40.
7. Национальные клинические рекомендации. Сборник /

**Информация об авторах:** Горбунова Елена Владимировна – к.м.н., старший научный сотрудник, 650002, г.Кемерово, бр. Сосновый 6, тел. (3842) 643878, e-mail: e.v.gorbunova@yandex.ru; Сизова Ирина Николаевна – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: sizova\_i.n@mail.ru; Мамчур Сергей Евгеньевич – д.м.н., заведующий лабораторией, e-mail: sergei\_mamchur@mail.ru; Сергеева Татьяна Юрьевна – научный сотрудник, e-mail: iu.tanya2011@yandex.ru; Жучкова Елена Александровна – младший научный сотрудник, e-mail: e.a.2011@yandex.ru; Мамчур Ирина Николаевна – младший научный сотрудник, e-mail: irina\_mamchur@mail.ru

ности к лечению, выявлено статистически значимое улучшение показателей центральной гемодинамики. Регулярный и правильный прием лекарственных препаратов приводит к обратному ремоделированию миокарда после кардиохирургического вмешательства [1].

Следует отметить, что в обеих группах не выявлено ухудшения гемодинамических показателей, характеризующих функцию искусственных клапанов сердца. У всех пациентов отсутствовали тромбозы клапанов. Однако у пациентов без обучения чаще (p<0,03), чем в основной группе, встречался феномен спонтанного эхоконтрастирования: у 11 (15%) и 2(3%) пациентов, соответственно. Протезный инфекционный эндокардит зарегистрирован у одного (1,5%) пациента в основной группе и у 3 (4%) пациентов – в контрольной (p<0,04). Выполнение рекомендаций по приему варфарина и профилактике протезного инфекционного эндокардита на фоне обучающей программы предупреждает развитие неблагоприятных исходов [2].

Таким образом, программа обучения пациентов с протезированными клапанами сердца, благодаря повышению их приверженности к лечению и улучшению информированности в вопросах профилактики протезного инфекционного эндокардита и осложненной антикоагулянтной терапии, способствует улучшению не только клинических, но и гемодинамических показателей, характеризующих процессы обратного ремоделирования миокарда и уменьшения давления в малом круге кровообращения. Эхокардиографический метод исследования сердца может использоваться в оценке эффективности обучающей программы.

Под ред. Р.Г. Оганова. – 3-е издание. – М.: Силиция-Полиграф, 2010. – 592 с.

8. Оганов Р.Г., Калинина А.М., Поздняков Ю.М. Организация школ здоровья в первичном звене здравоохранения. Организационно-методическое письмо Минздрава РФ. – М., 2002. – 30 с.
9. Потапов А.П., Криночкин Д.В., Зольникова Н.Е., Малишевский М.В. Оценка эффективности школ здоровья для пациентов с ХСН: возможность использования методов функциональной диагностики // Сердечная недостаточность. – 2011. – Т. 12. № 2(64). – С.91-96.
10. Ушакова С.Е., Шутемова Е.А., Кодряну Л.И. и др. Эффективность различных методов терапевтического обучения больных артериальной гипертензией // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. – 2006. – №2. – С.40-44.
11. Boucher C.A., Bingham J.B., Osbakken M.D., et al. Early changes in left ventricular size and function after correction of left ventricular volume overload // Am. J. Cardiol. – 1981. – Vol. 47. – P.991-1004.
12. Kitabatake A., Michitochi M.D., Masato M.D. Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by a pulsed Doppler technique // Circulation. – 1983. – Vol. 68. – P.302-309.
13. Teichholz L.E., Kreulen T., Herman M.V. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlation in the presence or absence of asynergy // Am. J. Cardiol. – 1976. – Vol. 37. – P.7-11.

## ЗАВИСИМОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОФЛОРЫ БИОЦЕНОЗОВ И ЕЁ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У КРЫС ОТ СПОСОБА ВВЕДЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЦЕФТРИАКСОНА

Павел Вениаминович Попов, Борис Яковлевич Сыропятов, Татьяна Фёдоровна Одегова  
(Пермская государственная фармацевтическая академия, ректор – д.ф.н., проф. Т.Ф. Одегова,  
кафедра физиологии и патологии, зав. – д.м.н., проф. Б.Я. Сыропятов,  
кафедра микробиологии, зав. – д.ф.н., проф. Т.Ф. Одегова)

**Резюме.** Постоянно развивающаяся антибиотикорезистентность микрофлоры заставляет изобретать и внедрять в практическую медицину всё новые и новые противомикробные препараты. В этой гонке нет перспектив. В данной работе изучена зависимость изменений микрофлоры биоценозов и её резистентности у крыс от способа введения и длительности применения цефтриаксона. При различных способах введения цефтриаксона в максимальной концентрации подопытным животным антибиотикорезистентность изучаемых биоценозов формируется в различной степени и сроки. Ещё одним достоинством лимфотропной химиотерапии является профилактика развития резистентности микрофлоры, и, следовательно, предупреждение развития степени дисбиозов и их тяжести последствий, особенно отдалённых биоценозов.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, биоценоз, дисбиоз, лимфотропная химиотерапия.

## THE EFFECT OF THE METHOD OF DRUG ADMINISTRATION AND DURATION OF CEFTRIAXONE ON THE CHANGES IN BIOCENOSES' MICROFLORA AND ITS RESISTANCE IN RATS

P.V. Popov, B.Ya. Syropyatov, T.F. Odegova  
(Perm State Pharmaceutical Academy)

**Summary.** The ever-evolving resistance of the microflora to antibiotics is the cause of invention and introduction of the more and more new antimicrobial agents into medical practice. This race still has no prospects. In this paper we study the dependence of the changes in microflora biocenoses and their resistance in rats on the method of drug administration and duration of ceftriaxone. With the various methods of ceftriaxone infusion at maximum concentration in test animals, the resistance to antibiotics in the studied biocenoses has been formed in varying degrees and in different terms. One more advantage of the lymphotropic chemotherapy is the prevention of the development of resistant microorganisms, particularly in remote biocenoses, and thus preventing the progress of high degree dysbiosis and the severity of its consequences.

**Key words:** antibiotic resistance, biocenosis, dysbiosis, lymphotropic chemotherapy.

Открытие антибиотиков явилось революцией в медицине, казалось, что болезни с микробной этиологией полностью будут побеждены. Но как показала действительность, резистентность микрофлоры резко снижает лечебный эффект антибиотиков [1,5,6]. В этом противостоянии большая роль принадлежит профилактике развития резистентности и одним из направлений этого, является широкое внедрение антибиотикопрофилактики [4]. Но её влияние на микрофлору до сих пор дискутируется, фундаментальные научные данные скудны, у практических врачей нет единого мнения о безопасности и эффективности антибиотикопрофилактики [3]. При классической антибиотикопрофилактике препарат вводят один раз максимум в течение одних суток, классическим способом. Но лекарства возможно вводить и лимфотропно регионально, при этом в лимфатическом регионе, где будет оперативное вмешательство, длительно сохраняется высокая концентрация препаратов, что имеет большое преимущество перед стандартной антибиотикопрофилактикой. Как при этом изменяется микрофлора региональных отдалённых биоценозов и её резистентность, неизвестно, данных в литературе нет [2].

Цель работы: изучить зависимость изменений микрофлоры биоценозов и её резистентности у крыс от способа введения и длительности применения цефтриаксона, доказать, что лимфотропное введение антибиотика в эксперименте отодвигает сроки и тяжесть развития резистентности и дисбиозов, особенно в отдалённых биоценозах.

### Материалы и методы

Объектом исследования были белые крысы-самцы линии Вистар, массой 100-110 г. Животные содержались в условиях вивария, регламентируемых приказом Минздрава СССР №1179 от 10.10.1983 г. Опыты проводили в соответствии с приказами Минздрава СССР №755 от 12.09.1977 г. и №701 от 27.07.1978 г. «Об обеспе-

чении принципов гуманного обращения с животными».

Все животные были разделены на три серии по 5 групп, в каждой группе – 6 животных. Номер группы в каждой серии соответствовал продолжительности курса введения антибиотика, а номер серии зависел от способа введения препарата.

В начале эксперимента у всех животных брались мазки из следующих областей: перианальная, ротовая, левый и правый наружные слуховые проходы для определения изначального состояния их микрофлоры и резистентности ее к цефтриаксону. Это осуществлялось следующим образом: стерильный шпатель после мазка опускали в пробирку с десятью миллилитрами мясопептонного бульона на один час при комнатной температуре, далее среду разливали по пять миллилитров в две пробирки. В одну из них добавляли цефтриаксон из расчёта 50 мг/л для определения резистентности, затем обе пробирки от каждого животного помещали на одни сутки в термостат при температуре 35,5°С. Далее всем животным I серии внутримышечно вводили цефтриаксон в дозе 50 мг/кг/сутки. Животным II серии вводили цефтриаксон в дозе 50 мг/кг/сутки лимфотропно в переднюю стопу, животным третьей серии цефтриаксон вводили лимфотропно в заднюю стопу [2]. Цефтриаксон удобен для эксперимента, т.к. его можно вводить один раз в сутки, данная концентрация является максимально допустимой, выводится с мочой и жёлчью, кишечная палочка разрушает его в неактивные, но достаточно токсичные метаболиты.

На следующий день определяли оптическую плотность среды в пробирках относительно стерильного мясопептонного бульона в кюветах толщиной 3,3 мм, длиной волны 45 нм, при этих параметрах полученные показатели имели наименьшие отклонения. По степени изменения оптической плотности культивируемых жидких сред косвенно определяли концентрацию микробных тел, которые могут размножаться в мясопептонном бульоне. Данный способ удобен своей простотой, ско-

ростью и дешёвизной. В первой группе каждой серии делали мазки из указанных биоценозов и этих животных вывели из эксперимента. В оставшихся группах продолжали вводить антибиотик соответственно серии в той же концентрации.

На следующий день эти действия повторяли во второй группе всех серий, и так далее пять дней, т.е. во всех сериях и группах.

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью лицензионного пакета прикладных программ Statistica 6.0. (Stat Soft Inc, США). Применялись методы вариационной статистики: определение среднего арифметического, среднего квадратичного отклонения, стандартной ошибки среднего арифметического. Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах проводилась с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ , что соответствует 95% вероятности безошибочного прогноза.

### Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены в таблицах 1 и 2. Исходные концентрации микроорганизмов определили во всех исследуемых биоценозах трёх серий животных по пять групп в каждой, полученные данные статистически значимо сопоставимы ( $p > 0,05$ ).

Через 1 сутки после первого введения антибиотика в биоценозе перианальной области I и II серий кон-

На вторые сутки во всех биоценозах I серии отмечалось значительное снижение содержания микробных тел ( $p < 0,05$ ), что говорит об угнетении чувствительной и малочувствительной микрофлоры и об увеличении доли выделения цефтриаксона через кожу, т.к. в максимально допустимых концентрациях страдают выделительные функции печени и почек. Во II и III сериях животных концентрация микрофлоры региональных биоценозов уменьшалась более значительно, чем в отдалённых, что подтверждает различное накопление препарата при данном способе введения [2].

На третьи сутки в I серии наблюдалось ярко выраженное повышение концентрации микрофлоры во всех биоценозах ( $p < 0,05$ ), даже выше исходного уровня ( $p < 0,05$ ), это происходило за счёт развития дисбиозов, а именно, увеличения доли микроорганизмов нечувствительных к данному препарату, но способных культивироваться в этой среде. А во II и III сериях животных микрофлора всех биоценозов продолжала подавляться по выше приведенному принципу.

На четвёртые сутки I серии происходило повторное снижение количества микрофлоры ( $p < 0,05$ ) как за счёт нарастающей токсической дозы лекарства, так и за счёт преобладания развития грибковых дисбиозов, т.к. в 25% пробирок на стенках изнутри визуализировалась плесень. Животные с этого периода начинали на 10-15% больше употреблять воды и выделять каловые массы, обильно покрытые слизью. Во II и III сериях микрофлора всех биоценозов вела себя так же, как микрофлора I серии, но на третьи сутки. Таким образом, при лимфотропной антибиотикотерапии дисбиозы крыс развивались с суточным или двухсуточным опозданием, в зависимости от локализации биоценоза, даже при максимальных концентрациях вводимого антибиотика.

В I серии к концу пяток в биоценозе перианальной области продолжилось снижение количества микробных тел ( $p < 0,05$ ), что связано, в первую очередь, с развивающимся кишечным дисбактериозом грибкового характера. В остальных биоценозах продолжалось развитие дисбиозов как за счёт нечувствительной бактериальной флоры, так и за счёт грибов, т.е. происходило полное замещение микрофлоры, которая стала полностью нечувствительной к цефтриаксону. Другими словами, развилась резистентность не монокультуры, а всей микрофлоры биоценозов за счёт ликвидации той части микроорганизмов, которые были чувствительны к данному антибиотику. В остальных сериях во всех биоценозах микрофлора вела себя аналогично I серии, но намного меньшими перепадами концентраций и без видимых симптомов дисбиозов как у животных, так и в пробирках.

В таблице 2 представлена зависимость изменений резистентности микрофлоры биоценозов крыс при различных способах и сроках введения цефтриаксона. Исходный уровень резистентности микрофлоры биоценозов у всех серий животных был статистически значимо сопоставим ( $p > 0,05$ ). Через 1 сутки резистентность так же во всех биоценозах была одинакова, по сравнению с исходными данными она даже уменьшалась ( $p < 0,05$ ) за счёт максимального накопления антибиотика.

Зависимость изменений микрофлоры биоценозов крыс линии «Вистар» при различных способах и сроках введения цефтриаксона ( $M \pm m$ )

Локализация биоценоза	Способ введения	Исходные данные	Длительность введения (номер группы)				
			1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки
Перианальная область	I серия	0,317± 0,004	0,318± 0,008	0,142± 0,005*	0,395± 0,007*	0,335± 0,008*	0,138± 0,012*
	II серия	0,351± 0,012	0,317± 0,010	0,264± 0,007	0,306± 0,005	0,355± 0,006	0,311± 0,011
	III серия	0,327± 0,003	0,282± 0,006#	0,258± 0,005	0,150± 0,011#	0,246± 0,013#	0,192± 0,004#
Ротовая полость	I серия	0,283± 0,005	0,263± 0,003*	0,138± 0,002*	0,315± 0,008*	0,276± 0,012*	0,307± 0,012*
	II серия	0,279± 0,005	0,234± 0,007	0,265± 0,014	0,234± 0,009	0,221± 0,003	0,296± 0,004
	III серия	0,291± 0,004	0,269± 0,008#	0,208± 0,005#	0,139± 0,003#	0,192± 0,002#	0,174± 0,003#
Левый наружный слуховой проход	I серия	0,215± 0,006	0,207± 0,004*	0,141± 0,003*	0,265± 0,007*	0,159± 0,01*	0,152± 0,006
	II серия	0,217± 0,005	0,210± 0,007	0,148± 0,005	0,113± 0,003	0,226± 0,005	0,169± 0,008
	III серия	0,216± 0,007	0,211± 0,007	0,288± 0,006#	0,123± 0,003	0,156± 0,007#	0,153± 0,003
Правый наружный слуховой проход	I серия	0,215± 0,005	0,198± 0,004*	0,121± 0,012*	0,254± 0,009*	0,138± 0,014*	0,169± 0,004*
	II серия	0,229± 0,003	0,202± 0,002	0,157± 0,005	0,138± 0,005	0,225± 0,006	0,181± 0,002
	III серия	0,214± 0,009	0,208± 0,004	0,273± 0,005#	0,110± 0,040#	0,180± 0,020#	0,165± 0,004#

Примечание: I – внутримышечное введение; II – лимфотропное введение в подушечку передней конечности; III – лимфотропное введение в подушечку задней конечности; \* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) между внутримышечным и лимфотропным введением; # – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) между II и III группами.

центрация микробных частиц не изменилась, т.к. выводимые метаболиты цефтриаксона неактивны. Но в III серии число микробных тел значимо уменьшилось ( $p < 0,05$ ), т.к. данный биоценоз является региональным относительно стопы и, следовательно, здесь накапливается большая концентрация препарата по лимфатической системе, а не через кишечник. В остальных регионах III серии отмечалось незначительное, но значимое снижение концентрации микрофлоры ( $p < 0,05$ ), в основном, за счёт чувствительной части микроорганизмов к этому антибиотику и незначительным его выделением через кожу.

Таблица 2

Зависимость изменений резистентности микрофлоры биоценозов крыс линии «Вистар» при различных способах и сроках введения цефтриаксона ( $M \pm m$ )

Локализация биоценоза	Способ введения	Исходные данные	Длительность введения (номер группы)				
			1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки
Перианальная область	I серия	-0,017± 0,001	-0,04± 0,002	0,029± 0,002	0,084± 0,005	0,074± 0,007	0,086± 0,006
	II серия	-0,019± 0,002	-0,025± 0,005	-0,022± 0,002*	0,028± 0,002*	0,061± 0,002	0,292± 0,008*
	III серия	-0,05± 0,008	-0,045± 0,001#	0,083± 0,002* #	0,083± 0,008#	0,085± 0,004#	0,144± 0,004* #
Ротовая полость	I серия	-0,018± 0,001	-0,038± 0,001	-0,003± 0,001	0,069± 0,002	0,067± 0,006	0,084± 0,005
	II серия	-0,018± 0,001	-0,02± 0,001	-0,015± 0,001	-0,012± 0,001*	-0,019± 0,001*	0,237± 0,023*
	III серия	-0,019± 0,001	-0,036± 0,004#	-0,012± 0,001	-0,013± 0,002*	-0,015± 0,003* #	0,047± 0,004* #
Левый наружный слуховой проход	I серия	-0,018± 0,001	-0,042± 0,002	-0,019± 0,001	0,041± 0,002	0,044± 0,002	0,09± 0,007
	II серия	-0,017± 0,001	-0,042± 0,002	-0,022± 0,001	-0,017± 0,001*	-0,015± 0,002*	0,095± 0,005
	III серия	-0,018± 0,001	-0,022± 0,004#	-0,014± 0,001#	-0,01± 0,001* #	-0,008± 0,001* #	0,047± 0,004* #
Правый наружный слуховой проход	I серия	-0,018± 0,001	-0,04± 0,001	-0,019± 0,002	0,041± 0,001	0,049± 0,002	0,086± 0,009
	II серия	-0,017± 0,001	-0,035± 0,003	-0,023± 0,002	-0,019± 0,001*	-0,019± 0,001*	0,095± 0,019
	III серия	-0,017± 0,001	-0,025± 0,004#	-0,014± 0,002#	-0,011± 0,001* #	-0,011± 0,002* #	0,048± 0,002* #

Примечание: I – внутримышечное введение; II – лимфотропное введение в подушечку передней конечности; III – лимфотропное введение в подушечку задней конечности; \* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) между внутримышечным и лимфотропным введением; # – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) между II и III группами.

Через двое суток в I серии животных, которым цефтриаксон вводили внутримышечно, резистентность начинала нарастать ( $p < 0,05$ ), более всего в биоценозе перианальной области, это связано с общим уменьшением концентрации микробных тел, чувствительных к этому препарату. В III серии данные аналогичны второй, кро-

ме резистентности биоценоза перианальной области ( $p < 0,05$ ), этому способствуют лимфотропное введение препарата и региональное расположение данного биоценоза.

Далее в I серии на протяжении всего эксперимента наблюдалась общая тенденция медленного нарастания резистентности всех биоценозов, с максимальным значением на пятые сутки ( $p < 0,05$ ). Резистентность микрофлоры II экспериментальной серии на третьи сутки начинала нарастать только в перианальной области из-за развивающегося дисбиоза, в остальных биоценозах это наблюдалось на пятые сутки ( $p < 0,05$ ). В III серии отмечалась аналогичная картина.

Лимфотропный способ введения цефтриаксона даже в максимальных дозах отодвигает сроки развития резистентности биоценозов и, следовательно, уменьшает тяжесть дисбиозов и их последствий. При лимфотропной терапии данные явления менее выражены в более отдалённых биоценозах относительно места введения. Это доказывает новые преимущества данной терапии в эксперименте, если патологический очаг располагается в одном или в соседних лимфатических регионах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антибактериальные лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов. – М.: Медицина, 2004. – С.55-71.
2. Левин Ю.М. Эндозоологическая медицина и эпидемиологическая терапия. Новые принципы и методы. – М.: Щербинская типография, 2000. – 344 с.
3. Сидоренко С.В. Антибактериальная терапия: кризис жанра или свет в конце тоннеля? // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 11. №18. – С.997-1001.
4. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиоте-

рапии. – М., 2002. – С.393-397.

5. Дехнич А.В., Эйдельштейн И.А., Нарезкина А.Д. и др. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования // Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4. №4. – С.325-336.

6. Strachounski L.S., Kozlov R.S., Appelbaum P.C., et al. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study // Clin Microbiol Infect. – 2006. – №12. – P.853-866.

**Информация об авторах:** Попов Павел Вениаминович – к.м.н., e-mail: popov.pv@list.ru;  
Сыропятов Борис Яковлевич – заведующий кафедрой, д.м.н., профессор;  
Одегова Татьяна Федоровна – заведующий кафедрой, д.ф.н., профессор, ректор.

© КЛИНЫШКОВА Т.В., САМОСУДОВА И.Б., КАРАТЮК Т.И. – 2012  
УДК 618.146 – 006.2 – 07 + 578.827: 575.22

## РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА И ОЦЕНКИ ОНКОБЕЛКА E7 У БОЛЬНЫХ С ЦЕРВИКАЛЬНЫМ ПРЕДРАКОМ

Татьяна Владимировна Клинышкова<sup>1</sup>, Ирина Болеславовна Самосудова<sup>2</sup>, Татьяна Ивановна Каратюк<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Омская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. А.И. Новиков, кафедра акушерства и гинекологии ЦПК и ППС, зав. – д.м.н. Е.Н. Кравченко, <sup>2</sup>Женская консультация №1, Омск, гл. врач – Л.М. Ивлева)

**Резюме.** Обследовано 150 больных с цервикальной папилломавирусной инфекцией (ПВИ), 100 из которых с верифицированной цервикальной интраэпителиальной неоплазией легкой степени (CINI), цервикальной интраэпителиальной неоплазией умеренной и тяжелой степени (CINII-III), 50 больных с латентной формой инфекции и 30 здоровых женщин. Проведено кольпоскопия, цитологическое, гистологическое исследование, типирование вируса папилломы человека (ВПЧ), определение онкобелка E7 в цервикальных пробах. Установлено доминирование 16 типа ВПЧ при CINII-III (78,0%) и CINI (41,0%) ( $p < 0,01$ ) в форме моно и сочетанной инфекции. Относительное

преобладание других типов ВПЧ (31,45,52) характерно для CIN I, однако не имеет существенных различий с латентной формой ПВИ. Тяжесть цервикального предрака коррелирует с частотой выявления онкобелка E7 ВПЧ. Преобладание персистирующего характера течения ПВИ свойственно для CIN II-III в отличие от CIN I ( $p=0,09$ ) и латентной формы ПВИ ( $p<0,01$ ).

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, папилломавирусная инфекция, цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN), онкобелок E7.

## HUMAN PAPILLOMA VIRUS GENOTYPING RESULTS AND E7 ONCOPROTEIN ESTIMATION IN PATIENTS WITH CERVICAL PRECANCER

T.V. Klinyshkova<sup>1</sup>, I.B. Samosudova<sup>2</sup>, T.I. Karatyuk<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Omsk State Medical Academy; <sup>2</sup>Omsk Female consultation №1)

**Summary.** 150 patients with cervical papilloma virus infection (PVI) were examined, 100 from which were with verified cervical intraepithelial neoplasia CIN I, CIN I-III, 50 patients with latent infection form and 30 women served as a control. Colposcopy, cytological and histological investigation, HPV (PCR) typing, and E7 oncoprotein identification (IFA) in cervical samples were performed. 16 HPV in CIN I-III (78,0%) and CIN I (41,0%) ( $p<0,01$ ) in the form of mono and associated infection were found as prevailing. Relative prevalence of HPV other types (31,45,52) is characteristic for CIN I but has no essential distinctions with PVI latent form. Cervical precancer severity correlates with the frequency of HPV E7 oncoprotein revealing. Prevalence of persisting character of PVI course is peculiar for CIN I-III as compared with CIN I ( $p=0,09$ ) and PVI latent form ( $p<0,01$ ).

**Key words:** HPV, PVI, CIN, oncoprotein E7.

Учитывая высокий показатель заболеваемости раком шейки матки, сохраняя актуальность поиск информативных методов диагностики цервикальной патологии с целью своевременного и эффективного лечения. В этиологии цервикального рака общепризнанна вирусная концепция, согласно которой вирус папилломы человека (ВПЧ) обладает способностью вызывать предопухолевую и опухолевую трансформацию клеток экзоцервикса [8,14]. Все типы ВПЧ условно разделены на группы низкого и высокого риска развития злокачественных опухолей. Группу высокого канцерогенного риска (ВКР) составляют 15 онкогенных типов ВПЧ, самыми распространенными из которых являются 16 и 18 типы, на их долю приходится не менее 70% случаев цервикального рака в мире, а также генетически близко к ним расположенные 31, 33, 45 типы [1,5,9,10,15].

Клиника и исход папилломавирусной инфекции (ПВИ) зависят не только от типа вируса, но и от формы течения инфекции (транзиторное и постоянное носительство ВПЧ). Именно постоянное носительство в сочетании с рядом других факторов способно вызвать онкогенную трансформацию клеток [3,4,10].

Большинство случаев инфицирования заканчивается спонтанной элиминацией ВПЧ, в то время как длительное персистирование ВПЧ приводит к злокачественной трансформации клеток эпителия шейки матки [10,15].

Для повышения эффективности прогнозирования и профилактики рака шейки матки имеют значение не только методы, направленные на выявление ВПЧ, но и позволяющие установить тип ВПЧ и форму течения ПВИ.

Цель работы: определить частоту различных типов ВПЧ высокого онкогенного риска у больных с цервикальным предраком; оценить частоту персистирующей формы папилломавирусной инфекции на основании определения онкобелка E7 ВПЧ в зависимости от степени цервикального предрака.

### Материалы и методы

Исследование проводилось в два этапа: 1 этап – с целью ВПЧ-типирования больных с плоскоклеточными поражениями низкой степени (LSIL) и высокой степени (HSIL), 2 этап – для выявления персистирующей ВПЧ – инфекции и корреляции с онкобелком E7. На первом этапе обследовано 150 больных с цервикальной папилломавирусной инфекцией в возрасте от 19 до 45 лет. Среди 100 ВПЧ-положительных больных с верифицированной CIN выделено 2 основные группы больных: с LSIL (CIN I) – 50 больных (1 группа) и HSIL (CIN II-III) – 50

больных (2 группа). Больные с латентной формой ПВИ составили группу сравнения ( $n=50$ ); группа контроля включала 30 здоровых женщин.

Критерии включения больных в основные группы: репродуктивный возраст больных, наличие позитивного ВПЧ ВКР-теста, гистологически верифицированный диагноз CIN I, CIN II, CIN III. Критерии включения в группу сравнения: репродуктивный возраст, наличие позитивного ВПЧ ВКР-теста, отсутствие SIL (по данным цитологического исследования) и CIN (по данным гистологического исследования). Письменное информированное согласие больных являлось обязательным условием для участия в исследовании. Критерии исключения: возраст моложе 19 и старше 45 лет, беременность, наличие гормонозависимых заболеваний гениталий, острых и обострения хронических воспалительных заболеваний, преинвазивный и инвазивный рак шейки матки, отказ больной от участия в исследовании.

Для второго этапа исследования обследовано 78 больных с цервикальной папилломавирусной инфекцией (ВПЧ 16 и 18 типа). Среди 58 ВПЧ-положительных больных с верифицированной CIN выделено 2 основные группы больных: с CIN I – 28 больных (1 группа), CIN II-III – 30 больных (2 группа), в группу сравнения отобраны больные с латентной формой ПВИ ( $n=20$ ); в группу контроля – 19 здоровых женщин.

Комплексное обследование включало кольпоскопическое, цитологическое исследование (традиционный метод и метод жидкостной цитологии) с интерпретацией результатов по системе Betesda (2001), гистологическое исследование, детекцию ВПЧ высокого онкогенного риска с типированием посредством ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией (тест-система «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип- FL»). При обнаружении ДНК ВПЧ 16 и (или) 18 типа проводилось определение онкобелка E7 в цервикальных пробах методом ИФА (тест-система «E7 – ВПЧ – 16/18 – Диагност», Москва).

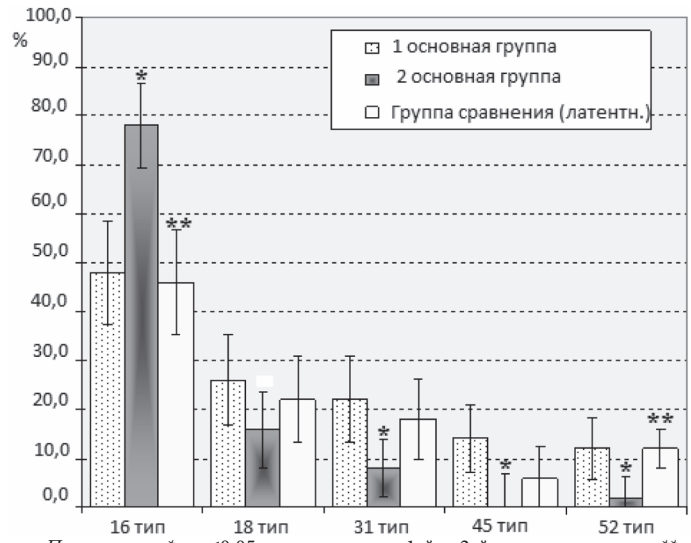
Для обработки полученных данных использовались статистические методы (точный критерий Фишера, информационная статистика Кульбака, корреляционный анализ Спирмена). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$ .

### Результаты и обсуждение

На первом этапе при ВПЧ-типировании у всех больных с SIL и женщин группы сравнения ( $n=150$ ) выявлены ВПЧ высокого канцерогенного риска. Средний возраст ( $M\pm\sigma$ ) женщин исследуемых групп составил  $26,4\pm 6,13$  лет: в 1 группе  $24,9\pm 3,77$  лет, во 2 –  $29,1\pm 7,22$

лет, в группе сравнения – 25,7±5,63 лет, в группе контроля – 25,9±6,97 лет.

Установлено преобладание 16 и 18 типа ВПЧ относительно других типов (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) во всех группах (рис. 1). Сравнительный анализ позво-



Примечание: \* -  $p < 0,05$  при сравнении 1-й и 2-й основных групп, \*\* -  $p < 0,05$  - при сравнении 2-й основной и группы сравнения.  
Рис. 1. Наиболее распространенные типы ВПЧ у больных с CIN.

лил установить преобладание 16 типа ВПЧ у больных 2 группы относительно больных 1 группы (78,0±5,86% против 48,0±7,07% случаев) ( $\phi=0,0965$ ,  $p=0,002$ ) и относительно женщин группы сравнения (46,0±7,05%) ( $\phi=0,1087$ ,  $p=0,0009$ ). Другие типы ВПЧ ВКР доминировали в 1 группе в отличие от 2-й: 31 тип ( $\phi=0,0384$ ,  $p=0,045$ ), 45 тип ( $\phi=0,0753$ ,  $p=0,006$ ), 52 тип ( $\phi=0,0384$ ,  $p=0,05$ ). По другим типам ВПЧ ВКР статистически значимых различий не получено.

Во всех исследуемых группах ВПЧ 16 типа был выявлен как в форме моноинфекции, так и в сочетании с другими типами ВПЧ ВКР. Обращало внимание, что во 2-й основной группе отмечалась тенденция к более частому выявлению ВПЧ 16 типа в форме моноинфекции, чем в сочетании с другими типами ВПЧ ВКР (64,1% против 35,9%), что имело противоположную направленность для группы сравнения (рис. 2). Статистически значимых различий между группами по частоте моно- и сочетанной инфекции не получено ( $2I=5,12$ ;  $p > 0,05$ ).

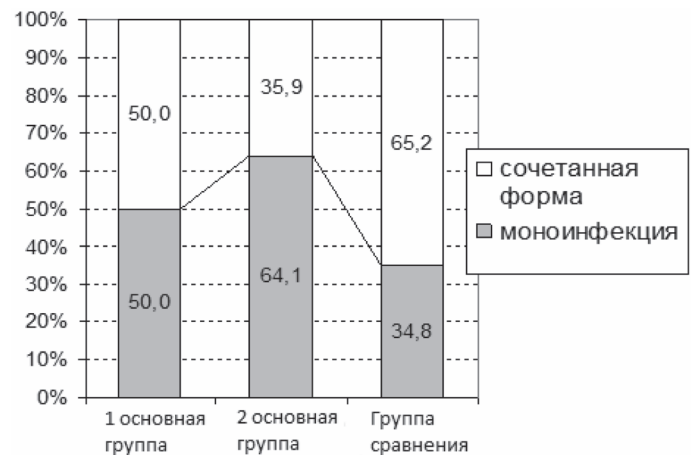


Рис. 2. Частота вариантов моно- и сочетанной инфекции ВПЧ 16 типа при CIN.

Итак, при цервикальном предраке установлены статистически значимые различия по результатам генотипирования в зависимости от степени поражения. При

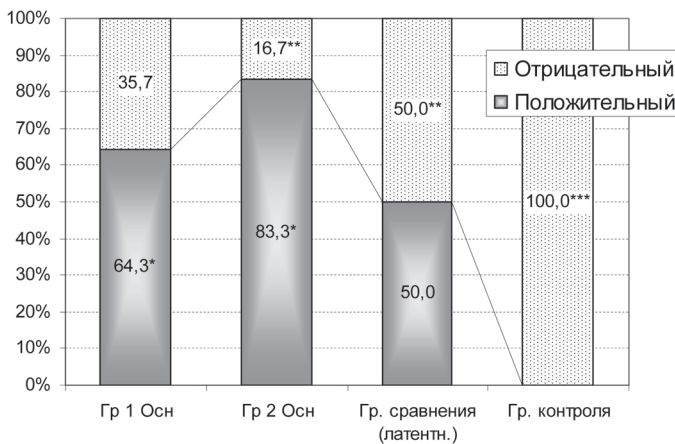
HSIL 16 тип ВПЧ встречался достоверно чаще, чем при LSIL и латентной инфекции; при LSIL частота выявления 31,45,52 типов доминировала в сравнении с HSIL.

Мнения по результатам генотипирования ВПЧ разноречивы. По данным зарубежных авторов [11,13,14], различные типы ВПЧ ВКР встречаются с различной частотой у женщин разных стран, в то же время, 16 тип ВПЧ является доминирующим у больных с выраженной степенью цервикальных поражений. Полученные нами данные по распространенности 16 типа ВПЧ при CINII-III согласуются с общепринятыми [2,6,8,14]. По данным М.В. Гавриковой (2010), для CINII-III характерно разнообразие онкогенных вирусных типов, доминирующим среди которых является 16 тип ВПЧ (68,2%) и реже встречающиеся 31 (23,6%), 33 (6,4%) и 18 (5,7%) типы. По данным Г.В. Костевич и И.А. Косенко (2010), установлено преобладание ВПЧ 16 типа у больных с CINIII в 75,6±6,4% случаев, по данным исследования О.Ю. Шипулиной и соавт. (2008), доля ВПЧ 16,18,45 типов при тяжелых плоскоклеточных поражениях составляет 71,2%. Во всех исследуемых нами группах 16 тип ВПЧ был выявлен в форме моно- и сочетанной инфекции с тенденцией к доминированию моноинфекции во 2-й группе в отличие от других групп. Полученные нами результаты согласуются с данными Ю.И. Подистова и соавт. (2006), установивших доминирование моноинфекции ВПЧ 16 типа при CIN тяжелой степени, в то время как смешанная ВПЧ-инфекция чаще регистрировалась при CIN легкой степени, по результатам других источников ведущим при тяжелых цервикальных поражениях является микст-вариант [3,7]. По данным Н.П. Евстигнеевой (2007), при персистирующем течении ПВИ микстинфицирование регистрируется в 6,5 раз чаще (54,4%) в сравнении с транзитной ПВИ (8,3%).

На втором этапе исследования больным с цервикальным предраком, латентной формой ПВИ и группы контроля проводилось исследование на онкобелок E7 методом ИФА ( $n=78$ ). Критерием включения при исследовании экспрессии онкобелка E7 в цервикальных пробах больных с SIL явилось инфицирование ВПЧ 16 и/или 18 типом. Онкобелок E7 в сравниваемых группах определялся с различной частотой ( $2I=41,38$ ;  $p < 0,001$ ). При детализации различий установлено: у больных с ВПЧ-ассоциированными плоскоклеточными поражениями позитивный тест на наличие E7 отмечен в 1-й (64,3±9,06%) и 2-й (83,3±6,80%) группах, что было статистически значимо в сравнении с группой контроля ( $p < 0,001$ ), в которой наблюдались исключительно негативные результаты. Выявлено, что у каждой второй больной из группы сравнения подтверждено наличие E7 в сравнении с группой контроля ( $p=0,003$ ). Проведен сравнительный анализ латентной и клинической формы ПВИ. Нами не установлены различия по частоте обнаружения E7 при сравнении основных групп больных ( $p=0,09$ ). Однако, если в 1-й основной группе повышение частоты E7 относительно группы сравнения не являлось статистически значимым, то во 2-й основной группе преобладание E7 носило значимый характер ( $p=0,01$ ) (рис. 3).

При проведении корреляционного анализа по Спирмену установлена прямая средней силы статистически значимая корреляционная связь между степенью CIN и онкобелком E7 ( $r_s=+0,45$ ,  $p < 0,001$ ).

Итак, для больных с ВПЧ-ассоциированной CINII-III степени характерна более высокая частота наличия онкобелка E7, чем для инфицированных больных с легкой степенью плоскоклеточного интраэпителиального поражения и латентной инфекцией, что свидетельствует о более частом персистирующем течении ПВИ при высокой степени цервикального поражения.



Примечание: \*  $p=0,09$  при сравнении 1-й и 2-й основных групп, \*\*  $p=0,01$  при сравнении 2-й основной группы и группы сравнения, \*\*\*  $p<0,01$  при сравнении группы контроля с группами 1-й, 2-й и группой сравнения.

Рис. 3. Частота определения онкобелка E7 ВПЧ 16/18 типа у больных с CIN.

Полученные данные согласуются с данными других исследователей, установивших повышение экспрессии онкобелка E7 у женщин с CIN, более выраженное

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аполихина И.А., Денисова Е.Д. Папилломавирусная инфекция гениталий: актуальная проблема современной гинекологии и пути ее решения // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2007. – Т. 6. №6. – С.70-75.
2. Гаврикова М.В. Роль количественного тестирования вируса папилломы человека в диагностике и постлечебном наблюдении цервикальных интраэпителиальных поражений высокой степени тяжести: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010. – 23 с.
3. Евстигнеева Н.П. Экспрессия онкобелка E7 у пациенток с урогенитальной папилломавирусной инфекцией // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2006. – №2. – С.4-6.
4. Киселев В. И., Свеишиков П.Г., Барановский П.М. и др. Онкобелок E7 вируса папилломы человека – новый маркер ранних стадий канцерогенеза. // Terra Medica. – 2011. – №1. – С.35-39.
5. Клинышкова Т.В., Каратюк Т.И., Самосудова И.Б. Клинико-микробиологические аспекты вирус папилломы человека-ассоциированных плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск, 2011. – Т. 102. №3. – С.85-87.
6. Костевич Г.В., Косенко И.А. Результаты ВПЧ-диагностики и экспрессии онкобелков E6/E7 ВПЧ 16 типа при доброкачественных и предраковых заболеваниях шейки матки // Онкологический журнал. – 2010. – Т.4. №1. – С.33-36.
7. Подистов Ю.И., Лактионов К.П., Петровичев Н.Н., Брюзгин В.В. Эпителиальные дисплазии шейки матки (диагностика и лечение). – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 136 с.
8. Шипулина О.Ю., Куевда Д.А., Насонова В.С. и др.

при CINIII и раке шейки матки [3,4,12]. У женщин с персистирующей ПВИ в сочетании с интраэпителиальной неоплазией и раком шейки матки экспрессия онкобелка E7 регистрируется наиболее часто (в 73,5% случаев), а персистирующее течение ПВИ сопровождается экспрессией онкобелка E7 в 10,4 раза чаще, чем при транзитном течении [3]. По нашим данным, различия в уровне E7 при транзитной и персистирующей ПВИ не столь выражены. Экспрессия онкобелка E7 среди больных с предраком увеличивается от  $66,7\pm 12,2\%$  при LSIL до  $82,4\pm 5,2\%$  при HSIL [6], что находит подтверждение в результатах проведенного нами исследования.

Таким образом, результаты ВПЧ-типирования свидетельствуют о различиях в распространенности отдельных типов ВПЧ в зависимости от степени цервикального предрака. Доминирование 16 типа ВПЧ наблюдается как при CINII-III (78,0%), так и при CIN I (41,0%) ( $p<0,01$ ) в форме моно и сочетанной инфекции. Относительное преобладание других типов ВПЧ (31,45,52) характерно для CIN I, однако не имеет существенных различий с латентной формой инфекции ( $p>0,05$ ). Тяжесть цервикального предрака коррелирует с частотой выявления онкобелка E7 ВПЧ. Преобладание персистирующего характера течения инфекции свойственно для CINII-III в отличие CIN I ( $p=0,09$ ) и латентной формы ПВИ ( $p<0,01$ ).

Генотипы ВПЧ в раке и предраковой патологии шейки матки. Материалы Международной научно-практической конференции «Профилактика рака шейки матки: взгляд в будущее». – М., 2008. – С.79-80.

9. Choi H.S., Kang W.D., Kim S.M., et al. Difference of HPV genotyping in cervical precancer and cancer. – Lisbon: Eurogin, 2011. – P.241.

10. Cuschieri K.S., Cubie H.A., Whitley M.W., et al. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study // J. Clin Pathol. – 2005. – Vol. 58. №9. – P.946-950.

11. Dobec M., Bannwart F., Kilgus S., et al. Human papillomavirus infection among women with cytological abnormalities in Switzerland investigated by an automated linear array genotyping test // J. Med Virol. – 2011. – Vol. 83. №8. – P.1370-1376.

12. Eehalt D., Pircher H., Dreier K., et al. Detection and quantification of HPV E7 oncoproteins in cervical smears. – Lisbon: Eurogin, 2011. – P.126.

13. Kedzia W., Józefiak A., Pruski D., et al. Human papilloma virus genotyping in women with CIN I // Ginekol Pol. – 2010. – Vol. 81. №9. – P.664-667.

14. Shahsiah R., Khademalhosseini M., Mehrdad N., et al. Human papillomavirus genotypes in Iranian patients with cervical cancer. // Pathol Res Pract. – 2011. – Vol. 207. №12. – P.754-757.

15. Stanley M. A practitioner's guide to understanding Immunity to human papillomavirus // US Obstetrics & Gynecology. – 2009. – Vol. 4. №1. – P.10-15.

16. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host – cell control in early events in carcinogenesis // J. Natl Cancer Inst. – 2000. – Vol. 92. №9. – P.690-698.

**Информация об авторах:** 644043, Омск-43, ул. Ленина, 12; тел. (3812) 23-02-93, e-mail: klin\_tatyana@mail.ru, Клинышкова Татьяна Владимировна – д.м.н., профессор; Самосудова Ирина Болеславовна – соискатель, врач-акушер-гинеколог; Каратюк Татьяна Ивановна – к.м.н., ассистент кафедры

#### ПРИМЕНЕНИЯ ЛИГАНДА TSP0 ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Ирина Алексеевна Савченко, Татьяна Геннадьевна Рукша

(Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов, кафедра патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова, зав. – д.м.н. Т.Г. Рукша)



**Резюме.** Целью данного исследования была оценка возможности применения лиганда TsPO для коррекции изменений, вызванных воздействием ультрафиолетового излучения. Исследование выполнено с помощью иммуногистохимического метода, а также лазерной доплероскопической флоуметрии. Выявлено, что после воздействия ультрафиолетового излучения при применении диазепама показатели TsPO, клеточной пролиферации, уровни микроциркуляции, а также морфологические изменения в дерме остаются на уровне здоровой кожи. Таким образом, диазепам посредством взаимодействия с TsPO реализует противовоспалительный эффект в коже, что может быть использовано для определения новых молекулярных мишеней для терапии состояний, вызванных воздействием ультрафиолетового излучения.

**Ключевые слова:** TsPO, диазепам, ультрафиолетовое излучение, воспаление.

## TSP0 LIGAND DIAZEPAM APPLICATION FOR CORRECTION OF THE CHANGES CAUSED BY INFLUENCE OF ULTRAVIOLET RADIATION

I.A. Savchenko, T.G. Ruksha

(Krasnoyarsk State Medical University named after V.F. Voino-Yasenetsky)

**Summary.** The estimation of application TsPO ligand for correction of the changes caused by influence of ultraviolet radiation was an objective of this research. The research has been executed by means of an immunohistochemical method, and also laser flowmetry. It has been established that after influence of ultraviolet radiation in application of a diazepam indicators TsPO, a cellular proliferation, microcirculation levels, and also morphological changes in a derma remain at level of a healthy skin. Thus, the diazepam by means of interaction with TsPO realizes antiinflammatory effect in a skin, that can be used for definition of new molecular targets for therapy of the conditions caused by influence of ultra-violet radiation.

**Key words:** TsPO, diazepam, ultraviolet radiation, inflammation.

Сохраняющиеся высокими уровни заболеваемости злокачественными новообразованиями кожи обуславливают необходимость дальнейшего исследования эффектов ультрафиолетового излучения, поиска модуляторов хода воспалительного процесса, а также маркеров развития опухолевого процесса в коже.

TsPO (18 kDa translocator protein), ранее известный как периферический бензодиазепиновый рецептор, является фоточувствительным белком, экспрессия которого выявлена в клетках эпидермиса, дермы [5]. Показано, что через 30 минут после воздействия УФ-излучения из двух молекул тирозина двух мономеров посредством образования ковалентных связей происходит образование полимеров TsPO [3].

Известно, что TsPO участвует в регуляции ряда биологических функций посредством связывания с лигандами [4,6]. Лигандами TsPO являются Ro 5-4864 (4-хлордиазепам), РК 11195 (производное изохинолина карбоксамида, небензодиазепиновой природы), аллидем (имидазопиридин), FGIN-1-27 (2-арил-3-индолацетамид), бензодиазепины.

Диазепам рассматривается традиционно как анксиолитическое средство бензодиазепинового ряда. Оказывает седативно-снотворное, противосудорожное и центральное миорелаксирующее действие. Механизм действия диазепама обусловлен стимуляцией бензодиазепиновых рецепторов супрамолекулярного ГАМК-бензодиазепин-хлорионофор рецепторного комплекса, приводящей к усилению ингибирующего действия ГАМК (гамма-аминомасляной кислоты) на передачу нервных импульсов. Стимулирует бензодиазепиновые рецепторы, расположенные в аллостерическом центре постсинаптических ГАМК-рецепторов восходящей активирующей ретикулярной формации ствола мозга и вставочных нейронов боковых рогов спинного мозга; уменьшает возбудимость подкорковых структур головного мозга (лимбическая система, таламус, гипоталамус), тормозит полисинаптические спинальные рефлексы [1]. Однако известно, что помимо связывания с бензодиазепиновыми рецепторами центрального типа, диазепам также взаимодействует с периферическими рецепторами в периферических тканях – с TsPO практически с одинаковой афинностью [4]. Однако при этом эффекты TsPO в коже, в том числе модулируемые диазепамом, являются малоизученными. В дерматологической практике диазепам используется только в комплексной терапии при лечении заболеваний, сопровождающихся зудом.

В этой связи целью данного исследования была

оценка возможности применения лиганда TsPO для коррекции изменений, вызванных воздействием ультрафиолетового излучения.

### Материалы и методы

Моделирование действия УФ-излучения *in vivo* осуществлялось на белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в стандартных условиях вивария, массой 220-240 г, исследование выполнено с соблюдением правил гуманного обращения с животными. В качестве источника УФ-излучения использовалась лампа с длиной волны 240-400 нм. У животных в области предполагаемого воздействия УФ-излучения предварительно удалялся волосяной покров. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу Минздрава РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Было сформировано 2 группы (n=6 в каждой группе) и контрольная группа. Доза облучения составила 600 Дж/м<sup>2</sup>, причем облучению подвергались два участка кожи крысы с противоположных сторон. Один участок после этого подвергался лечению. Для опытной группы применяли 0,2% диазепам из расчета 0,15 мг/кг массы в виде мази. Лечение проводилось в течение трех дней: в день облучения, через 24 часа, через 48 часов. Взятие биопсии осуществлялось через 72 часа после облучения.

Взятие биопсии размером 1x1 см кожи у крыс проводилось под местной анестезией – 2% раствор лидокаина внутривенно из расчета 0,15 мг/кг веса животного. Биоптаты кожи фиксировались в 10% нейтральном забуференном формалине с последующей заливкой в парафин. В дальнейшем изготавливались гистологические срезы для иммуногистохимического исследования толщиной до 5 мкм.

В качестве маркера интенсивности клеточной пролиферации использовался PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток). Проводилось иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами к PCNA (Novocastra Lab. Ltd., UK) и TsPO (Trevigen Inc., USA) по стандартным методикам. Использовались биотинилированные вторичные антитела (BD Biosciences, USA) и диаминобензидин (BD Biosciences, USA) в качестве хромогена. Микроскопия производилась при увеличении в 600 раз с помощью микроскопа Olympus BX-41 с видеонасадкой Sanyo и компьютерной программы Infinity Software (Lumenera Corporation, Canada). Оценивалось число PCNA<sup>+</sup> и TsPO<sup>+</sup> клеток на 100 клеток эпидермиса.

В другой серии экспериментов гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Для каждой группы в дерме при увеличении в 600 раз с помощью микроскопа Olympus BX-41 с видеонасадкой Sanyo и компьютерной программы Infinity Software оценивались диаметр сосудов (с помощью окуляр-микрометра), уровень лимфоцитарной инфильтрации дермы, число дермальных капилляров в 10 полях зрения, после чего вычислялось среднее значение для каждого показателя. Количество PCNA<sup>+</sup> эндотелиальных клеток определялось в 10 полях зрения с последующим вычислением среднего значения.

Параллельно производилось измерение уровня перфузии с помощью анализатора лазерного микроциркуляции крови ЛАКК-02 (Россия) у всех групп через 24, 48 и 72 часа.

Статистическая обработка результатов осуществлялась по методу Т-критерия Манна-Уитни для непараметрических исследований, а также с помощью метода Крускала-Уоллиса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$  [2].

### Результаты и обсуждение

УФИ в дозе 600 Дж/м<sup>2</sup> (3 минимальных эритемных дозы) вызывало уменьшение экспрессии TsPO и PCNA по сравнению с контрольной группой ( $\alpha=0,01$ ) (табл. 1).

Таблица 1  
Уровни экспрессии TsPO и PCNA после воздействия диазепамом

	Контроль	УФИ	УФИ + диазепам
% PCNA+ клеток/100 клеток эпидермиса	14,1±4,2	4±0,9#	11±1,8*
% TsPO+ клеток/100 клеток эпидермиса	77,6±9,1	62±6,4#	69±5,7*#

Примечание: # – статистически значимо по отношению к контролю,  $\alpha=0,01$ ; \* – статистически значимо по отношению к УФИ,  $\alpha=0,01$ .

Диазепам индуцировал статистически значимое увеличение уровня TSPO по сравнению с группой, не подвергавшейся лечению. Уровень PCNA увеличивался по сравнению с группой, где выполнялось облучение кожи ультрафиолетовым излучением без диазепамом ( $\alpha=0,01$ ).

По данным доплерографической флоуметрии величина перфузии в нормальной коже составила 25,8±2,6 пф.ед. При измерении периферического кровообращения после облучения увеличивалась до 56,2±18,4 пф.ед. Наблюдалось статистически значимое снижение микроциркуляции до уровня контроля при использовании диазепамом через 24ч. (22±2,1 пф.ед.), 48ч. (28,5±4,6 пф.ед.) и 72 ч. (20,0±5,1 пф.ед.) после облучения ( $\alpha=0,05$ ) (табл. 2).

Средний диаметр сосудов дермы в 10 полях зрения в нормальной коже составил 15,3 мкм, число PCNA<sup>+</sup> клеток – 3,5 на 100 клеток эпидермиса, уровень периваскулярной инфильтрации лимфоцитами 5,9 на 10 полей зрения. Статистически значимое увеличение данных

параметров регистрировалось в группе, подвергшейся воздействию УФИ ( $\alpha=0,05$ ). В участках кожи, где применялся диазепам, данные показатели клеток оставались на уровне контроля ( $\alpha=0,05$ ).

Таблица 2  
Особенности морфологии сосудов дермы после воздействия УФИ и действия диазепамом

	Количество сосудов	D, мкм	PCNA+ в эндотелии	Лимфоциты в поле зрения
Контроль	3,7±1,2	15,3±3,4	3,5±0,4	5,9±0,6
УФИ	4,3±1,3	24,9±1,9*	4,9±0,5*	8,1±1,1*
УФИ+диазепам	4,3±0,6	17±3,3#	3,6±0,4#	5,9±1,9#

Примечание: \* – статистически значимо по отношению к контролю,  $\alpha=0,05$ ; # – статистически значимо по отношению к УФИ,  $\alpha=0,05$ .

Таким образом, в кератиноцитах крыс уровни TsPO и PCNA модулируются УФИ. В дозе 600 Дж/м<sup>2</sup> ультрафиолетовое излучение вызывало снижение экспрессии TsPO и PCNA. Как указывалось выше, ультрафиолетовое излучение с длиной волны 254 нм вызывает полимеризацию TsPO. Авторы полагают, что индуктором образования полимеров выступали активные формы кислорода, тем более что была обнаружена корреляция между их уровнем и степенью образования полимеров [2]. Таким образом, стоит предположить, что эффект ультрафиолетового излучения на экспрессию TsPO также связан с изменением конформации рецептора и может быть обусловлен повышением уровня активных форм кислорода в коже при воздействии ультрафиолетовым излучением. В таком случае, TsPO может являться мишенью для активных форм кислорода, под воздействием которых изменяется структура рецептора, его функциональная активность и, как следствие, интенсивность клеточной пролиферации. Можно предположить, что диазепам, связываясь с TsPO, препятствует изменению конформации рецептора в результате действия активных форм кислорода после УФИ, в результате чего TsPO, а следовательно, и PCNA остаются на уровне контроля.

Морфофункциональные изменения в дерме, в частности увеличение скорости кровотока, увеличение диаметра капилляров, лимфоцитарная инфильтрация дермы могут быть объяснены развитием воспалительного процесса в коже. Увеличение пролиферации эндотелиальных клеток, регистрируемое по изменению уровня экспрессии PCNA, свидетельствует об активации неангиогенеза, характерного также для воспаления. После облучения при применении лиганда TsPO диазепамом все данные показатели оставались на уровне контроля, что может свидетельствовать о подавлении развития воспаления в коже данным агентом.

Таким образом, можно предположить, что диазепам посредством взаимодействия с TsPO реализует противовоспалительный эффект в коже, нивелируя действие активных форм кислорода, возникающих в результате действия УФИ. Выявленные данные могут быть использованы для определения новых молекулярных мишеней для терапии состояний, вызванных воздействием УФИ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В., Булгакова А.С. Сравнительная оценка антистрессорной активности эпифизарного гормона мелатонина и диазепамом. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – М., 2007. – Т. 70. №6. – С.9-12.
2. Майборода А.А., Калягин А.Н., Зобнин Ю.В., Щербатых А.В. Современные подходы к подготовке оригинальной статьи в журнал медико-биологической направленности в свете концепции «доказательной медицины» // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2008. – Т. 76. №1. – С.5-8.
3. Delavoie F, Li H., Hardwick M., et al. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding //

Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – P.4506-4519.

4. Stoebner P.E., Carayon P., Penarier G. The expression of peripheral benzodiazepine receptors in human skin the relationship with epidermal cell differentiation // British Journal of Dermatology. – 1999. – Vol. 140. – P.1010-1016.

5. Stoebner P.E., Carayon P., Casellas P., Portier M., et al. Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of UV light-induced apoptosis // Cell Death Differ. – 2001. – Vol. 8. – P.747-753.

6. Veenman L., Papadopoulos V., Gavish M. Channel-like functions of the 18kDa translocator protein (TsPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response // Current Pharmaceutical Design. – 2007. – Vol. 13. – P.2385-2405.

Информация об авторах: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, 1; тел. (3912)283649; e-mail: irina\_savchenko2@mail.ru, Савченко Ирина Алексеевна — ассистент; Рукша Татьяна Геннадьевна — заведующий кафедрой, д.м.н.

# ЗДОРОВЬЕ, ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

© ТИХОНОВА Н.В., ПРИХОДЬКО Е.А., МАСЛЕННИКОВА С.А., ВАЗЕМИЛЛЕР О.А. – 2012  
УДК 618.179-053.7-084(571.51-201)

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОФИЛАКТИКЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ УЧЕНИЦ СТАРШИХ КЛАССОВ Г. КРАСНОЯРСКА

Наталья Владимировна Тихонова<sup>1</sup>, Елена Анатольевна Приходько<sup>2</sup>,  
Светлана Андреевна Масленникова<sup>3</sup>, Оксана Александровна Ваемиллер<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,  
ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов, кафедра общественного здоровья и здравоохранения с курсом ПО,  
зав. – к.м.н., доц. А.В. Шульмин)

**Резюме.** В статье приводится анализ эффективности проведенного лекционно-образовательного курса по вопросам репродуктивного поведения девушек 14-18 лет г. Красноярск. Исследование проводилось в сравнении с группой девушек, которым данный курс не проводился. Выявлено: в результате проведенных мероприятий наблюдается повышение уровня знаний в области личной гигиены, профилактики инфекций передаваемых половым путем, ранних беременностей, абортот и контрацепции. Даны рекомендации по оптимизации профилактической работы в сфере репродуктивного здоровья в данной возрастной группе девушек-подростков.

**Ключевые слова:** девушки-подростки, профилактика, репродуктивное здоровье, лекционно-образовательный курс.

## MODERN APPROACHES TO THE PREVENTION OF REPRODUCTIVE HEALTH DISTURBANCES IN SENIOR CLASS STUDENTS OF KRASNOYARSK

N.V. Tikhonova<sup>1</sup>, E.A. Prikhodko<sup>2</sup>, S.A. Maslennikova<sup>3</sup>, O.A. Vazemiller<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasensky)

**Summary.** The article is devoted to the analysis of the conducted lecture - educational course about the reproductive behavior of girls at the age of 14-18 in Krasnoyarsk. The research was conducted by comparison to the group of girls, who did not attend this course. As a result of the conducted measures it was found: an increase of level of knowledge in the area of the personal hygiene, prevention of sexually transmitted infections, early pregnancies, abortions and contraception. The recommendations for an optimization of preventive measures in the field of the reproductive behavior in this group of girls – teenagers were given.

**Key words:** girls-teenagers, prevention, reproductive health, lecture-educational courses.

В отечественной и зарубежной научной медицинской литературе все больше внимания уделяется медико-социальным факторам формирования репродуктивного здоровья и репродуктивного потенциала девушек подростков как будущих матерей.

В условиях социально-экономических и экологических проблем, здоровье подростков является наиболее чувствительным индикатором изменений, происходящих в окружающей среде и обществе, поэтому изучению состояния здоровья подрастающего поколения придается особая значимость. Особенно это касается репродуктивного здоровья девочек-подростков, представляющих собой ближайший репродуктивный, интеллектуальный, экономический, политический и культурный резерв общества [3,4,8].

Анализ показателей официальной статистики свидетельствует, что за период 1999-2008 гг. доля детей и подростков в возрасте 0-17 лет в общей структуре населения России снизилась на 22,3% (с 23,8% в 1999 г. до 18,5% в 2008 г.,  $p < 0,01$ ). При этом темп ее снижения имеет четкую тенденцию к прогрессу: в 1997-2000 гг. он составил 6,8%, в 2001-2004 гг. – 7,5%, в 2005-2008 гг. – 8,4%. Вместе с тем показатель общей заболеваемости на 100000 человек соответствующего возраста среди детей 0-14 лет вырос в 1,3 раза (со 176 в 1999 г. до 234 в 2008 г.,  $p < 0,05$ ), среди подростков – в 1,4 раза (со 144 в 1999 г. до 197 в 2008 г.,  $p < 0,05$ ). Число выпускниц школ, имеющих хронические болезни, к началу XXI в. возросло почти вдвое и составило 75-80%. В ходе всероссийской переписи населения России (2002 г.) было выявлено, что доля здоровых девочек и девушек в стране не превышает 6%. Это побуждает медицинскую науку ко всестороннему изучению аспектов проблемы охраны репродуктивного здоровья девушек-подростков с учетом предстоящего им материнства. Актуальность информационно-образовательной работы с подростками, несомненно, прежде всего потому, что в РФ доля абортот в возрастной группе до 19 лет в их общей структуре остается высокой. По-прежнему каждый одиннадцатый аборт (по данным Росстата, – 9,8% в 2009 г.) производится у женщин

до 19 лет, что существенно ухудшает прогноз качества репродуктивного здоровья и повышает риск смертности после абортот [5,7].

В связи с вышеизложенным, проведение исследований в отношении профилактики репродуктивного здоровья данной целевой группы представляет особую актуальность.

Цель работы: оценить эффективность проведения образовательных мероприятий в сфере репродуктивного здоровья и разработать рекомендации по оптимизации профилактической работы в сфере репродуктивного здоровья среди школьниц 14-18 лет г. Красноярск.

### Материалы и методы

Объект исследования – 84 школьницы 14-18 лет МБОУ «Общеобразовательное учреждение лицей №2» и МОУ «Средняя общеобразовательная школа с углубленным изучением отдельных предметов №5» г. Красноярск.

Для сравнительного анализа все девушки-подростки были разделены на две группы. В первую (основную) группу вошли 42 девушки МБОУ «Общеобразовательное учреждение лицей №2», которым был прочитан лекционно-образовательный курс по проблемам профилактики, сохранения и укрепления репродуктивного здоровья. Вторую группу (сравнения) составили 42 девушки МОУ «Средняя общеобразовательная школа с углубленным изучением отдельных предметов №5», с которыми не проводился данный курс.

Исследование проводилось на основе анонимного анкетирования и интервьюирования с октября 2010 г. по октябрь 2011 г. Перед началом исследования респонденты подписывали информированное согласие.

Показатели обработаны с помощью непараметрических методов статистики, представлены в виде средней арифметической и отклонения от средней, статистическая значимость результатов оценивалась с помощью критерия хи-квадрат. Критический уровень значимости при проверке статических гипотез  $p = 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Социально-гигиеническая характеристика опрошенных девушек показала, что средний возраст начала курения и употребления спиртных напитков в обеих группах  $14 \pm 0,4$  лет. Доля курящих девушек в лицее №2 – 24,0%, в школе №5 – 31,0% ( $p < 0,05$ ). Из числа всех опрошенных школьниц – 5,0% девушек лицея №2 и 7,0% школы №5 ответили, что употребляли наркотические препараты, фактором, способствующим приобщению к вредным привычкам, в 70,0% случаев является пример друзей.

В связи с современными стереотипами о внешности и фигуре, 55,0% девушек первой группы и 60,0% второй, используют различные виды диет, причем 10,0% из них – постоянно ( $p < 0,05$ ).

Важной характеристикой репродуктивного здоровья девушек является менструальная функция, средний возраст начала менструации –  $12,7 \pm 0,88$  лет, средняя продолжительность менструации – 5-6 дней, длительность менструального цикла – 26-30 дней. В настоящее время производители предлагают огромный ассортимент гигиенических средств, которые помогают девушке чувствовать себя максимально комфортно в критические дни. Среди проанкетированных девушек, наиболее предпочитаемым средствами гигиены являются прокладки: 88,0% – лицей №2, 90,0% – школа №5. Многие девушки, считают, что во время менструации необходимо ограничить все физические нагрузки, но по данным различных источников сказано, что если менструация не нарушает обычный жизненный ритм девушки, то занятия физической культурой способствуют более благоприятному протеканию таких дней: 41,0% девушек лицея №2 и 19,0% школы №5 не меняют свой образ жизни в критические дни.

Среди респондентов школы №5 92,8% знают, что такое менструальный календарь и только 45,2% используют его. В лицее №2 знают о существовании менструальных календарей и используют их 95,2% девушек, что свидетельствует об эффективности проведенного лекционно-образовательного курса среди девушек первой группы.

Средний возраст начала половой жизни школьниц –  $14,5 \pm 0,6$  лет, способствует раннему началу половой жизни не столько потребность, сколько любопытство и влияние

окружающих. Анализ эффективности показал, что прирост числа девушек, живущих половой жизнью, в лицее №2 после проведения образовательных занятий по репродуктивному здоровью, изменился незначительно и составил 18,0%, во второй группе – 69,0% ( $p < 0,05$ ). Основным средством контрацепции среди девушек, живущих половой жизнью, является презерватив, но 39,0% не отметили, какими средствами контрацепции они пользуются, таким образом, можно предположить, что они используют прерванный половой акт, таким образом подвергая свое репродуктивное здоровье ряду рисков. Респонденты второй группы из средств контрацепции знают лишь о таких, как презервативы – в 100,0% и гормональные препараты – в 35,0% случаев. После проведения лекционно-образовательного курса, кругозор девушек лицея №2 стал шире, и они ориентируются в следующих методах контрацепции: диафрагма – 71,0%, гормональное кольцо – 32,0%, контрацептивный пластырь – 56,0%, ВМС – 44,0%, КОК – 73,0%, презервативы – 100,0%.

В настоящее время актуальна проблема инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), поэтому важно знать насколько подрастающее поколение грамотно в данном вопросе. Среди анкетированных школы №5 знают о профилактике – 57,1%, а в лицее №2 – 97,6% ( $p < 0,05$ ).

Количество обращений респондентов обеих школ к гинекологу за исследуемый период представлено следующим образом: в 2010 году: до 1 раза – 26%, более 1 раза – 4%; в 2011 году – 35% и 8% соответственно. В основном девушки обеих групп обращались с целью профилактического осмотра.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствует о необходимости проведения подобных лекционно-образовательных курсов, т.к. большинство респондентов обеих групп: школа №5 и лицей №2 – в 66,6% и 88,1% соответственно, заинтересованы в дальнейшем проведении классных часов по профилактике, сохранении и укреплению репродуктивного здоровья. Это обусловлено получением новой информации в данной области на основе доверительного общения со студентами-медиками и возможностью задать интересующие их вопросы. Современные подходы к профилактике репродуктивного здоровья через повышение уровня образованности способствует сохранению и укреплению репродуктивного потенциала страны.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Захарова Т.Г. Гендерное поведение девушек-подростков и его влияние на репродуктивное здоровье // *Здравоохранение Российской Федерации*. – 2004. – №3. – С.49-51.
2. Кротин П.Н. Медико-социальная помощь в охране репродуктивного здоровья девочек - подростков // *Репродуктивное здоровье детей и подростков*. – 2006. – №4. – С.52-59.
3. Максименко Л.Л., Магуй Е.Д. Организация гинекологической помощи и состояние репродуктивного здоровья детей и подростков // *Здоровье как междисциплинарная проблема: Сборник научных трудов*. – Ставрополь, 2002. – С.92-93.
4. Поблинкова Е.И., Калягин А.Н., Рафальский В.В. и др. Итоги всероссийского многоцентрового исследования «Стереотипы поведения молодых женщин при развитии симптомов острого цистита» (проект «Сонар») в г. Иркутске // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. – 2006. – Т. 61. №3. – С.62-65.
5. Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Лебедева М.Г. и др. Девушки-подростки РФ: Современные тенденции формирования репродуктивного потенциала // *Сибирский медицинский журнал*. – Томск, 2010. – Т. 25. №4. – С.9-13.

6. Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Лебедева М.Г. и др. Аборт – проблема национальной безопасности страны // *Охрана репродуктивного здоровья – будущее России: матер. Всерос. конф. с междунар. участием, посвящ. десятилетию кафедры акуш. и гинекологии медицинского факультета Белгородского государственного университета*. – Белгород, 2010. – С.165-167.
7. Резер Т.М. Медико-социальные подходы организации полового воспитания и сексуального образования // *СОЦИС*. – 2003. – №1. – С.102-108.
8. Уварова Е.В. Медико-социальные аспекты репродуктивного здоровья современных девочек России // *Репродуктивное здоровье детей и подростков*. – 2006. – №4. – С.6-10.
9. Ушакова Г.А., Елагина С.Е., Назаренко М.Ю. Репродуктивное здоровье современной популяции девочек // *Акуш. и гинекол.* – 2006. – №1. – С.34-38.
10. Medical eligibility criteria for contraceptive use. – 4th ed. – World Health Organization, 2009.

**Информация об авторах:** Тихонова Наталья Владимировна – к.м.н., доцент;  
Приходько Елена Анатольевна – к.м.н., доцент; Масленникова Светлана Андреевна – студент,  
e-mail: Barvenkov\_99@mail.ru; Ваземиллер Оксана Александровна – студент.

Татьяна Иннокентьевна Алексеевская, Сергей Петрович Белых  
(Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. В.И. Малов,  
кафедра общественного здоровья и здравоохранения, зав. – д.м.н., проф. Г.М. Гайдаров)

**Резюме.** Проведен ретроспективный анализ стационарных больных с черепно-мозговыми травмами за период 2005-2008 гг. Оценивалось соотношение госпитализированных больных по полу, возрасту, степени алкогольного опьянения. В ходе исследования были выяснены группы риска пострадавших и средний возраст госпитализированных. Также определена связь исходов лечения черепно-мозговой травмы и степени алкогольного опьянения.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, алкогольное опьянение, госпитализация, летальность, группа риска.

## THE LEVEL OF HOSPITALIZATION OF PATIENTS WITH A CRANIOCEREBRAL TRAUMA, DEGREE OF SEVERITY OF VICTIMS AND TREATMENT OUTCOMES DEPENDING ON A BLOOD ALCOHOL LEVEL

T.I. Alekseevskaya, S.P. Belykh  
(Irkutsk State Medical University)

**Summary.** The retrospective analysis of inpatients with craniocerebral traumas during 2005-2008 has been carried out. The ratio of the hospitalized patients on sex, age, degrees of alcoholic intoxication was estimated. During the research the groups of risk of victims and an average age of those, who were hospitalized have been defined. The relationship of outcomes of treatment of craniocerebral trauma and degree of alcoholic intoxication has also been defined.

**Key words:** craniocerebral trauma, alcoholic intoxication, hospitalization, lethality, group of risk.

Россия входит в ряд лидирующих стран по количеству потребляемого алкоголя в год. По официальным данным, потребление учтенного алкоголя на душу населения в стране выросло с 5,4 литра абсолютного алкоголя в 1990 г. до 10,0 литров в 2008 г. или в 1,8 раз. Однако, реальное душевое потребление алкоголя с учётом оборота спиртосодержащей продукции, в том числе парфюмерно-косметическая продукция, товары бытовой химии и другие виды продукции, в России составляет около 18,0 л [6,7].

Стоит отметить, что по данным экспертов ВОЗ потребление 8,0 литров учтенного алкоголя на душу населения в год является опасным рубежом, при котором происходят необратимые потери и здоровья и генофонда нации [4,5,10].

Злоупотребление алкоголем в современной России приводит к преждевременной смерти около полумиллиона человек ежегодно. Каждая четвертая смерть в России прямо или косвенно связана с алкоголем – около 30,0% смертности среди мужчин и 15,0% среди женщин [6,10].

В Иркутской области прослеживается аналогичная ситуация, как и в целом по России. Так, по данным Иркутскстата, потребление учтенного алкоголя на душу населения (из расчета 100%-ного этилового спирта) выросло с 8,2 литров в 2006 году до 9,3 литров в 2010 году [6].

Суммарное потребление алкогольных напитков в Иркутской области на 1 человека уменьшилось с 117,4 литров в 2009 году до 103,3 литров в 2010 году, в основном за счет снижения потребления вина и пива. Вместе с тем, объем потребления крепких спиртных напитков практически не изменился: 2009 год – 11,6 литров; 2010 год – 11,2 литра [6].

Многие исследования подтверждают связь алкоголизма с травматизмом и свидетельствуют о том, что образ жизни людей, злоупотребляющих алкоголем, особенности их поведения, неумение организовать свой досуг и отдых способствует росту численности несчастных случаев, отравлений и травм. С этим связаны и особенности структуры их заболеваемости. Если у женского населения в целом несчастные случаи занимают четвертое место и составляют около 10,0% всей заболеваемости, то у мужчин, злоупотребляющих алкоголем, несчастные случаи занимают второе место или 22,0% всей заболеваемости [3,6,11,12].

Установлено, что на каждый дополнительный литр потребляемого алкоголя смертность от несчастных случаев увеличивается на 6,5-6,6 случаев на 100 тыс. населения, а при каждом дополнительном литре крепких спиртных напитков, потребляемом взрослым населением, смертность от несчастных случаев возрастает на 11,2 случая на 100 тыс. населения в год [11].

В проблеме черепно-мозговой травмы особое место занимает их сочетание с алкогольным опьянением. В России ежегодно черепно-мозговые травмы получают около 600 тыс. человек. В состоянии алкогольного опьянения черепно-мозговые травмы получают от 38,0% до 70,0% пострадавших. При этом вид травмы и степень тяжести полученной черепно-мозговой травмы напрямую зависит от степени ал-

когольного опьянения пострадавшего [1,2,8,9].

Считается, что содержание этилового спирта в крови до 0,3 г/л или 0,3‰ на взрослого человека не оказывает никакого опьяняющего действия. Легкая степень опьянения наступает при концентрации этилового спирта в крови от 0,5 до 1,5 г/л, средняя – при 1,5-2,5 г/л, тяжелая (алкогольная кома) – при 3-5 г/л. Смертельная разовая доза алкоголя составляет 4-12 г/кг (в среднем 300 мл 96% этилового спирта при отсутствии приобретенной устойчивости).

Целью исследования является изучение распространенности черепно-мозговой травмы, характеристика способов получения травмы и степень тяжести пострадавших, исходы лечения в зависимости от уровня алкоголя в крови.

### Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ 2542 медицинских карт стационарных больных с черепно-мозговыми травмами, госпитализированных в нейрохирургическое отделение ГКБ №3 г. Иркутска за 2005-2008 гг.

Для работы была выбрана ГКБ №3 г. Иркутска, т.к. она является клинической базой для оказания высококвалифицированной специализированной медицинской помощи больным с черепно-мозговой травмой, имеет в своем составе нейрохирургическое отделение, рассчитанное на 60 коек, и оказывает ежедневную круглосуточную нейрохирургическую помощь населению города Иркутска и Иркутской области.

Все полученные результаты были обработаны с использованием статистического анализа и экономического анализа.

### Результаты и обсуждение

В ходе исследования статистически значимо выяснено, что мужчины в 3 раза чаще были госпитализированы с диагнозом черепно-мозговая травма. Так, показатель госпитализации у мужчин составил 75,9% по сравнению с женщинами 24,1% ( $t=3,5$ ;  $p=0,003$ ).

Анализ данных по частоте встречаемости отдельных видов травм в различных возрастных группах показал, что категория пострадавших в возрасте от 19 до 29 лет наиболее часто (44,7%) получают черепно-мозговые травмы различной степени тяжести. При этом частота госпитализированных в возрастных группах 30-39 лет и 40-49 лет в целом составляет 47,2% (26,0% и 21,2% соответственно). Наименьший процент пострадавших (3,3%) пришёлся на возрастную группу свыше 60 лет.

Средний возраст госпитализированных больных составил 34 года.

Независимо от отягчающих обстоятельств, травмируются главным образом лица 19-49 лет, на долю которых пришлось 91,9% от общего числа пострадавших. Это наиболее трудоспособная категория населения, что, несомненно, наносит существенный ущерб экономике Иркутской области и Российской Федерации в целом.

Ведущей причиной черепно-мозговой травмы в городе Иркутске стал автодорожный травматизм – 42,6%, оттеснив на второе и третье места бытовой и криминогенный травматизм – 25,8% и 25,0% соответственно. Травмы, полученные на производстве и при невыясненных обстоятельствах, составили наименьший процент – 3,5% и 3,1% соответственно.

К безусловным факторам риска при черепно-мозговой травме относится состояние алкогольного опьянения. Наличие алкоголя в крови, на момент госпитализации, выявлялось у каждого второго пострадавшего с черепно-мозговой травмой (51,7%). При этом половина из них находилась в средней и тяжелой стадии алкогольного опьянения – 22,0%, что усугубляло прогноз и тяжесть состояния.

Большая часть мужчин, госпитализированных с диагнозом черепно-мозговая травма, находились в состоянии алкогольного опьянения (41,3%). У женщин данное соотношение составляет 50/50, т.е. у 13,5% женщин алкоголь в крови не выявлен, а 10,4% женщин находились в состоянии алкогольного опьянения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдар Б.В., Парфенов В.Е., Шербук Ю.А. и др. Закрытая черепно-мозговая травма // Практическая нейрохирургия. – СПб., 2002. – С.66-120.
2. Захарова Н.Е., Потапов А.А., Корнико В.Н. и др. Исследования регионального объемного мозгового кровотока и объема крови с помощью КТ-перфузии у больных с черепно-мозговой травмой и её последствия // Материалы IV съезда нейрохирургов России. – М., 2006. – С.504.
3. Медик В.А. Современные подходы к прогнозированию показателей здоровья населения на региональном уровне // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и история медицины. – 2004. – №2. – С.24-27.
4. Немцов А.В., Терехин А.Т. Размеры и диагностический состав алкогольной смертности в России // Наркология. – 2007. – №12. – С.
5. Огуцов П.П. Алкогольная ситуация в России и алкогользависимая патология // Врач. – 2003. – №11. – С.6-9.
6. Официальный сайт Роспотребнадзора по Иркутской области – Режим доступа: <http://www/38.rospotrebнадzor.ru/>

Показатель летальности пациентов с черепно-мозговой травмой за 2005-2008 гг. составил 7,1% от общего числа госпитализированных. При этом досуточная летальность составила 45,3%, а в течение 2-3 суток – 29,8%. Такие показатели летальности нами объясняются, прежде всего, изначально высокой степенью тяжести травмы, во многих случаях повреждения оказывались несовместимыми с жизнью. Надо отметить, что 65,2% погибших находились в состоянии алкогольного опьянения ( $t=6,2; p<0,05$ ).

Используя методы расчета экономических потерь, выявлено, что ущерб от преждевременной смертности составил около 816 млн. рублей в год.

Таким образом, в результате проведенного исследования достоверно установили, что люди в состоянии алкогольного опьянения чаще госпитализируются с диагнозом черепно-мозговая травма. При этом группой риска являются мужчины трудоспособного возраста. Средний возраст госпитализированных составил 34 года. При этом исход лечения напрямую зависит от уровня алкоголя в крови пострадавших на момент госпитализации.

directions/1430/.

7. Официальный сайт Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации – Режим доступа: <http://www/gks.ru>.
8. Потапов А.А., Лихтерман Л.Б. Черепно-мозговая травма // Клиническая неврология. Т. 3, ч. 1. Основы нейрохирургии / Под ред. А.Н. Коновалова. – М., 2004.
9. Потапов А.А., Рошаль Л.М., Лихтерман Л.Б., Кравчук А.Д. Черепно-мозговая травма: проблемы и перспективы // Вопросы нейрохирургии. – 2009. – №2. – С.3-8.
10. Плавинская С.Т., Плавинский С.Л. Потребление алкоголя и смертность в регионах Российской Федерации. // Российский семейный врач. – 2009. – Т. 8. №2. – С.12-15.
11. Салахов Э.Р. Травмы и отравления в России и за рубежом // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и история медицины. – 2004. – №2. – С.13-20.
12. Cao Q., Benton R.L., Whitemore S.R., et al. Stem cell repair of central nervous system injury // J. Neurosci. Res. – 2002. – Vol. 68. – P.501-510.

**Информация об авторах:** 664003, г.Иркутск, ул. Красного восстания, 2, ИГМУ, кафедра общественного здоровья и здравоохранения, тел./факс (3952) 201082, e-mail: irkafoz@mail.ru, Алексеевская Татьяна Иннокентьевна – д.м.н., профессор кафедры; Белых Сергей Петрович – ординатор кафедры.

## ОБРАЗ ЖИЗНИ. ЭКОЛОГИЯ

© ПАШКОВ А.П., ЛУКЪЯНЕНКО Н.В., КОЛЯДО В.Б. – 2012  
УДК 616.36-002.2-036.22(571.150)

### ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В КРУПНОМ АГРОПРОМЫШЛЕННОМ РЕГИОНЕ (НА ПРИМЕРЕ АЛТАЙСКОГО КРАЯ)

Артём Петрович Пашков, Наталья Валентиновна Лукьяненко, Владимир Борисович Колядо (Алтайский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. В.М. Брюханов, кафедра эпидемиологии, зав. – д.м.н., проф. Н.В. Лукьяненко, кафедра общественного здоровья и здравоохранения, зав. – д.м.н., проф. В.Б. Колядо)

**Резюме.** Целью исследования было выявление особенностей эпидемического процесса хронического вирусного гепатита В в Алтайском крае. В результате исследования было выявлено, что заболеваемость хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) в крае имеет тенденцию к росту. Заболеваемость среди городского населения статистически значимо выше, чем у сельских жителей, причем по показателю смертности от ХВГВ и его исходов в этих группах нет статистически значимого различия. Была выявлена прямая сильная связь между заболеваемостью ХВГВ и распространенностью инъекционной наркомании в городах и ее отсутствие в сельских районах края. Все это говорит о недостаточной диагностике ХВГВ в сельской местности.

**Ключевые слова:** хронический гепатит В, эпидемический процесс, пути передачи.

**THE FEATURES OF THE EPIDEMIC PROCESS OF CHRONIC HEPATITIS B IN A LARGE AGRICULTURAL REGION (ON THE EXAMPLE OF THE ALTAI TERRITORY)**

A.P. Pashkov, N.V. Lukyanenko, V.B. Kolyado  
(Altay State Medical University)

**Summary.** The aim was to identify the characteristics of the epidemic process of chronic hepatitis B in the Altai region. Statistical data processing was carried out using the software Excel 2007 and Statistica 6.0, used the criteria of reliability of Student and Fisher. The study revealed that the incidence of chronic hepatitis B (HGB) in the region tends to increase. Incidence among the urban population was significantly higher than that of rural residents, mortality and outcomes HGB in these groups were not significantly different. There was revealed a strong association between HGB incidence and prevalence of injecting drug use in urban and rural areas. All this shows a lack of diagnostic HGB in rural areas.

**Key words:** chronic hepatitis B, epidemic process, the transmission path.

Широкое распространение во всем мире парентеральных вирусных гепатитов, длительная утрата трудоспособности, возможность неблагоприятных исходов определяет эпидемиологическую значимость этих инфекций и их актуальность для медицинской науки и практического здравоохранения. В настоящее время в мире насчитывается более 350 млн. больных хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) [3,9]. Вирус гепатита В канцерогенен, он является причиной 60-80% гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) в мире [11]. От исходов ХВГВ умирает 300-500 тыс. людей в год [9]. По данным ведущих эпидемиологов страны [2] в настоящее время в Российской Федерации (РФ) сложилась крайне неблагоприятная эпидемиологическая ситуация с гепатитом В, а уровень заболеваемости значительно выше, чем в странах Западной Европы и США. Экономический ущерб, обусловленный заболеванием населения РФ вирусными гепатитами, составляет более 5 млрд. рублей ежегодно [4].

Анализ данных литературы позволил прийти к заключению, что в различных регионах динамика заболеваемости гепатитом В (ГВ) наряду с общими чертами, характерными для РФ в целом, имеет особенности [1,3,7]. Следовательно, помимо совместно действующих факторов, на ее характер влияют и региональные условия.

Цель работы: выявить особенности эпидемического процесса хронического вирусного гепатита В в крупном агропромышленном регионе (на примере Алтайского края).

**Материалы и методы**

Материалами для ретроспективного эпидемиологического анализа послужили данные официальной статистики Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Алтайскому краю. Данные об уровне наркотизации населения предоставлены Федеральной службой РФ по контролю за оборотом наркотиков регионального управления по Алтайскому краю, информация о смертности от хронических вирусных гепатитов и их исходов взята из автоматизированной информационной системы «Смертность».

Статистическая обработка проведена на основе классических методов анализа: расчет интенсивных и экстенсивных показателей, показателей наглядности и соотношения, расчет средних величин (X), разнобразия их признаков и ошибок репрезентативности (m), критериев статистической значимости различий (Стьюдента и Фишера), выявление корреляционных связей по методике Спирмена. Разделение районов на группы с различным показателем заболеваемости выполнялось методом сигмальных отклонений. Использованы компьютерные программы Excel 2007 и Statistica 6.0.

**Результаты и обсуждения**

В результате проведенной оценки показателя заболеваемости

ХВГВ жителей Алтайского края прослеживается его рост в период 1999-2010 гг. с  $1,61 \pm 0,3$  до  $6,2 \pm 0,5$  (в 3,9 раза;  $p=0,001$ ) случаев на 100 тыс. населения (рис. 1).



Рис. 1. Динамика заболеваемости населения Алтайского края ХВГВ за 1999-2010 гг. (I<sup>0</sup>/<sub>10000</sub>).

Увеличение показателя заболеваемости ХВГВ, происходит на фоне снижения заболеваемости острым гепатитом В: за период 2003-2010 гг. он уменьшился в 8,5 раза ( $p=0,0001$ ).

Учитывая главную особенность Алтайского края как крупного агропромышленного региона (удельный вес сельских жителей в крае составляет 46,3%, а в среднем по России – 27%), нами было проведено сравнение заболеваемости ХВГВ среди сельского и городского населения и выявлено, что заболеваемость за весь исследуемый временной промежуток была статистически значимо выше среди горожан (табл. 1).

Для определения наиболее неблагоприятных территорий по ХВГВ и для выявления возможной закономерности их распространения было применено картографирова-

Таблица 1

Сравнение показателей заболеваемости ХВГВ в сельских районах и городах края за два периода: 2001-2005 гг. и 2006-2010 гг.

Период	Сельское население		Городское население		Статистическая значимость различия (p)
	Показатель (в <sup>0</sup> / <sub>10000</sub> )	±m	Показатель (в <sup>0</sup> / <sub>10000</sub> )	±m	
2001-2005 гг.	3,8	0,25	8,5	0,4	0,0001
2006-2010 гг.	5,7	0,3	10,8	0,4	0,0001
Статистическая значимость различия между периодами (p)	0,001	-	0,001	-	-

ние. Методом сигмальных отклонений административно-территориальные образования края были разделены на 3 группы: с низким, средним и высоким уровнем заболеваемости. Оказалось, что районы с высоким показателем заболеваемости сконцентрированы, главным образом, вокруг крупных городов края (Барнаул, Бийск, Рубцовск, Каменск-Оби).

Что же касается возрастной структуры больных ХВГВ среди жителей Алтайского края, то наибольший показатель заболеваемости наблюдается среди лиц 30-39 лет ( $10,1 \text{ }^0/_{10000}$ ) и 50-59 лет ( $11,5 \text{ }^0/_{10000}$ ) (рис. 2).

По мнению большинства исследователей, основными факторами, способствующими распространению вирусных

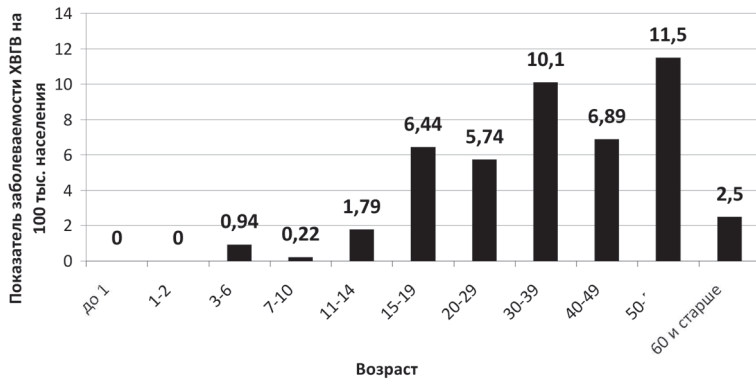


Рис. 2. Возрастная структура заболеваемости ХВГВ населения Алтайского края.

парентеральных гепатитов, являются наркомания с использованием внутривенного введения наркотических веществ и чрезмерная либерализация сексуальных отношений [7]. С каждым годом меняется удельный вес каждого из путей передачи ХВГВ в общей структуре. Из установленных наибольший удельный вес ежегодно с 2008 года занимает половой (сексуальные контакты), но если в 2008 году он составлял 31,3%, то в 2010 году – 29% (снизился в 1,08 раза), в то же время второй по значимости путь, а именно парентеральное введение наркотиков, с каждым годом встречается все чаще: в 2008 году – 8,4%, в 2010 – 14,5% (вырос в 1,7 раза).

При выявлении зависимости заболеваемости ХВГВ от наркотизации населения была выявлена прямая сильная связь в городах ( $r=0,73$ ;  $p=0,02$ ), связи в сельских районах края выявлено не было ( $r=0,2$ ;  $p=0,4$ ). Полученная картина является казуистическим случаем, так как в других странах и регионах Российской Федерации, где проходили подобного рода исследования, выявлялась только прямая сильная связь между этими явлениями [6,7,10].

При наложении картограммы распространенности наркомании на картограмму заболеваемости ХВГВ было обнаружено их совпадение по территориям с высоким показателем заболеваемости всего на 16%. Это совпадение определено только городами края, а что касается сельского населения, то лишь один из восьми районов с высоким показателем наркотизации имеет высокую заболеваемость по ХВГВ.

Была выявлена прямая сильная корреляционная связь между заболеваемостью хроническими вирусными гепатитами и смертностью от таких заболеваний печени, как цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) –  $r=0,7$  ( $p=0,001$ ). Учитывая этот факт и данные литературы, подтверждающие наибольший вклад вируса гепатита В в развитие указанных заболеваний [11], было проведено сравнение показателей смертности от заболеваний печени среди городского ( $5,9 \pm 0,3\%$ ) и сельского ( $6,3 \pm 0,3\%$ ) населения, оказа-

лось, что различие этих показателей статистически не значимо ( $t=0,7$ ;  $p=0,15$ ) (табл. 2).

Анализируя эпидемический процесс ХВГВ, нельзя упустить вопросы, касающиеся вакцинации против этой инфекции. С каждым годом охват населения этой прививкой увеличивается (в 1999 году было охвачено 0,1% населения Алтайского края, в 2010 году – 61,3%). То, что вакцинопрофилактика гепатита В уже сейчас благоприятно сказывается на эпидемиологической картине данной нозологии подтверждается наличием обратной сильной корреляционной связи между процентом охвата населения прививками и показателем заболеваемости острым гепатитом В ( $r=-0,95$ ;  $p=0,001$ ). Возможно, что уже сейчас вакцинация оставляет свой след и на картине заболеваемости ХВГВ, а проявляется это значительно большим темпом прироста показателя заболеваемости хроническим гепатитом С, против которого вакцинации не существует: за исследуемый пери-

Таблица 2  
Сравнение показателей смертности от заболеваний печени в районах и городах края

Сельское население		Городское население		Статистическая значимость различия (p)
Показатель (в ‰)	±m	Показатель (в ‰)	±m	
6,3	0,3	5,9	0,3	0,15

од 1999-2010 гг. показатель заболеваемости ХВГВ в целом по краю вырос в 3,9 раза, а заболеваемость хроническим гепатитом С за тот же временной отрезок возросла в 16,4 раза.

Таким образом, результаты исследования позволяют утверждать, что низкая заболеваемость ХВГВ в сельских районах края связана с недостаточной диагностикой этого заболевания, и официальные цифры занижены в сравнении с реальной картиной. Это ведет к тому, что сотни больных, сами того не подозревая, представляют огромную угрозу для здоровья окружающих.

Сложившаяся в настоящее время ситуация в Алтайском крае диктует необходимость совершенствования методов расследования случаев эпидемических вспышек вирусных гепатитов, методов профилактики вирусных гепатитов, дальнейшего развития специализированной медицинской помощи, особое внимание необходимо уделять жителям районов, относящихся к группе с высоким показателем наркотизации населения. Социальная эффективность реализации данных мероприятий будет выражена в увеличении продолжительности жизни, сохранении трудового потенциала больных, снижении социальной напряженности в обществе вследствие уменьшения угрозы распространения вирусных гепатитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арямкина О.Л. Распространенность HBV-инфекции на территории Ульяновской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2005. – №5. – С.8-12.
2. Гулякова В.К. Вирусный гепатит В у детей: клинико-эпидемиологические и социальные аспекты // Российский педиатрический журнал. – 2005. – №3. – С.21-26.
3. Ёршова О.Н., Кириллова И.Л., Шахгильдян И.В. и др. Эпидемиологическая характеристика гепатитов В и С в Череповце // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – №5. – С.7-10.
4. Климова Е.А., Знойко О.О., Максимов С.Л., Ющук Н.Д. Хронический гепатит С: рациональная противовирусная терапия // Фарматека. – 2003. – №7. – С.10-16.
5. Серов В.В., Апросина З.Г., Крель П.Е. и др. Хронический вирусный гепатит – одна из наиболее важных проблем современной медицины // Архив патологии. – 2004. – Т. 66. №6. – С.6-11.
6. Симонова Е.Г. Заболеваемость хроническими вирусны-

ми гепатитами в юго-западном административном округе Москвы // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2000. – №4. – С.40-41.

7. Яковлев А.А., Поздеева Е.С., Евдокимова Л.П. и др. Динамика заболеваемости гепатитами В и С в Приморском крае и эпидемиологическая оценка факторов, ее детерминирующих // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. – №4. – С.10-14.

8. Kao J.H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus // Korean J Intern Med. – 2011. – №26(3). – P.255-261.

9. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention // Journal of Clinical Virology. – 2005. – №34 – P.1-3.

10. Nazare C., Gîrleanu I., Cojocariu-Salloum C., Trifan A. Prevalence of chronic hepatitis B virus (HBV) infection in closed communities and risk behaviour // Rev. Med Chir Soc Med Nat Iasi. – 2011. – Vol. 115. №2. – P.325-330.

11. Wands J.R. Prevention of hepatocellular carcinoma // New England Journal of Medicine. – 2004. – №351(15). – P.1567-1570.

Информация об авторах: Пашков Артем Петрович – студент 6 курса медико-профилактического факультета, e-mail: pashkart@mail.ru; Лукьяненко Наталья Валентиновна – заведующий кафедрой, д.м.н., профессор; Колядо Владимир Борисович – заведующий кафедрой, д.м.н., профессор.



## ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ИММУННО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ НАСЕЛЕНИЯ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Людмила Васильевна Веремчук, Павел Фёдорович Кикку, Ирина Николаевна Симонова  
(Владивостокский филиал ФГБУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»  
СО РАМН – НИИ Медицинской климатологии и восстановительного лечения, Владивосток,  
директор – д.м.н. Т.А. Гвозденко)

**Резюме.** Изучены эколого-гигиенические условия (климатические показатели, загрязнение воздуха и общие показатели загрязнения среды) в административных районах г. Владивостока, влияющие на активность ответной реакции иммунно-метаболических показателей крови населения с заболеваниями органов дыхания. Установлено, что климатические особенности в административных районах г. Владивостока в большей степени влияют на уровень загрязнения воздушной среды и в меньшей – на общее загрязнение среды. Наиболее сильной, но избирательной, является ответная реакция организма по иммунно-метаболическим показателям крови на влияние особенностей муссонного климата. Меньшей силой связи, но более широким спектром ответных реакций иммунно-метаболических показателей крови характеризуется воздействие загрязнения воздуха и загрязнения среды в целом.

**Ключевые слова:** экология, климат, загрязнения воздушной среды, иммунно-метаболические показатели крови, заболевания органов дыхания.

## INFLUENCE OF ECOLOGY-HYGIENIC CHARACTERISTICS EXTERNAL ENVIRONMENTS ON IMMUNE -METABOLIC PARAMETERS OF BLOOD THE POPULATION WITH DISEASES OF BODIES OF BREATH

L.V. Veremchuk, P.F. Kiku, I.N. Simonova  
(Vladivostok Branch FGBU «DNC FPD» from Russian Academies of Medical Science – Scientific Research Institute Medical Climatology and Regenerative Treatment, Vladivostok)

**Summary.** Studied the ecological and hygienic conditions (climatic indicators, air pollution and overall environmental pollution) in the administrative districts of Vladivostok, affecting the activity of the immune response, immune and metabolic parameters of the blood of people with respiratory diseases. It is established, that climatic features in administrative areas of Vladivostok in the greater degree influence a level pollution of the air environment and in smaller – on the general pollution of environment. The strongest, but, response of immune and metabolic parameters of blood to influence of features of a monsoonal climate is selective. Smaller force of communication, but with wider spectrum of responses of immune and metabolic parameters of blood characterizes influence of air pollution and pollution of environment as a whole.

**Key words:** ecology, climate, pollution of the air environment, immune and metabolic parameters of blood, disease of bodies of breath.

Одной из актуальных проблем экологии и гигиены является возрастающий риск развития эколого-обусловленных заболеваний органов дыхания в крупных промышленных городах России с высокой плотностью населения, большими объемами техногенных выбросов хозяйственно-промышленных предприятий и климатическими особенностями, формирующими общее состояние экологической ситуации города. Загрязнение атмосферного воздуха является одним из ведущих патогенетических факторов воздействия, оказывающих наибольшее влияние на систему органов дыхания. При длительном и интенсивном загрязнении воздушной среды происходит ухудшение общего экологического состояния среды обитания, которое затем резко повышает уровень бронхолегочной заболеваемости.

Владивосток – это крупный промышленный город Дальнего Востока с высоким уровнем загрязнения воздушной среды. Интенсивность загрязнения атмосферы города зависит не столько от объемов техногенных выбросов, сколько от особенностей морского климата города (направление и скорость ветра, влажность воздуха, осадки), формирующих уровень самоочищения атмосферы [2,10]. Важнейшим компонентом воздействия на органы дыхания являются климатические условия, оказывающие непосредственное воздействие на физиологические функции организма, определяя его состояние [6,7,9]. Климатические условия в определенных пределах могут оказывать сано- и патогенетическое воздействие на органы дыхания. Контрастность погодного режима с характерными колебаниями метекомпонентов, высокие температуры при высокой влажности воздуха, низкие температуры при повышенных скоростях ветра и др. вызывают резкое изменение биологических процессов в клетках и развитие экологической зависимости ответной реакции организма [6,9].

Проведенные в НИИ МКВЛ СО РАМН исследования (1998-2008 гг.) выявили на примере Приморского края, что уровень заболеваемости органов дыхания зависит от совокупного патогенетического воздействия факторов муссон-

ного климата с наложением неблагоприятного действия загрязненной воздушной среды [3,4,5]. При этом было показано, что к негативным свойствам климатических условий края органы дыхания человека способны адаптироваться, а к загрязнению воздушной среды адаптация отсутствует [3,4].

Целью данного исследования явилась эколого-гигиеническая оценка качества среды обитания в различных районах г. Владивостока и изучение ее влияния на иммунно-метаболические показатели крови жителей, имеющих хронические заболевания органов дыхания.

### Материалы и методы

В проведенном исследовании участвовали жители, имеющие заболевания органов дыхания и проживающие в пяти районах города Владивостока (Советском, Первореченском, Ленинском, Фрунзенском и Первомайском) с разным уровнем загрязнения воздушной среды и среды обитания в целом. Клиническая база представлена клинико-лабораторным обследованием 428 человек с бронхолегочной патологией, проживающих в разных экологических условиях города. Биологическим материалом служила венозная кровь и ее компоненты. Анализ крови включал изучение липидных показателей крови (10 показателей), показателей системы ПОЛ-АОЗ (7), печеночных проб (7), параметров свертывающей системы крови (5), гормонов щитовидной железы (3), иммунограммы (47), показателей азотистого обмена (3). Обследование пациентов проводилось согласно Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» (2001) и после подписания пациентом формуляра информированного согласия.

Эколого-гигиеническая характеристика включала изучение спектра климатических среднегодовых показателей по многолетним данным (1990-2008 гг.) (температура, влажность воздуха, количество ясных и пасмурных дней, скорость ветра, осадки  $\geq 1$  мм, количество дней с туманами); показате-

лей загрязнения воздуха (общий выброс, твердый выброс, диоксид серы, окись углерода, окислы азота, количество химических компонентов, выбросы автотранспорта). Общее загрязнение среды обитания оценивалось по интегральным показателям: СПЗ – суммарный показатель техногенного загрязнения, опасность предприятия, интенсивность использования автомобильных дорог, интегральный индекс экологического благополучия территории.

Многообразие ответных реакций организма жителей г. Владивостока, проживающих в неоднородных условиях среды обитания, изучалось путем анализа взаимоотношений человека и среды с позиции системного подхода. Использовались статистические методы многомерного анализа, позволяющие рассчитать корреляционные связи Пирсона ( $p < 0,1$ ) между иммунно-метаболическими показателями у обследуемых пациентов и показателями техногенного загрязнения воздушной среды, общего загрязнения и климатических параметров.

### Результаты и обсуждение

Город Владивосток расположен на берегу Амурского залива. Территория города в различных районах имеет сложно-расчлененный рельеф, формирующий климатические особенности (ветровой, температурный и влажностный режим), характер и уровень техногенного загрязнения окружающей среды. Климат г. Владивостока по классификации Б.П. Алисова (1974) [1] относится к муссонной области умеренного пояса. Для города характерна сезонная смена воздушных течений, возникающих под влиянием термических контрастов между материком и океаном. По воздействию на человека муссонный климат г. Владивостока отличается частой изменчивостью погодных режимов по сезонам года и в течение суток; низкими зимними температурами с высокими скоростями ветра; наличием продолжительной летней духоты (высокие температуры на фоне высокой влажности); повышенной облачностью и туманами, снижающими продолжительность солнечной радиации в теплый период года.

Большая протяженность территории города с севера на юг, наличие возвышенного рельефа с изрезанной береговой линией формируют неоднородные климатические условия в разных районах города. Для Первомайского и частично, Фрунзенского районов характерны черты морского климата (повышенная влажность, большее количество пасмурных дней, туманов, сложенные летние и зимние температуры и др.). В Советском и Первореченском районах климат более континентальный, особенно на удаленных от береговой полосы территориях. Ленинский район имеет черты как морского, так и континентального климата, связанного с расположением с юго-западной стороны бухты Золотой Рог и возвышенным рельефом с северо-восточной стороны. В результате метеорологические показатели в различных районах города колеблются в пределах 20%.

Качество воздушной среды г. Владивостока определяется техногенным загрязнением. Выбросы большинства промышленных предприятий города, рассредоточенных по всей городской территории, происходят на высоте не более 50 м, за исключением ТЭЦ-1 и ТЭЦ-2, высота труб которых достигает 60-180 м при наибольшем радиусе выброса от 5 до 7 км. Остальные предприятия города имеют относительно малые объемы выбросов, с радиусом рассеивания от 0,5 до 3 км [8]. Атмосферный воздух Владивостока загрязняется дымом, золой и частичками угля 38 котельных и мусоросжигательного завода. При этом в отдельных районах города складывается особая ситуация, зависящая от топографических и микроклиматических условий. Особый вклад в загрязнение воздуха г. Владивостока вносит автотранспорт, который с увеличением числа транспортных единиц резко ухудшает качество воздушной среды [8]. Однако в целом, загрязнение воздуха города в среднем превышает предельно-допустимую концентрацию (ПДК) в 2-3 раза, что ниже средних городских российских показателей. Относительное экологическое

благополучие связано с высокой очищающей способностью моря, окружающего город со всех сторон.

В зависимости от расположения объектов загрязнения формируется порайонное различие качества воздушной среды. В настоящее время особенно загрязненными являются Первомайский, Фрунзенский и Ленинский районы, где расположены ТЭЦ, порт, большое количество транспортных развязок. Однако морской воздух, обладающий высокой очищающей способностью за счет повышения содержания кислорода в воздухе, снижения температурных контрастов и увеличения циркуляции атмосферы между сушей и морем, ослабляет техногенное загрязнение воздуха Первомайского и Фрунзенского районов. В Ленинском районе влияние моря несколько снижено.

В Первореченском районе нет крупных объектов выброса, кроме мусоросжигательного завода, однако расположение множества мелких загрязнителей, покрывающих техногенными выбросами практически всю территорию района, вызывает сложную экологическую ситуацию – до критической, в то время как климатические условия района не везде и не всегда способствуют очищению атмосферы. Наиболее благополучным по уровню загрязнения является Советский район. Отсутствие крупных объектов загрязнения, наличие больших площадей зеленой зоны и многокилометрового морского побережья по состоянию воздушной среды делают этот район наиболее благополучным. Однако в последние годы проблемным остается район прохождения главной автотрассы города, где в связи с ее модернизацией и снижением озеленения отмечается высокий уровень загрязнения воздуха, преимущественно атмосферными взвешиваниями.

Одной из задач исследования явилось изучение формирования уровня загрязнения воздуха и среды обитания в различных районах г. Владивостока. Для исследования применялся метод корреляционных связей Пирсона, с помощью которого оценивали силу взаимосвязи ( $r$ ) составляющих компонентов среды (климатические показатели, показатели загрязнения воздуха и общего загрязнения среды), пересчитанные на средний показатель связи ( $r$ ) по системным блокам факторов (табл. 1).

Таблица 1

Влияние климатических условий ( $r$ ) на уровень загрязнения воздуха и среды в различных районах г. Владивостока

Факторы воздействия	Районы города				
	Фрунзенский	Ленинский	Первомайский	Первореченский	Советский
Загрязнение воздуха (з/в)	0,69 $p < 0,05$	0,60 $p < 0,05$	0,64 $p < 0,01$	0,52 $p < 0,01$	0,61 $p < 0,05$
Интегральный показатель загрязнения среды	0,34 $p < 0,1$		0,42 $p < 0,05$		

Анализ данных таблицы 1 показывает, что климатические особенности города значительно (сила связи  $r > 0,5$ ) и с высоким уровнем значимости ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) влияют на загрязнение воздуха во всех районах города и слабо ( $r = 0,34$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,42$ ,  $p < 0,05$ ) на общие показатели загрязнения среды. Установлено, что климатические условия хорошо способствуют очищению воздуха Фрунзенского ( $r = 0,69$ ,  $p < 0,05$ ) и Первомайского ( $r = 0,64$ ,  $p < 0,01$ ) районов. Несколько сниженное, но статистически значимое воздействие климатических особенностей на уровень загрязнения атмосферы наблюдается в Первореченском районе ( $r = 0,52$ ,  $p < 0,01$ ). Ленинский район, лишь частично прилегающий к морю, и Советский район, расположенный в лесной зоне, имеют средние показатели связи ( $r = 0,6$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,61$ ,  $p < 0,05$  соответственно) (табл. 1). Низкие показатели связи климатических условий с общим загрязнением среды ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,05$ ) в Первомайском и Фрунзенском районах (табл. 1) можно объяснить косвенным воздействием климатических факторов (ветер, влажность) на интегральный показатель загрязнения.

Следующей задачей исследования явилось изучение ответной реакции организма по иммунно-метаболическим показателям крови у больных бронхолегочной патологией на воздействие климата, загрязнение воздуха и общее загрязнение окружающей среды г. Владивостока. Ответная реакция оценивалась степенью зависимости иммунно-метаболических показателей крови от показателей внешнего воздействия (климат, загрязнение атмосферы и среды в

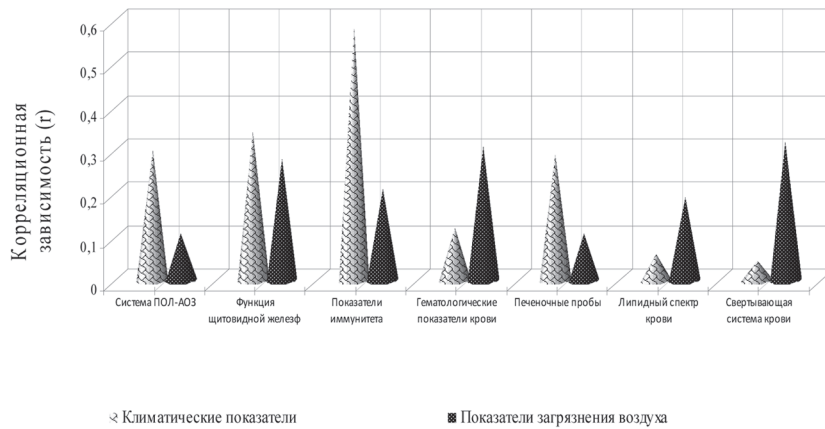


Рис. 1. Воздействие климата и загрязнения воздуха на иммуно-метаболические показатели крови у жителей г. Владивостока с заболеваниями органов дыхания.

целом). В качестве расчетного инструмента использовались корреляционные связи Пирсона (при  $p < 0,05$ ), сгруппированные по функционально обособленным группам показателей (свертывающая система крови, липидтранспортная система, система ПОЛ-АОЗ, гормоны щитовидной железы, печеночные пробы, иммунограмма, клинический анализ крови) и системам, включающим показатели загрязнения воздуха и климатических параметров (рис. 1). Было установлено, что наибольшее воздействие на иммунную, эндокринную системы, включающим показатели загрязнения воздуха и климатических параметров (рис. 1). Было установлено, что наибольшее воздействие на иммунную, эндокринную системы, систему ПОЛ-АОЗ и функциональное состояние печени жителей с заболеваниями органов дыхания оказывают климатические особенности города. Влияние загрязнения воздуха с меньшей силой фиксируется на гематологических показателях крови, свертывающей системе крови и липидном обмене. В этой связи можно предположить, что влияние негативных свойств муссонного климата на органы дыхания жителей города является определяющим, а загрязнение воздуха лишь усугубляет патогенетическое воздействие климата.

В рамках второй задачи был проведен анализ ответной реакции иммуно-метаболических показателей крови на воздействие эколого-климатических факторов у жителей, проживающих в разных районах города. Расчетным инструментом явился программный модуль «Парные и частные корреляции» STATISTICA 6, который определил корреляционные зависимости между иммуно-метаболическими показателями крови и климатическими факторами, рассчитанными для каждого района отдельно. Исходя из того, что климатические условия города отличаются по районам, при этом являясь активным патогенетическим раздражителем органов дыхания, вызывающим изменение иммуно-метаболических показателей крови, были проанализированы корреляционные связи показателей крови с климатическими факторами (r) в каждом районе отдельно (табл. 2).

Анализ данных таблицы 2 показывает существенное раз-

Влияние климатических факторов (r) на иммуно-метаболические показатели крови больных с заболеваниями органов дыхания, проживающих в разных районах города Владивостока

Группы показателей крови	Районы города			
	Фрунзенский	Первомайский	Первореченский	Советский
Гематологические показатели крови			0,35 $p < 0,1$	
Глюкоза	0,69 $p < 0,1$		0,3 $p < 0,1$	
Липидтранспортная система		0,59 $p < 0,1$		
Система ПОЛ-АОЗ		0,84 $p < 0,01$	0,52 $p < 0,1$	0,76 $p < 0,05$
Печеночные пробы	0,76 $p < 0,1$	0,66	0,45 $p < 0,05$	
Азотистый обмен				
Гормоны щитовидной железы			0,69 $p < 0,01$	
Иммунная система		0,87 $p < 0,05$	0,76 $p < 0,01$	0,62 $p < 0,05$

личие силы воздействия климатических условий на иммуно-метаболические показатели крови больных, проживающих в разных районах города, кроме Ленинского, где на фоне высокого загрязнения климат обладает латентным воздействием на органы дыхания. У жителей Первореченского района активная и статистически высоко значимая ответная реакция на влияние климата отмечается со стороны иммунной ( $r=0,76$ ,  $p < 0,01$ ) и эндокринной систем ( $r=0,69$ ,  $p < 0,01$ ), функционального состояния печени ( $r=0,45$ ,  $p < 0,05$ ). Влияние климата на изменение показателей печеночных проб можно объяснить косвенными причинами, требующими особого изучения. В Советском районе климатическим факторам характерна повышенная связь с показателями иммунной системы ( $r=0,76$ ,  $p < 0,05$ ) и системы ПОЛ-АОЗ ( $r=0,76$ ,  $p < 0,05$ ). В Первомайском районе влияние климата имеет высокую связь с системой ПОЛ-АОЗ ( $r=0,84$ ,  $p < 0,01$ ) и иммунной системой ( $r=0,87$ ,  $p < 0,05$ ) (табл. 2).

У больных с заболеваниями органов дыхания ответная реакция на воздействие загрязнения воздуха отличается по районам города. По сравнению с влиянием климата ответная реакция организма по иммуно-метаболическим показателям крови на качество воздушной среды представлена большим числом реагирующих систем, что свидетельствует о более высокой опасности загрязнения воздуха для органов дыхания (табл. 3).

Результаты показывают увеличение ответной реакции систем крови у жителей Ленинского, Первореченского и Советского районов (табл. 3). У больных, проживающих в Советском, Первомайском, Первореченском районах на загрязнение воздуха реагирует иммунная система, однако по сравнению с климатическим воздействием с меньшими показателями связи ( $r=0,58$ ,  $p < 0,05$ ;  $r=0,52$ ,  $p < 0,05$ ;  $r=0,6$ ,  $p < 0,05$  соответственно) (табл. 2, 3).

В данных районах также активно реагируют гематологические показатели крови (табл. 3). Повышенная ответная реакция систем крови отмечается в Советском районе, где влияние загрязнения воздуха вызывало изменение всего комплекса иммуно-метаболических показателей крови с разным уровнем статистической достоверности связей. Достаточно высокая активность ответной реакции показателей крови у жителей Советского района связана с проживанием большинства обследуемых пациентов на территории реконструкции автотрассы города. В Первореченском районе загрязнение воздуха оказывает повышенное воздействие ( $r=0,62$ ,  $p < 0,05$ ) на функцию печени, ответная реакция показателей печеночных проб на климатические условия составляет ( $r=0,45$ ,  $p < 0,05$ ), что в совокупности может быть опасным для здоровья жителей района (табл. 2, 3). В Ленинском районе загрязнение атмосферы влияет на свертывающую систему крови ( $r=0,77$ ,  $p < 0,1$ ) и функцию печени ( $r=0,73$ ,  $p < 0,1$ ), но наиболее сильное воздействие загрязнение воздуха оказывает на гематологические показатели крови жителей Первомайского, Первореченского и Советского районов, что говорит о более интенсивной и устойчивой реакции органов дыхания на загрязнение воздуха в этих районах (табл. 3).

Таблица 2

Анализ ответной реакции иммуно-метаболических показателей крови у больных бронхолегочной патологией во всех районах города показал высокую зависимость от климатических условий. Загрязнение воздушной среды по силе и интенсивности влияния на органы дыхания имеет сниженные показатели связи, однако по количеству связей, характеризующих активность ответной реакции организма, превышает реакцию на климатические факторы. В результате наиболее неблагоприятные условия для больных с заболеванием органов дыхания складываются у жителей Первореченского района.

Таблица 3  
Влияние загрязнения воздуха (г) на иммунно-метаболические показатели крови у больных с заболеваниями органов дыхания, проживающих в разных районах города Владивостока

Группы показателей крови	Районы города				
	Фрунзенский	Ленинский	Первомайский	Первореченский	Советский
Гематологические показатели крови	0,53 p<0,1		0,58 p<0,05	0,68 p<0,05	0,5 p<0,05
Глюкоза				0,19 p<0,1	
Липидтранспортная система	0,38 p<0,1	0,29 p<0,1	0,5 p<0,1		0,29 p<0,1
Система ПОЛ-АОЗ			0,83 p<0,1		0,4 p<0,1
Печеночные пробы		0,73 p<0,1	0,45 p<0,1	0,62 p<0,05	0,4 p<0,1
Азотистый обмен				0,83 p<0,1	0,5 p<0,05
Свертывающая система	0,41 p<0,1	0,77 p<0,1			0,67 p<0,1
Гормоны щитовидной железы		0,45 p<0,1			0,87 p<0,1
Иммунная система			0,52 p<0,05	0,6 p<0,01	0,58 p<0,05

Кроме климатических условий и загрязнения атмосферы экологическое состояние города Владивостока оценивается *общим загрязнением среды* с характерными показателями – суммарным показателем загрязнения (СПЗ), уровнем опасности предприятия, интенсивностью загрузки автотранспортными дорогами, индексом экологического благополучия территории, которые непосредственно или косвенно влияют на органы дыхания. Нужно заметить, что климатические условия города слабо влияют на общее загрязнение среды (табл. 1). Проведено изучение изменения иммунно-метаболических показателей крови под влиянием общего загрязнения среды. Было установлено, что в различных административных районах г. Владивостока ответная реакция иммунно-метаболических показателей крови на *общее загрязнение среды* оказалась достаточно активной (табл. 4).

Повышенные, высоко значимые связи общего загрязнения среды с иммунной системой жителей отмечаются в Первореченском и Советском районах ( $r=0,59$ ,  $p<0,05$ ;  $r=0,48$ ,  $p<0,01$  соответственно). На уровень *общего загрязнения среды* почти во всех районах города достоверно реагируют гематологические показатели крови с более выраженными связями во Фрунзенском ( $r=0,52$ ,  $p<0,05$ ) и Ленинском районах ( $r=0,5$ ,  $p<0,05$ ) (табл. 4). В Первореченском районе ответная реакция системы ПОЛ-АОЗ на общее загрязнение среды находится в пределах  $r=0,38$ ,  $p<0,05$ , во Фрунзенском районе она отмечается с показателями азотистого обмена организма (табл. 4). В итоге влияние общего загрязнения среды на иммунно-метаболические показатели крови жителей с бронхолегочной патологией является более интенсивным и особо опасным,

#### ЛИТЕРАТУРА

- Алисов Б.П., Полтораус Б.В. Климатология. – М.: Изд-во МГУ, 1974. – 296 с.
- Безуглая Э.Ю. Мониторинг состояния загрязнения атмосферы в городах. – Л.: Гидрометеоздат, 1991. – 251 с.
- Веремчук Л.В., Косолапов А.Б., Кику П.Ф. Природно-экологические условия жизнедеятельности населения Приморского края. – Владивосток, 2000. – 158 с.
- Веремчук Л.В., Кику П.Ф. Технология оценки распространения болезней органов дыхания под влиянием климатических факторов в рамках социально-гигиенического мониторинга // Бюллетень физиологии и патологии дыхания.

чем влияние загрязнения только воздушной среды. Если загрязнение воздушной среды имеет локальное распространение, уровень которого регулируется климатическими условиями территории, то общее загрязнение подразумевает загрязнение экосистемы на всех уровнях (воздух, вода, почва, растения, животные, человек), а самоочищение этой системы более статичный процесс и занимает длительное время. Поэтому вполне объяснима высокая связь или активная ответная реакция организма на общее загрязнение среды.

Таким образом, различие эколого-гигиенических условий (климатические факторы, загрязнение воздуха и общие показатели загрязнения среды) в административных районах г. Владивостока влияет на степень активности ответной реакции иммунно-метаболических показателей крови у больных с бронхолегочной патологией. Установлено,

Таблица 4  
Влияние общего загрязнения среды (г) на иммунно-метаболические показатели крови у больных с заболеваниями органов дыхания и проживающих в разных районах города Владивостока

Группы показателей крови	Районы города				
	Фрунзенский	Ленинский	Первомайский	Первореченский	Советский
Гематологические показатели крови	0,52 p<0,05	0,5 p<0,05		0,18 p<0,01	0,3 p<0,01
Глюкоза	0,53 p<0,1			0,35 p<0,1	
Липидный спектр		0,7 p<0,1	0,27 p<0,1	0,38 p<0,1	
Система ПОЛ-АОЗ	0,56 p<0,1		0,67	0,38 p<0,05	
Печеночные пробы		0,74 p<0,1	0,5 p<0,1	0,24 p<0,1	
Азотистый обмен	0,49 p<0,05		0,45 p<0,1		
Гормоны щитовидной железы		0,6 p<0,1			0,56 p<0,05
Иммунная система		0,89 p<0,1	0,62 p<0,1	0,59 p<0,01	0,48 p<0,01

что климатические условия в административных районах г. Владивостока в большей степени влияют на уровень загрязнения воздушной среды и в меньшей – на общее загрязнение среды. Наиболее сильной, но избирательной, является ответная реакция иммунно-метаболических показателей крови на воздействие особенностей муссонного климата. Загрязнение воздуха и загрязнение среды в целом, отражающиеся почти на всех системах крови и во всех районах, оказывают влияние меньше по силе связи, но большее по спектру ответных реакций иммунно-метаболических показателей крови. Совокупное воздействие климата и загрязнения (атмосферы и общее) создают опасную для здоровья населения города санитарно-гигиеническую обстановку.

– 2004. – Вып. 19. – С.12-17.

5. Веремчук Л.В., Иванов Е.М., Кику П.Ф. Среда обитания и заболеваемость органов дыхания в Приморском крае. – Владивосток: Дальнаука, 2008. – 217 с.

6. Воронин Н.М. Основы медицинской и биологической климатологии. – М., 1981. – 352 с.

7. Данилова Е.И. Адаптация и жизнь // Человек, экология, симметрия: сб. матер. конф. – Минск, 1991. – С.37-38.

8. Доклад о состоянии окружающей природной среды Приморского края в 2008 году. / Под ред. М.Н. Бибикина, К.М. Кученко, С.А. Киселева. – Владивосток: Дальпресс, 2010. – 137 с.

9. Русанов В.И. Климат и здоровье человека. – Л., 1988. – 190 с.  
10. Селегей Т.С. Метеорологический потенциал самоочи-

щения атмосферы Сибирского экономического района // Вопросы климатологии и агрометеорологии. – 1989. – Вып. 86. – С.84-89.

**Информация об авторах:** Веремчук Людмила Васильевна – д.б.н., вед.н.с. лаборатории, 690105, г. Владивосток, ул. Русская 73г, НИИ МКВЛ, тел./факс (234) 2345502, e-mail: Veremchuk\_LV@mail.ru; Кику Павел Федорович – д.м.н., к.т.н., профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе, e-mail: lme@list.ru; Симонова Ирина Николаевна – к.м.н., м.н.с. лаборатории, тел./факс (423)2345502.

## ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ

© ЗЫКОВА И.Д., ЕФРЕМОВ А.А. – 2012  
УДК 615.322:547.913

### КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ЭФИРНОГО МАСЛА КОРНЕЙ И КОРНЕВИЩ *FILIPENDULA ULMARIA (L.) MAXIM*

Ирина Дементьевна Зыкова, Александр Алексеевич Ефремов  
(Сибирский федеральный университет, ректор – акад. РАН, д.б.н. Е.А. Ваганов,  
кафедра химии, зав.– д.х.н., проф. А.Г. Аншиц)

**Резюме.** Методом хромато-масс-спектрометрии проанализирован компонентный состав эфирного масла корней и корневищ лабазника вязолистного, произрастающего в окрестностях г. Красноярск. Обнаружено, что накопление сесквитерпеноидов превалирует в сравнении с монотерпеноидами. Идентифицированы 19 основных компонентов эфирного масла и определено их содержание. Отмечено высокое содержание ди-изобутилфталата,  $\alpha$ -кадинола,  $\alpha$ -бисаболола и минтсульфида.

**Ключевые слова:** лабазник вязолистный, корни и корневища, эфирное масло, компонентный состав, хромато-масс-спектрометрия.

### COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL FROM THE ROOTS AND RHIZOMES *FILIPENDULA ULMARIA (L.) MAXIM*

I.D. Zykova, A.A. Efremov  
(Siberian Federal University, Krasnoyarsk)

**Summary.** By means of the GC-MS method the component composition of essential oil produced from the roots and rhizomes *Filipendula Ulmaria (L.) Maxim*, growing in the vicinity of Krasnoyarsk, was investigated. It was found that the accumulation of sesquiterpenoids prevailed as against monoterpenoids. 19 main components of essential oils and their contents were identified. High content level of di-isobutyl phthalate,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -bisabolol and mintsulfide was noted.

**Key words:** *Filipendula Ulmaria*, essential oil, component composition, method GC-MS.

Многие эфиромасличные растения издавна применяются в научной и народной медицинах [4-7]. Но, несмотря на это, химические составы ряда классов биологически активных веществ, определяющих физиологическое действие растительных препаратов на их основе, остаются малоизученными. *Filipendula Ulmaria (L.) Maxim* – лабазник вязолистный – как продуцент эфирного масла давно привлекает внимание исследователей. С.А. Кожин и Ю.Г. Силина, изучавшие состав эфирного масла соцветий лабазника вязолистного, произрастающего в Ленинградской области, установили содержание салицилового альдегида, метилсалицилата, бензальдегида, этилбензоата и фенилэтилфенилацетата [3]. Кроме того, в составе масла обнаружены следовые количества гелиотропина и ванилина.

Компонентный состав эфирного масла надземной части лекарственного растения *Filipendula Ulmaria (L.) Maxim* (лабазника вязолистного), произрастающего в окрестностях г. Красноярск, изучен авторами данной работы с использованием современного хромато-масс-спектрометрического метода [1,2]. Подтверждено наличие метилсалицилата, салицилового альдегида, бензальдегида. В составе масла, полученного из разных органов растения, идентифицировано более 30 компонентов.

Отсутствие в доступной научной литературе данных по компонентному составу эфирного масла подземных органов (корней и корневищ) лабазника вязолистного определило выбор темы данного исследования.

Цель работы: получение эфирного масла из корней и корневищ лабазника вязолистного, произрастающего в окрестностях г. Красноярск, и изучение его компонентного состава

с использованием метода хромато-масс-спектрометрии.

### Материалы и методы

Сбор исследуемого материала – корней и корневищ лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria (L.) Maxim*) осуществляли в окрестностях г. Красноярск вдали от селитебных территорий в октябре 2010 г. Собранные образцы тщательно очищали промывали в проточной и дистиллированной воде, сушили на воздухе при температуре окружающей среды в затененном месте. Затем образцы измельчали на мельнице до размеров 5-7 мм.

Эфирное масло получали методом гидропародистиляции из воздушно-сухого сырья в течение не менее 20 часов до прекращения выделения эфирного масла. Продолжительность процесса гидропародистиляции установлена экспериментально на основании изучения динамики изменения выхода эфирного масла во времени. Ввиду малого количества эфирного масла его экстрагировали гексаном из насадки Клевенджера.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на хроматографе Agilent Technologies 7890 А с квадрупольным масс-спектрометром MSD 5975 С в качестве детектора с использованием 30 метровой кварцевой колонки HP-5 (сополимер 5%-дифенил – 95%-диметилсилоксан) с внутренним диаметром 0,25 мм. Температура испарителя 280°C, температура источника ионов 173°C, газ-носитель – гелий – 1 мл/мин. Температура колонки: 50°C (2 мин), программируемый нагрев от 50 до 270°C (со скоростью 4°C в мин), изотермический режим при 270°C в течение 10 мин.

Таблица 1

Содержание основных компонентов эфирного масла из корней и корневищ лабазника вязолистного

№	Линейные индексы удерживания	Компонент	Содержание, в % от цельного эфирного масла
1	1378	борнил пропионат	2,4
2	1422	кариофиллен	6,3
3	1456	гумулен	2,4
4	1465	цис-муурола-4(14),5-диен	1,8
5	1471	карота-5,8-диен	1,9
6	1484	гермакрен D	1,5
7	1500	розарфен	1,6
8	1502	мууролен	4,8
9	1599	α-гвайол	2,5
10	1631	еремолигенол	6,1
11	1633	γ-эвдесмол	2,7
12	1643	τ-кадиол	5,7
13	1649	δ-кадиол	2,2
14	1658	α-кадиол	13,0
15	1688	α-бисаболол	14,2
16	1730	хамазулен	1,3
17	1739	минтсульфид	8,8
18	1869	ди-изобутилфталат	17,0
19	1992	маноил-оксид	3,4
ИТОГО:			99,6

(2,4%), α-кадиол (13,0%), τ-кадиол (5,7%), δ-кадиол (2,2%), ди-изобутилфталат (17,0%), α-бисаболол (14,2%) и минтсульфид (8,8%).

Содержание компонентов оценивали по площадям пиков, а идентификацию отдельных компонентов производили на основе сравнения времен удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными компонентов эталонных масел и чистых соединений, если они имелись. Для идентификации также использовались данные библиотеки масс-спектров Wiley275 (275 тысяч масс-спектров) [9] и атласа масс-спектров и линейных индексов удерживания [8]. При полном совпадении масс-спектров и линейных индексов удерживания идентификация считалась окончательной.

### Результаты и обсуждение

Эфирное масло, полученное из корней и корневищ лабазника вязолистного, представляет собой маслянистую жидкость темно синего цвета.

Согласно данным хромато-масс-спектрометрического анализа в эфирном масле из подземных органов лабазника вязолистного содержится более 20 индивидуальных компонентов. Из них 19 компонентов, составляющих 99,6%, являются известными соединениями и легко идентифицируются (табл. 1). Содержание остальных компонентов не превышало 0,1%.

Исходя из данных, представленных в таблице, можно отметить, что особенностью компонентного состава эфирного масла корней и корневищ лабазника вязолистного является содержание монотерпеновых соединений в количествах меньше 0,1%. Основные компоненты масла представлены сесквитерпенами и кислородсодержащими соединениями, среди которых кариофиллен (6,3%), гумулен

### ЛИТЕРАТУРА

1. Зыкова И.Д., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла из соцветий *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim в фазах цветения и плодоношения // Химия растительного сырья. – 2011. – №1. – С.133-136.
2. Зыкова И.Д., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла стеблей, листьев и соцветий *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim // Химия растительного сырья. – 2011. – №4. – С.99-102.
3. Кожин С.А., Силина Ю.Г. Состав эфирного масла из соцветий *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim // Растительные ресурсы. – 1971. – Т. 7. Вып.4. – С.567-569.
4. Махов А.А. Зеленая аптека. – Красноярск: Книжное изд-во, 1993. – 528 с.

5. Махлаюк В.П. Лекарственные растения в народной медицине. – М.: Нива России, 1992. – 477 с.

6. Минович В.М., Коненкина Т.А., Федосеева Г.М. Компонентный состав эфирного масла рододендронов Адамса и мелколистного, произрастающих в Восточной Сибири // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск, 2008. – №1. – С.79-82.

7. Мартынов А.М., Даргаева Т.Д. Фенольные соединения и водорастворимые полисахариды фиалки Патрэна // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск, 2009. – №7. – С.213-215.

8. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений. – Новосибирск: Наука, 2008. – 969 с.

9. McLafferty F.W. The Wiley. NBS Registry of Mass Spectral Data; Wiley. – London: Interscience, 1989. – 563 p.

**Информация об авторах:** Зыкова Ирина Дементьевна – к.т.н., доцент, Институт Фундаментальной подготовки (ИФП) СФУ, 660074, г. Красноярск, ул. Киренского, 26, ИФП СФУ, кафедра химии, тел. (391) 249-75-59, e-mail: izykova@sfu-kras.ru; Ефремов Александр Алексеевич – д.х.н., профессор, заведующий лабораторией.

© СПРЫГИН В.Г. – 2012

УДК 616.36:615.244.03:615.917: 547.262:613.81

### ПРИМЕНЕНИЕ ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ПОРАЖЕНИИ ЭТИЛОВЫМ СПИРТМ

Владимир Геннадьевич Спрыгин

(Тихоокеанский океанологический институт им. В.И.Ильичева ДВО РАН, г.Владивосток, директор – акад. РАН В.А. Акуличев, лаборатория биохимии, зав. – д.б.н, проф. Н.Ф. Кушнерова)

**Резюме.** Исследована эффективность применения олигомерных проантоцианидинов из калины *Viburnum sragentii* и стандартизованного препарата «Легалон» для профилактики метаболических нарушений углеводного обмена при алкогольной интоксикации. Олигомерные проантоцианидины, обладая высокими протонотакцепторными свойствами, способствовали сохранению пула окисленной формы НАД<sup>+</sup>, процессов аэробного гликолиза, пентозного цикла и снятию состояния тканевой гипоксии, превосходя по своей эффективности эталонный гепатопротектор «Легалон».

**Ключевые слова:** олигомерные проантоцианидины, этиловый спирт, печень, углеводный обмен, профилактика.

### OLYGMERIC PROANTHOCYANIDINS ADMINISTRATION FOR PREVENTION OF CARBOHYDRATE METABOLISM DISTURBANCES IN RAT'S LIVER IN ETHANOL INDUCED INJURY

V.G. Sprygina

(V.I.Ilichev Pacific Oceanological Institute, FEBRAS)

**Summary.** It was studied the effectiveness of administration of oligomeric proanthocyanidins from the viburnum *Viburnum sargentii* and standardized preparation "Legalonum" for prophylactic of carbohydrate metabolism disturbances in ethanol induced injury. Oligomeric proanthocyanidins possessing high hydrogen acceptor activity, promoted the preservation of oxidized NAD<sup>+</sup> pool, processes of aerobic glycolysis, pentose cycle and preventing of tissue hypoxia, surpassing effectiveness of the reference hepatoprotector "Legalonum".

**Key words:** oligomeric proanthocyanidins, ethyl alcohol, liver, carbohydrate metabolism, prophylaxis.

Алкоголь оказывает выраженное токсическое воздействие на все основные внутренние органы, в частности печень. Алкогольная болезнь печени (АБП) является одним из самых серьезных осложнений, вызывающих повышенную заболеваемость и смертность при злоупотреблении алкоголем. В ряде стран доля алкогольных поражений достигает 40% среди заболеваний печени и является важнейшей проблемой здравоохранения и экономики в западном мире [7], и вопросы стратегии борьбы с ростом АБП остаются одной из сложных проблем научного сообщества. Первичными факторами, вовлеченными в формирование АБП, являются ацетальдегид, гипоксия, оксидативный стресс и структурно-функциональные нарушения биомембран [13], причем ключевой стадией формирования патологии является первый этап – окисление этанола.

Известно, что этанол полностью метаболизируется в организме, причем не менее 90% этанола окисляется в печени с участием двух основных ферментов: алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы. Оба фермента в качестве акцептора протонов используют НАД<sup>+</sup>, поэтому окисление этанола сопровождается накоплением восстановленной его формы (НАДН) и снижением содержания окисленной. Это обстоятельство имеет принципиальное значение для токсикологической характеристики этанола, который способен блокировать до 75% окислительной мощности печени. Этого достаточно, чтобы нарушить протекание любых других метаболически важных окислительных процессов, протекающих с использованием НАД<sup>+</sup> (аэробный гликолиз, цикл Кребса и целый ряд других реакций углеводного и энергетического обмена) [11].

В связи с тем, что запретительные и ограничительные меры, направляемые на снижение употребления алкогольных напитков, малоэффективны, то одним из перспективных подходов в области профилактики алкоголизма является разработка новых препаратов растительной природы, способных предотвратить или максимально облегчить патологические изменения в печени при воздействии этанола [2].

Ранее нами было показано, что комплекс олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ) способен воздействовать на процессы окисления этанола в печени. Восстанавливая редуктазную активность алкогольдегидрогеназы, он препятствовал резкому нарастанию уровня ацетальдегида в организме [3]. Такое воздействие на процесс окисления этанола с одной стороны снижает степень токсического воздействия ацетальдегида на организм, а с другой обеспечивает поддержание пула окисленной формы НАД<sup>+</sup>, предохраняя каскады метаболических реакций углеводного и энергетического обмена, для нормального протекания которых величина соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН является критической [11].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния профилактического применения КОПЦ, выделенного из отвара калины (*Viburnum sargentii*), на показатели углеводного обмена и состояние окислительно-восстановительной системы (НАД<sup>+</sup>/НАДН) печени крыс в условиях алкогольной интоксикации. В качестве препарата сравнения нами был выбран эталонный гепатопротектор «Легалон», содержащий в качестве активного начала комплекс флаволигнанов из экстракта плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum*).

## Материалы и методы

КОПЦ из отвара калины выделяли в соответствии описанной ранее процедурой [3].

Эксперимент проводили на крысах-самцах Вистар с массой тела 130-180 г, содержащихся на стандартном рационе питания. Схема эксперимента была взята из работы [6] и адаптирована к условиям эксперимента. В течение 7 дней крысам внутривенно вводили 33% этиловый спирт в дозе 7,5 мл на 1 кг массы тела животного 2 раза в сутки. В этот же период, ежедневно за 1 час до первого введения

этанола животным внутривенно вводили водный раствор КОПЦ в дозе 100 мг/кг массы тела один раз в сутки или «Легалон» по такой же схеме и в той же дозе в виде взвеси в 1% крахмальном клеестере. Доза в 100 мг/кг соответствует рекомендованной дозе для проведения доклинических испытаний полифенольных гепатопротекторов [1].

В ходе эксперимента были выделены четыре группы животных (по 8 крыс в каждой): 1-я – контроль (интактная); 2-я – введение этанола; 3-я – введение КОПЦ в течение 7 дней на фоне введения этанола; 4-я – введение легалона в течение 7 дней одновременно с 7-дневной алкоголизацией. Через 7 дней после начала эксперимента крыс выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Исследование одобрено этической комиссией Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева Дальневосточного отделения РАН (протокол №3 от 5 сентября 2011 г.).

В печени определяли содержание пирувата (ПВК), лактата, глицерол-3-фосфата (Г-3-Ф), диоксиацетонфосфата (ДАФ), активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) (КФ 1.1.1.49) [4], содержание окисленных форм коферментов НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup> [9], глюкозы с помощью наборов «Новоглюк» (Новосибирск).

Результаты обрабатывали по параметрическому критерию Стьюдента (t), используя программу для статистической обработки данных InStat (GraphPad Software Inc.USA).

## Результаты и обсуждение

Алкогольная интоксикация, вызванная введением 33%-ного этанола (2 группа), сопровождалась статистически значимыми изменениями биохимических показателей углеводного обмена в печени крыс и сдвигом окислительно-восстановительного равновесия в сторону образования восстановленной формы никотинамидного кофермента НАДН в цитоплазме гепатоцитов (табл. 1). Окисление этанола с участием АДГ и АлДГ сопровождалось падением содержания окисленной формы НАД<sup>+</sup> на 48% (p<0,001). Так как пул окисленной формы НАД<sup>+</sup> является общим для лактат- и глицерол-3-фосфат-дегидрогеназ, его уменьшение приводит к смещению равновесия реакций в сторону образования восстановленных продуктов, что в результате выражается в изменении соотношения концентраций метаболитов ПВК-лактатного и Г-3-Ф – ДАФ челночных механизмов, отражающих состояние окислительно-восстановительного равновесия в цитоплазме гепатоцитов [14]. Содержание лактата увеличилось на 39% (p<0,001), а ПВК снизилось на 28% (P<0,001), что привело к снижению отношения НАД<sup>+</sup>/НАДН (ЛДГ) до величины равной 272 против 522 в контроле (табл. 1). Содержание Г-3-Ф возросло на 32% (p=0,0184). По нашему мнению, это произошло в результате смещения равновесия реакции в сторону окисления ДАФ, содержание которого снизилось на 24% (p=0,0421) и образования НАД<sup>+</sup>. ДАФ выступает в роли акцептора водорода от потока НАДН, формирующегося при окислении этанола и превращается в Г-3-Ф, что сопровождается снижением величины отношения НАД<sup>+</sup>/НАДН (Г-3Ф-ДГ) до 613 против 1061 в контроле. Данные изменения метаболических параметров углеводного обмена указывают на нарушение аэробных процессов в печени. Снижение содержания окисленной формы НАД<sup>+</sup> сопровождается ингибированием ключевых реакций цикла Кребса, активации анаэробного гликолиза, к накоплению лактата и развитию ацидоза, [11]. Известно, что НАДН, образующийся в процессе окисления этанола, способен увеличивать специфический пул Г-3-Ф, используемого в синтезе глицеридов, что приводит к увеличению уровня биосинтеза

ТАГ и развитию печеночного стеатоза [16]. Уменьшение содержания ДАФ сопровождается снижением интенсивности реакций глюконеогенеза и развитием гипогликемии [10], что проявилось в снижении содержания глюкозы в плазме крови на 16% ( $p=0,0066$ ). Алкогольная интоксикация сопровождалась уменьшением на 21% ( $p=0,0421$ ) активности Г-6-

тем самым физиологичное направление протекания реакций аэробного гликолиза. Благодаря этому при профилактическом применении ОПЦ в условиях интоксикации этиловым спиртом сохраняются процессы дыхания, и предотвращается развитие тканевой гипоксии, которые являются основными причинами развития патохимических последствий этанола на клетки печени [11].

Таблица 1

Влияние профилактического введения растительных препаратов (КОПЦ, Легалон) на содержание метаболитов углеводного обмена в печени крыс при токсическом поражении этиловым спиртом ( $M \pm m$ )

Биохимические показатели	Группы животных			
	1-я – контроль	2-я – этанол	3-я этанол + КОПЦ	4-я – этанол + легалон
НАД <sup>+</sup> (мкмоль/г)	0,336± 0,008	0,208± 0,010***	<sup>3</sup> 0,350± 0,014	<sup>3</sup> 0,290± 0,015*
НАДФ <sup>+</sup> (мкмоль/г)	0,128± 0,008	0,083± 0,006***	<sup>3</sup> 0,125± 0,007	<sup>3</sup> 0,164± 0,008***
Лактат (мкмоль/г)	1,76± 0,06	2,45± 0,09***	<sup>3</sup> 1,64± 0,07	<sup>3</sup> 1,98± 0,08*
Пируват (мкмоль/г)	0,102± 0,006	0,074± 0,008*	<sup>2</sup> 0,105± 0,005	<sup>1</sup> 0,118± 0,004*
НАД <sup>+</sup> /НАДН (ЛДГ)	522	272	528	536
Глицерол-3-Фосфат (мкмоль/г)	0,220± 0,017	0,290± 0,020*	<sup>2</sup> 0,215± 0,015	<sup>1</sup> 0,230± 0,012
Диоксиацетонфосфат (мкмоль/г)	0,021± 0,002	0,016± 0,001*	0,017± 0,002	0,019± 0,001
НАД <sup>+</sup> /НАДН (Г-3-ФДГ)	1061	613	982	918
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (мкмоль/мин/г)	1,65± 0,14	1,30± 0,07*	<sup>2</sup> 2,00± 0,09	<sup>2</sup> 0,88± 0,11***
Глюкоза (ммоль/л; плазма крови)	6,15± 0,14	5,18± 0,27**	<sup>3</sup> 6,61± 0,16*	5,59± 0,21*

Примечание. Различия статистически значимы при: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  – по сравнению с контролем; <sup>1</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> –  $p < 0,001$ ; <sup>3</sup> –  $p < 0,001$  – по сравнению со 2-й группой; КОПЦ – комплекс олигомерных проантоцианидинов из калины *Viburnum sargentii*.

ФДГ, ключевого фермента пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Так как фактором, лимитирующим активность Г-6-ФДГ, является доступность НАДФ<sup>+</sup>, то очевидно, что снижение активности этого фермента может быть обусловлено уменьшением содержания соответствующего кофактора на 35% ( $p < 0,001$ ). Такое снижение количества НАДФ<sup>+</sup> может происходить как вследствие регенерации НАД<sup>+</sup> из НАДН через передачу ионов водорода на НАДФ<sup>+</sup> в системе сопряженных реакций, образующих связь между двумя окислительно-восстановительными парами [13], так и в результате активации трансгидрогеназной реакции [8]. Такое соотношение метаболических параметров углеводного обмена характеризует состояние тканевой гипоксии, сформированной в результате окисления этанола, что согласуется с известными в литературе данными [11].

Профилактическое превентивное введение КОПЦ оказывало нормализующее действие на состояние окислительно-восстановительного равновесия в печени и показатели углеводного обмена. Уровень содержания окисленной формы кофермента НАД<sup>+</sup> в печени животных 3 группы даже несколько превышал таковой у животных контрольной группы. Соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН в печени животных, получавших КОПЦ, соответствовало уровню контроля. Более высокое содержание окисленной формы НАД<sup>+</sup> обусловило сдвиг равновесия в сторону преимущественного образования окисленных продуктов дегидрогеназных реакций. Так, содержание ПВК, лактата, ДАФ и Г-3-Ф в печени животных 3 группы не отличались от контрольных показателей. Это указывает на сохранение аэробных процессов и их преобладание над анаэробными, а также свидетельствует об отсутствии блока, формирующегося под действием этанола, по превращению Г-3-Ф и ПВК в реакции гликолиза. Данный факт свидетельствует о том, что олигомерные проантоцианидины (ОПЦ), в силу особенности своего химического строения [5], которое характеризуется разветвленной структурой сопряженных двойных связей высокой подвижности и свободных гидроксильных групп, могут выступать в качестве самостоятельной окислительно-восстановительной системы с высокой буферной емкостью, способной принимать на себя избыток протонов от потока НАДН, образующегося в процессе окисления этанола. Этот процесс предотвращает смещение цитоплазматического и митохондриального окислительно-восстановительного потенциала, сохраняя

тем самым физиологичное направление протекания реакций аэробного гликолиза. Благодаря этому при профилактическом применении ОПЦ в условиях интоксикации этиловым спиртом сохраняются процессы дыхания, и предотвращается развитие тканевой гипоксии, которые являются основными причинами развития патохимических последствий этанола на клетки печени [11].

На сохранение высокого уровня аэробных процессов и скорости восстановительных синтезов указывает и высокая активность окисления глюкозы по пентозофосфатному пути окисления. При этом активность ключевого фермента пентозного цикла – Г-6-ФДГ в группе, получавшей КОПЦ, превышала не только таковой во 2 группе (этанол), но и была на 18% выше по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). По нашему мнению, это определяется более высоким (на 33%,  $p < 0,001$ ) чем во 2 группе содержанием окисленной формы НАДФ<sup>+</sup>, доступность которого является лимитирующим фактором реакции, катализируемой Г-6Ф-ДГ. По-видимому, это обусловлено протоноакцепторной способностью ОПЦ, определяющей снижение уровня доступности протонов и возможность протекания трансгидрогеназного и неферментативно-восстановления НАДФ<sup>+</sup>. То есть ОПЦ предохраняют блокируемые этанолом реакции, в которых генерируются метаболиты (рибулозо-5-фосфат, НАДФН) для биосинтетических процессов, направленных на восстановление мембранных структур, детоксикацию и др. В то же время следует отметить, что содержание глюкозы в крови у животных 3 группы не имело статистически значимого отличия от контроля. По нашему мнению это обусловлено сохранением реакций глюконеогенеза из лактата и Г-3-Ф в присутствии ОПЦ.

Профилактическое применение легалона, также сопровождалось сохранением изученных метаболических путей, однако в ряде случаев имело более низкую степень выраженности. Наблюдаемый уровень окисленной формы НАД<sup>+</sup> был ниже, чем в 3 группе и статистически значимо ниже (на 16%,  $p=0,0171$ ), чем у контрольных животных (табл. 1). Известно, что флаволигнаны, входящие в состав легалона, в отличие от проантоцианидинов, не образуют олигомерных форм и имеют более устойчивую электронную структуру. Известно, также, что как проантоцианидины, так и флаволигнаны в составе легалона, способны к образованию свободных феноксильных радикалов с прооксидантным действием. Однако проантоцианидины после образования феноксильных радикалов способны вступать в реакцию полимеризации, увеличивая свой суммарный антиоксидантный потенциал [5]. Вероятно, вышеперечисленные особенности химической структуры ОПЦ лежат в основе их более высокой протоноакцепторной способности, по сравнению с таковой у флаволигнанов из состава легалона. При исследовании содержания ПВК и лактата в печени крыс 4 группы, отмечался повышенный уровень этих биохимических показателей в среднем на 14-12% ( $p=0,0435$ ) по сравнению с контролем. При этом соотношение НАД<sup>+</sup>/НАДН соответствовало таковому у животных в 1 группе, что указывает на позитивное влияние легалона на состояние редокс-системы в условиях интоксикации этанолом.

Так же как и при введении КОПЦ из калины, применение легалона препятствовало нарушению процессов глюконеогенеза из лактата и Г-3-Ф, однако с меньшей эффективностью. На это указывает как повышенное на 12% ( $p=0,0451$ ) содержание лактата в печени животных 4 группы по сравнению с контролем, так и на 10% ( $p=0,0435$ ), более низкое содержание глюкозы.

Интересно отметить факт накопления высокого содержания НАДФ<sup>+</sup> в группе, получавшей легалон, содержание которого на 22% ( $p < 0,001$ ) превышало контрольные показатели. По нашему мнению, это обусловлено снижением активности Г-6Ф-ДГ на 87% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с таковой у животных 1-й группы (табл. 1). По нашему мнению, это может быть обусловлено ингибированием активности Г-6Ф-



ДГ флаволигнанами из состава легалона [12], что очевидно и определяет снижение скорости утилизации НАДФ<sup>+</sup> в пентозном цикле и его накопление в печени.

Анализируя биологические эффекты исследуемых препаратов, следует отметить, что все они обладают протекторным эффектом в условиях интоксикации этанолом, но с разной степенью выраженности. Так КОПЦ из калины эффективнее предотвращал истощение пула окисленной формы НАД<sup>+</sup>. При его применении содержание этой формы никотинамидного кофермента даже превысила контрольный показатель. Также КОПЦ из калины превосходил по своей эффективности эталонный гепатопротектор легалон по способности влиять на уровень лактата и поддержанию уровня глюкозы в крови экспериментальных животных в условиях алкогольной интоксикации. Таким образом, следует заключить, что

в целом КОПЦ из калины превосходит эталонный гепатопротектор легалон по своей эффективности в сохранении показателей метаболических реакций углеводного обмена и состояния редокс-системы при отравлении этанолом.

Полученные результаты дают основание заключить, что ОПЦ, превентивно применяемые при интоксикации этиловым спиртом, способствуют сохранению биохимических показателей углеводного обмена, активности процессов аэробного гликолиза и пентозного цикла, содержания окисленных форм никотинамидных коферментов НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>, соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН и предотвращению состояния тканевой гипоксии. Это даёт основание для рекомендации применения комплексов олигомерных проантоцианидинов в качестве профилактического средства ослабляющего токсические проявления действия этанола.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2000. – С.228-231.
2. Дашинамжилов Ж.Б., Диль А.А., Лубсандоржиева П.Б. Применение фитосредств в комплексной терапии и профилактике хронического алкоголизма // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2004. – Т. 47. №6. – С.75-78.
3. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Рахманин Ю.А. Регуляция метаболизма этилового спирта в организме олигомерными проантоцианидинами как способ профилактики его токсического действия // Гигиена и санитария. – 2003. – №5. – С.58-61.
4. Metabolites 1: Carbohydrates, Methods of Enzymatic Analysis. / Bergmeyer U.H. eds. – Basel: Verlag Chemie, 1984. – Vol. 6. – P.701.
5. Bors W., Michel C., Stettmaier K. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – Vol. 374. №2. – P.347-355.
6. Gajdos A., Gajdos-Torok M., Horn R. Therapeutic effect of the (+)-catechin on biochemical disorders of the liver in the ethanol intoxicated rat // C. R. Seances Soc. Biol. Fil. – 1972. – Vol. 166. №2. – P.277-279.
7. Gao B., Bataller R. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 141. №5. – P.1572-1585.
8. Huxley L., Quirk P.G., Cotton N.P.J., et al. The specificity of proton-translocating transhydrogenase for nicotinamide nucleotides // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2011. – Vol. 1807. №1. – P.85-94.
9. Klingenberg M. Nicotinamide-adenin Dinucleotides and Dinucleotide Phosphates (NAD, NADP, NADH, NADPH) // Metabolites 2: Tri- and Dicarboxylic Acids, Purines, Pyrimidines and derivative, Coenzymes, Inorganic Compounds / Bergmeyer U. H. eds. – Basel: Verlag Chemie, 1984. – Vol. 7. – P.251-284.
10. Lieber C.S. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments // J. Hepatol. – 2000. – Vol. 32. Suppl. 1. – P.113-128.
11. Lieber C.S. Metabolism of Alcohol // Clinics in liver disease. – 2005. – Vol. 9. №1. – P.1-35.
12. Sudheesh S., Presannakumar G., Vijayakumar S., et al. Hypolipidemic effect of flavonoids from Solanum melongena // Plant Foods For Human Nutrition. – 1997. – Vol. 51. №4. – P.321-330.
13. Tsukamoto H., Lu S.C. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury // Faseb Journal. – 2001. – Vol. 15. №8. – P.1335-1349.
14. Veech R.L., Guynn R., Veloso D. The time-course of the effects of ethanol on the redox and phosphorylation states of rat liver // Biochem. J. – 1972. – Vol. 127. №2. – P.387-397.
15. Ying W.H. NAD(+)/ NADH and NADP(+)/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences // Antioxidants & Redox Signaling. – 2008. – Vol. 10. №2. – P.179-206.
16. Yu B.-Y., Cronholm T. Coupling of ethanol metabolism to lipid biosynthesis: labelling of the glycerol moieties of sn-glycerol-3-phosphate, a phosphatidic acid and a phosphatidylcholine in liver of rats given [1,1-2h2]ethanol // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism. – 1997. – Vol. 1344. №2. – P.165-170.

**Информация об авторе:** Спрыгин Владимир Геннадьевич — вед.н.с., к.б.н., 690041, г. Владивосток, ул. Балтийская 43, ТОИ ДВО РАН, тел.: (4232) 31-30-61, e-mail: vsprygin@poi.dvo.ru.

© БАНЗАРАКШЕЕВ В.Г. – 2012  
УДК 615.32.- 092:616.61

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ФИТОСРЕДСТВА ПРИ ЭТАНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИСЛИПОПРОТЕИНЕМИИ

Виталий Гамбалович Банзаракшеев

(Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, директор – д.б.н., проф. Л.Л. Убугунов, лаборатория экспериментальной фармакологии отдела биологически активных веществ, зав. – д.м.н., проф. С.М. Николаев)

**Резюме.** Объект исследования – комплексное растительное средство, полученное по прописям рецептурных источников тибетской медицины. На 30 крысах линии Wistar в эксперименте установлено, что этанол-индуцированная дислипидопроteinемия сопровождается усилением процессов пероксидации и снижением активности эндогенной антиоксидантной защиты. Курсовое профилактическое введение фитосредства ингибирует образование продуктов перекисного окисления липидов и повышает антиокислительный потенциал.

**Ключевые слова:** комплексное фитосредство, дислипидопроteinемия, перекисное окисление липидов, антиоксиданты.

## ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF COMPLEX PHYTOREMEDY IN ETHANOL-INDUCED DYSLIPIDOPROTEINEMIA

V.G. Banzaraksheev

(Institute of General and Experimental Biology. SB of RAS, Ulan-Ude)

**Summary.** The object of study – complex herbal remedy has been developed on the basis of Tibetan medicine recipes. There has been revealed in the rats in the experiment that the ethanol-induced dyslipidoproteinemia is accompanied by increased peroxidation

processes and decreased activity of endogenous antioxidant protection. Course preventive introduction of the herbal remedy inhibits the formation of lipid peroxidation products and increases antioxidant capacity.

**Key words:** complex phytoremedy, dyslipoproteinemia, lipid peroxidation, antioxidants.

Россия, согласно данным ВОЗ, относится к регионам с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, в структуре которых ведущее место занимают ишемическая болезнь сердца и цереброваскулярные заболевания, обусловленные развитием атеросклероза [7,9].

Известно, что одним из ведущих механизмов атеросклероза является интенсификация процессов перекисного окисления липидов на фоне антиоксидантной недостаточности организма [6]. По мнению исследователей, усиление перекисных механизмов атерогенеза способствуют такие факторы риска, как недостаточность витаминов-антиоксидантов, дислипотеинемия, калоригенные продукты и эндогенные токсины, в частности, этанол и его метаболиты в форме пероксида водорода и ацетальдегида [8].

Несомненно, что проблема поиска, разработки, внедрения и совершенствования мер по фармакокоррекции указанного звена атерогенеза играет важную роль в профилактике и лечении данной патологии. Несмотря на широкий выбор антиатеросклеротических препаратов, они не всегда оказывают желаемый эффект и довольно часто вызывают тяжелые побочные реакции [4,13]. В этом плане перспективными являются средства растительного происхождения, которые менее токсичны, обладают более мягким действием, что обусловлено родством метаболизма растительной и животной клетки.

Ранее нами сообщалось о гиполипидемическом действии комплексного фитосредства тибетской медицины при этанол-индуцированной дислипотеинемии [2]. В работе показано, что фитосбор способен снижать в крови содержание холестерина атерогенных липопротеинов низкой плотности, наряду с этим повышать уровень антиатерогенной фракции холестерина липопротеинов высокой плотности.

Цель работы: оценка влияния комплексного фитосредства на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты при экспериментальной этаноловой дислипотеинемии.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на крысах линии Wistar с исходной массой 170-190 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при одинаковом уходе и питании, световом и температурном режиме, со свободным доступом к воде. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Дислипотеинемия индуцирована у крыс однократным внутрижелудочным введением 40% раствора этанола в дозе 9 г/кг массы животного после 24 часового голодания [9].

Объектом исследования служил многокомпонентный фитосбор, разработанный на основе оригинальной рецептурной прописи, описанной в первоисточнике тибетской медицины, трактате «Чжуд-ши» [14]. В состав сбора входят цветки *Calendula officinalis* L., плоды *Crataegus sanguinea* Pall., плоды *Malus baccata* (L.) Borkh., семена *Lactuca sativa* L., корневища *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., цветки и плоды *Rosa* sp., слоевище *Cetraria islandica* (L.) Ach. и др. Указанное средство вводили животным профилактическим курсом внутривенно в форме отвара в объеме 1 мл/100 г 1 раз в сутки в течение 7 дней. Контрольная группа крыс получала дистиллированную воду в эквивалентных количествах по аналогичной схеме. Забор крови на лабораторные исследования проводили натощак через 16 часов после введения индуктора [10].

Антиоксидантные свойства растительного средства изучали по степени ингибирования образования продуктов ПОЛ: содержание диеновых конъюгатов (ДК) в сыворотке крови определяли путем экстрагирования смесью гептан-изопропанол и последующим измерением оптической плотности при длине волны 233 нм [3].

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови определяли в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) путем измерения концентрации ТБК-активных

продуктов при длине волны 532 нм по степени образования окрашенного комплекса с ТБК [12].

Активность каталазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом [5].

Выборка проверена на нормальность с помощью критерия Шапиро-Уилка. Полученные данные статистически обработаны общепринятыми методами для малой выборки с определением средней величины и средней арифметической ошибки. Статистическую значимость результатов оценивали с применением t-критерия Стьюдента [11].

### Результаты и обсуждение

Как известно, деградация этанола сопровождается образованием токсичных метаболитов, стимулирующих липолиз и выброс свободных жирных кислот с их реэстерификацией в триглицериды [10]. Отсюда гипертриглицеридемия ведет к усилению синтеза атерогенной фракции липопротеинов низкой плотности, формируя дислипотеинемии. Последующая окислительная модификация атерогенных липопротеинов в совокупности с эндогенными метаболитами этанола, в частности ацетальдегидом, усугубляют гиперлипидемию с генерацией активных форм кислорода и инициацией процессов перекисного окисления липидов [8].

В связи с вышеизложенным, в ходе исследований установлено, что введение этанола крысам приводило к развитию у них дислипотеинемии с выраженным изменением липидного спектра крови [2]. В свою очередь, этанол-индуцированная дислипотеинемия сопровождалась у животных контрольной группы повышением концентрации МДА на 75% и ДК на 17%, что свидетельствовало об активации свободнорадикальных реакций и усилении образования первичных и вторичных продуктов перекисации. Наряду с этим, вызываемый под действием индуктора дисбаланс между скоростью переокисления и активностью антиоксидантной защиты характеризовался резким снижением активности каталазы до 54% по сравнению с данными в интактной группе животных (табл. 1).

Таблица 1

Влияние комплексного фитосредства на показатели ПОЛ и антиоксидантной защиты при этаноловой дислипотеинемии у крыс

Группы животных	МДА, мкМ/мл мин	ДК, ед. ОП	Каталаза, мКат/мл
Интактная (n=10)	3,32±0,17	5,90±0,45	0,58±0,03
Контрольная (n=10)	5,83±0,16	6,91±0,56	0,27±0,01
Опытная (n=10)	3,50±0,10*	5,00±0,02*	0,41±0,01*

Примечание: \* – разность статистически значима по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$ .

Как следует из приведенных данных таблицы 1, курсовое превентивное введение испытуемого растительного средства снижало содержание МДА и ДК в сыворотке крови опытной группы крыс на 40% и 28% соответственно, а активность каталазы повышалась по сравнению с соответствующими данными у животных контрольной группы на 52%.

Полученные данные позволяют предположить, что комплексное растительное средство в условиях этаноловой дислипотеинемии снижает интенсивность свободнорадикальных реакций с уменьшением содержания токсических метаболитов-оксидантов и повышает эндогенный антиокислительный потенциал организма.

По всей видимости, выявленная фармакологическая активность фитосредства обусловлена комплексом взаимодействующих и взаимостабилизирующих компонентов, эволюционно сложившихся как защитные системы и предотвращающих излишнее накопление свободнорадикальных соединений при экспериментальной дислипотеинемии. Можно предположить, что высокая степень инактивации свободнорадикальных соединений и установленная фармакологическая активность средства связаны с содержанием в

фитосборе полифенольных соединений, витаминов, каротиноидов и других биологически активных веществ [1,6].

Таким образом, изучаемое фитосредство при экспериментальной этаноловой дислипидемии ингибирует процессы пероксидации и повышает эндогенные резервы

антиоксидантной защиты у крыс. Установленное свойство фитосбора позволяет полагать, что его применение может открыть новые возможности для эффективной комплексной профилактики и терапии нарушений липидного обмена, как ведущего фактора риска атеросклероза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Азам Н., Горошко О.А., Пахомова В.П. Антиоксидантная активность лекарственных субстанций и биологически активных веществ // Традиционная медицина. – 2009. – №1. – С.35-38.
2. Банзаракшеев В.Г., Ажунова Т.А., Нагаслаева О.В. Фармакотерапевтическая эффективность многокомпонентного растительного средства при этаноловой дислипидемии // Сб. тез. VI Национального конгресса терапевтов. – М., 2011. – С.17.
3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело. – 1983. – №3. – С.33-35.
4. Калягин А.Н. Хроническая сердечная недостаточность: современное состояние проблемы. Применение статинов (сообщение 14) // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2008. – Т. 77. №2. – С.101-106.
5. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Методы определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С.16-19.
6. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra // Кардиология. – 2004. – №2. – С.72-81.
7. Мамедов М.Н., Дев А.Д. Оценка суммарного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у взрослых лиц

трудоспособного возраста // Кардиология. – 2008. – №10. – С.28-33.

8. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Бондарь И.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: Арта, 2008. – 284 с.
9. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Демографическая ситуация и сердечно-сосудистые заболевания в России: пути решения проблем // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – №6. – С.7-14.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
11. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭОТАР, 2001. – 256 с.
12. Темирбулатов Р.А., Селезнев Е.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лабораторное дело. – 1981. – №4. – С.209-211.
13. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). – М.: Триада, 2009. – 896 с.
14. Чжуд-ши: канон тибетской медицины / Перевод с тибетского, предисловие, примечания, указатели Д.Б. Дашиева. – М.: Восточная литература РАН, 2001. – 766 с.

**Информация об авторе:** Банзаракшеев Виталий Гамбалович – старший научный сотрудник, к.м.н., 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, тел. (3012) 283926, e-mail: gambalovi4@mail.ru

## СЛУЧАИ ИЗ ПРАКТИКИ

© ЧИКИНЕВ Ю.В., ДРОБЯЗГИН Е.А., БЕРКАСОВА Е.В., КУТЕПОВ А.В., СУДОВЫХ И.Е., КОРОБЕЙНИКОВ А.В., КОТЕЛЬНИКОВ А.И. – 2012  
УДК 616.329-089.844-073.754

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЗОФАГОГАСТРО- И ЭЗОФАГОКОЛОПЛАСТИКИ ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПИЩЕВОДА

Юрий Владимирович Чикинев<sup>1</sup>, Евгений Александрович Дробязгин<sup>1,2</sup>, Инесса Викторовна Беркасова<sup>1,2</sup>, Антон Вадимович Кутепов<sup>1,2</sup>, Ирина Евгеньевна Судовых<sup>2</sup>, Александр Владимирович Коробейников<sup>2</sup>, Александр Иванович Котельников<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Новосибирский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.О. Маринкин, кафедра госпитальной и детской хирургии лечебного факультета, зав. – д.м.н., проф. Ю.В. Чикинев; <sup>2</sup>Государственная Новосибирская областная клиническая больница, гл. врач – Е.А. Комаровский, отделение торакальной хирургии, зав. – А.В. Коробейников)

**Резюме.** Представлены результаты обследования 147 пациентов после эзофагопластики, выполненной при доброкачественных заболеваниях пищевода. Наибольшая частота и специфичность жалоб, выраженность эндоскопических и рентгенологических изменений отмечена у пациентов после эзофагопластики толстой кишкой (правой или левой ее половиной).

**Ключевые слова:** пластика пищевода, болезни искусственного пищевода.

### COMPARTIVE CHARACTERISTICS OF GASTRO- AND COLOPLASTY IN DISEASES OF THE ESOPHAGUS

Yu. V. Chikinev<sup>1</sup>, E. A. Drobjazgin<sup>1,2</sup>, I. V. Bercasova<sup>1,2</sup>, A. V. Kutepov<sup>1,2</sup>, I. E. Sudovikh<sup>2</sup>, A. V. Korobeynikov<sup>2</sup>, A. I. Kotelnikov<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Novosibirsk State Medical University; <sup>2</sup>Novosibirsk State Regional Clinical Hospital)

**Summary.** The results of the survey of 147 patients after esophagoplasty performed in benign diseases of the esophagus have been presented. The highest frequency and specificity of the complaints, the severity of endoscopic and radiographic abnormalities were observed in the patients after esophagoplasty of colon (its right or left part).

**Key words:** plasty of esophagus, diseases of artificial esophagus.

В настоящее время, несмотря на совершенствующиеся методы диагностики и лечения, среди доброкачественных поражений пищевода существуют состояния, которые требуют выполнения эзофагопластики. Это относится к таким заболеваниям, как стриктуры вследствие воздействия химических агентов на стенку пищевода (ожоги различными прижигающими жидкостями, гастроэзофагеальный рефлюкс), нервно-мышечные заболевания пищевода, гигантские доброкачественные опухоли пищевода [1-3,5,6,10,12,13].

Для создания искусственного пищевода может быть использована толстая и тонкая кишка, желудок (целый или желудочный стебель, сформированный по ходу его большой кривизны) [1,2,8-10]. Как правило, предпочтение отдается одному виду эзофагопластики. Причина этого кроется в опыте клиники, что не всегда обуславливает правильный выбор метода эзофагопластики.

Основная масса пациентов, которым выполняются данные вмешательства, как правило, является людьми трудоспособного возраста и большую продолжительность жизни, поэтому отдаленные результаты функционирования искусственного пищевода все чаще подвергаются изучению [4,11,14].

Все это требует более тщательный выбор способа операции и вида эзофагопластики, с учетом изучения функциональных особенностей трансплантата в ближайшем и отдаленном послеоперационном периоде [5,8,10,14].

Цель работы: оценка результатов эзофагопластики при доброкачественных заболеваниях пищевода в сроки более 1 года после вмешательства.

### Материалы и методы

За период с 1995 по 2010 год эзофагопластика при доброкачественных заболеваниях пищевода выполнена 157 пациентам (мужчин – 98 (62,42%), женщин – 59 (37,58%)). Возраст пациентов находился в диапазоне от 16 до 69 лет и в среднем составил  $43,94 \pm 12,15$  лет. Все пациенты подписывали форму добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Показанием к выполнению пластики пищевода являлись:

- рубцовые послеожоговые сужения пищевода при отсутствии эффекта от бужирования пищевода, частых (чаще 4 раз в год) обращений в стационар в течение 1 года после ожога пищевода, неэффективности бужирования пищевода, невозможности проведения бужирования пищевода, перфорация пищевода при эндоскопическом лечении, настойчивое желание пациента (116 пациентов);

- осложнения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: сужения пищевода, резистентные к эндоскопическому лечению, осложненные эрозивно-язвенным эзофагитом, резистентным к антирефлюксной терапии, и (или) в сочетании с пищеводом Барретта (9 пациентов);

- ахалазия пищевода IV стадии (по Б.В. Петровскому), III стадии при наличии дивертикула в нижней трети пищевода (32 пациента).

Давность заболевания при послеожоговом сужении пищевода – от 1 месяца до 31 года, причем пик пациентов приходился на первые 2 месяца, что объясняется началом развития рубцового процесса в пищеводе. Распределение пациентов по повреждающему пищевод агенту представлено следующим образом: щелочь – 62 (53,44%) случая, кислота – 44 (37,93%), яды и суррогаты алкоголя – 3 (2,58%), повреждающее вещество установлено не было – в 7 (6,03%) случаях.

Показаниями к оперативному у 32 пациентов с ахалазией пищевода являлись: первично диагностированная IV стадия заболевания у 23 (71,87%) пациентов, отсутствие эффекта от эндоскопического лечения с переходом в IV стадию – у 7 (21,87%), сочетание III стадии заболевания с дивертикулом нижней трети пищевода, осложненным дивертикулитом, – у 2 (6,25%) пациентов. На момент выполнения операции давность заболевания составляла от 1 года до 5 лет.

Среди оперированных пациентов с рефлюкс-эзофагитом и

пептическими стриктурами у 4 имело место сочетание пептического сужения пищевода с пищеводом Барретта, подтвержденного при патоморфологическом исследовании биоптатов слизистой пищевода (метаплазия по кишечному типу).

Всем пациентам выполнены различные виды реконструктивных вмешательств: эктирпация пищевода с эзофагогастропластикой (79 пациентов), субтотальная шунтирующая эзофагоколопластика (69 пациентов), эктирпация пищевода с пластикой толстой кишки (9 пациентов). При ахалазии пищевода (32) и пептическом сужении (9) выполнена эктирпация пищевода, эзофагогастропластика с изо-перистальтическим положением трансплантата.

Из 157 прооперированных пациентов в сроки от 1 месяца до 15 лет обследованы 140 (69 – после гастропластики; 71 – после колопластики левой половиной ободочной кишки).

Статистическая обработка материала проводилась непараметрическим методом с вычислением критерия  $\chi^2$ . В том случае, если частота хотя бы в одной ячейке таблицы ожидаемых частот была меньше или равна 5, то для сравнения частот качественного показателя в двух независимых группах использовали точный критерий Фишера (ТКФ). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p=0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Сравнительная характеристика жалоб, предъявляемых пациентами после эзофагопластики левой половиной толстой кишки и желудочной трубки, представлена в таблице 1.

При оценке клинического статуса в обеих группах пациентов в течение первых 6-12 месяцев зарегистрированы явления, объединенные нами в астенический синдром. Это общие неспецифические симптомы в виде слабости, утомляемости, снижения физической активности без существенных различий по частоте встречаемости ( $\chi^2=0,12$ ,  $p=0,7296$ ), степени выраженности и длительности проявлений в сравниваемых

Таблица 1

Основные жалобы пациентов после эзофагопластики

Жалобы	Желудочная трубка (n=69)	Толстая кишка (n=71)	Критерий	p
Дисфагия	23	21	$\chi^2=0,12$	0,7296
Демпинг-синдром	11	5	$\chi^2=2,18$	0,1401
Тяжесть в эпигастальной области	7	7	$\chi^2=0$	0,9594
Вздутие на шее	-	6	ТКФ	0,0196
Рефлюкс	9	10	$\chi^2=0,02$	0,8753
Боли в эпигастальной области	-	5	ТКФ	0,0371
Боли по ходу искусственного пищевода	-	5	ТКФ	0,0371
Гипотония трансплантата	3	34	$\chi^2=18,56$	0,00001
Регургитация	2	9	$\chi^2=3,96$	0,0466

группах. Данный синдром купировался самостоятельно или при проведении реабилитационных мероприятий в течение первого года после операции.

Дисфагия была примерно в одинаковом числе наблюдений как после гастропластики (21), так и после колопластики (23). Степень выраженности дисфагии не зависела от вида выполненной эзофагопластики. Рентгенологически нарушения собственно акта глотания зарегистрировано не было, но выявлен стеноз пищеводно-желудочного анастомоза. У 2 пациентов причиной дисфагии явилась патология глотки и пищевода выше сформированного анастомоза, не диагностированная до оперативного вмешательства.

Клинические проявления демпинг-синдрома зарегистрировали в 11 случаях (15,94%) после эзофагогастроластики и в 5 (8,7%) после эзофагоколопластики ( $p>0,05$ ). Причиной демпинг-синдрома после эзофагогастроластики является выполняемая при формировании желудочного трансплантата пилоротомия. При рентгеноскопии искусственного пищевода у этих пациентов выявлена ускоренная эвакуация контрастного вещества в двенадцатиперстную или тощую кишку. Выраженность клинических проявлений варьировала от легкой до средней степени тяжести. Меньшее число пациентов с демпинг-синдромом после эзофагоколопластики и более легкой степенью тяжести демпинг-синдрома может быть обусловлена ее анатомическими особенностями – характер рельефа и конфигурация трансплантата снижают скорость

поступления пищевого болюса в тонкую кишку.

Достаточно специфической жалобой у пациентов после эзофагоколопластики является «вздутие» на шее в области послеоперационного рубца. Это состояние было у 6 пациентов после эзофагоколопластики. У пациентов после эзофагогастропластики данного состояния не отмечено (ТКФ,  $p=0,0196$ ). Данная ситуация связана с особенностью формирования проксимального соустья («конец-в-бок», либо «бок-в-бок»), чего не наблюдается у пациентов после эзофагогастропластики, поскольку анастомоз формируется по типу «конец-в-конец».

Боли по ходу искусственного пищевода имели место у 5 пациентов после эзофагоколопластики и отсутствовали у пациентов после пластики желудочной трубкой (ТКФ,  $p=0,0371$ ). Причиной болевого синдрома, является воспаление слизистой искусственного пищевода (трансплантит), что подтверждено данными эндоскопического исследования, при котором обнаружена отечность, гиперемия слизистой, ее кровоточивость при контакте с аппаратом.

К клиническим нарушениям проходимости искусственного пищевода и эвакуации из него мы отнесли срыгивание пищей, боли в эпигастральной области и рефлюкс. Жалобы на срыгивание пищи предъявляло 2 пациента после пластики желудочной трубкой и 9 пациентов после эзофагоколопластики ( $p=0,0466$ ). Боли в эпигастральной области отмечали 5 пациентов после эзофагоколопластики, чего не наблюдалось у пациентов после пластики желудочной трубкой ( $p=0,0301$ ). Клинически отмечаемый рефлюкс отмечали 9 пациентов после пластики желудочной трубкой и 10 пациентов после пластики левой половиной ободочной кишки ( $p>0,05$ ).

Гипотония искусственного пищевода выявлена у 34 пациентов после эзофагоколо- (47,88%) и 3 после эзофагогастропластики (4,34%) ( $p<0,05$ ) в первые 6 месяцев после операции на основании жалоб на чувство тяжести за грудиной, ощущение замедленного прохождения пищи по пищеводу и отрыжку при отсутствии рентгенологических признаков деформаций и органических препятствий прохождению контрастного вещества по трансплантату.

Наиболее значимые рентгенологические изменения представлены в таблице 2.

Рентгенологические изменения искусственного пищевода

Рентгенологические изменения	Желудочная трубка (n=69)	Толстая кишка (n=71)	Критерий	p
Стеноз проксимального анастомоза	22	20	$\chi^2=0,12$	0,7249
Провисание	-	11	ТКФ	0,0009
Деформация	1	15	$\chi^2=10,75$	0,0010
Рефлюкс	3	20	$\chi^2=10,52$	0,0012

В обеих группах примерно в равном числе случаев (22 после гастропластики и 20 после колопластики) диагностирован стеноз проксимального соустья ( $p>0,05$ ).

Обращает на себя внимание способность толстокишечного трансплантата к деформации: она зарегистрирована у 15 (21,12%) пациентов с давностью эзофагопластики более 3 лет. Только у 1 пациента после эзофагогастропластики выявлена незначительная деформация трансплантата в области прохождения его через диафрагму ( $\chi^2=10,75$ ,  $p=0,0010$ ). Во всех этих наблюдениях (21,12%) отмечалась S-образная деформация

## ЛИТЕРАТУРА

- Алиев М.А., Баймаханов Б.Б., Жураев Ш.Ш. и др. Реконструктивно-восстановительные операции на пищеводе при послеожоговых рубцовых стриктурах // Хирургия. – 2005. – №12. – С.40-43.
- Аллахвердян А.С., Мазурин В.С. Пептические стриктуры пищевода // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2005. – №5. – С.35-44.
- Аллахвердян А.С., Мазурин В.С., Титов А.Г. и др. Эзофагогастропластика при сочетанных послеожоговых стриктурах пищевода, желудка // Тезисы I съезда российского общества хирургов гастроэнтерологов «Актуальные

вопросы хирургической гастроэнтерологии». – Геленджик, 2008. – С.38.

4. Верещак Р.И. Поздние осложнения субтотальной и тотальной эзофагопластики и методы их устранения // Укр. мед. часопис. – 2008. – №4 (66). VII/VIII. – С.121-125.

5. Джафаров Ч.М., Джафаров Э.Ч. Ближайшие и отдаленные результаты хирургического лечения больных с рубцовыми стриктурами пищевода после химического ожога // Вестник хирургии. – 2007. – Т. 166. №5. – С.36-38.

6. Жерлов Г.К., Белоус И.А., Жерлова Т.Г. Восстановление качества жизни больных с ахалазией IV стадии // Тезисы I съезда российского общества хирургов гастроэнтерологов

толстокишечного трансплантата, расположенного в переднем средостении. У 11 (15,49%) пациентов имелось провисание дистального участка искусственного пищевода перед кологастроанастомозом с задержкой пищевых масс, маятникообразным движением контрастной взвеси над уровнем анастомоза, что отсутствовало у пациентов после гастропластики (ТКФ,  $p=0,0009$ ). Кроме этого рефлюкс в искусственный пищевод чаще наблюдался у пациентов после эзофагоколопластики ( $p=0,0012$ ).

Время продвижения контрастной взвеси по толстокишечному трансплантату после пластики правой половиной ободочной кишки с фрагментом подвздошной кишки или левой половиной всех наблюдений было больше нормы клиренса естественного пищевода. Задержка контраста в толстокишечном трансплантате достигала 36 часов.

Основные эндоскопические изменения, выявленные у пациентов после эзофагопластики, представлены в таблице 3.

Таблица 3

Эндоскопические изменения, выявляемые у пациентов после эзофагопластики

Эндоскопические изменения	Желудочная трубка (n=69)	Толстая кишка (n=71)	Критерий	p
Стеноз проксимального соустья	27	23	$\chi^2=0,33$	0,5671
Рефлюкс желчи	24	17	$\chi^2=1,09$	0,2973
Воспалительные изменения слизистой (трансплантит)	19	24	$\chi^2=0,34$	0,5583
Язва трансплантата	-	3	ТКФ	0,1358
Деформация трансплантата	1	13	$\chi^2=9,12$	0,0025
Гипотония трансплантата	-	31	ТКФ	0,00001

Статистически значимых различий между выявленным стенозом после пластики желудочной трубкой и толстой кишкой, наличием желчи в просвете трансплантата не выявлено. При эндоскопическом исследовании у 31 больного (43,66%) после шунтирующей эзофагоколопластики были выявлены признаки гипотонии толстокишечного трансплантата, чего не отмечено после пластики желудочной трубкой ( $p=0,00001$ ).

Умеренно выраженная деформация трансплантата выявлена лишь в 1 наблюдении после эзофагогастропластики и в 13 наблюдениях после эзофагоколопластики ( $p=0,0025$ ), что может быть связано с особенностями стенки желудка. Деформации подвержен кишечный трансплантат, проведенный загрузидно в случае шунтирующей эзофагопластики. При экстирпации пищевода и расположении трансплантата в заднем средостении выраженных нарушений формы искусственного пищевода и эвакуации пищевых масс в наших наблюдениях не отмечено.

Таким образом, большинство из обследуемых пациентов (139 из 140) после эзофагопластики вне зависимости от ее способа и вида трансплантата получили возможность перорального питания. Однако у ряда пациентов после эзофагогастропластики преимущественно в сроки до 2 лет после оперативного вмешательства выявлены случаи нарушения как общего состояния, так и функционирования трансплантата. У пациентов после эзофагоколопластики с течением времени после операции отмечается увеличение жалоб, связанных с нарушением функционирования искусственного пищевода, что подтверждается данными рентгенологического и эндоскопического исследований.

вопросы хирургической гастроэнтерологии». – Геленджик, 2008. – С.38.

4. Верещак Р.И. Поздние осложнения субтотальной и тотальной эзофагопластики и методы их устранения // Укр. мед. часопис. – 2008. – №4 (66). VII/VIII. – С.121-125.

5. Джафаров Ч.М., Джафаров Э.Ч. Ближайшие и отдаленные результаты хирургического лечения больных с рубцовыми стриктурами пищевода после химического ожога // Вестник хирургии. – 2007. – Т. 166. №5. – С.36-38.

6. Жерлов Г.К., Белоус И.А., Жерлова Т.Г. Восстановление качества жизни больных с ахалазией IV стадии // Тезисы I съезда российского общества хирургов гастроэнтерологов

«Актуальные вопросы хирургической гастроэнтерологии». – Геленджик, 2008. – С.50.

7. Касумов Н.А. Рефлюкс-эзофагит: современное состояние проблемы // Хирургия. – 2007. – №4. – С.62-65.

8. Скворцов М.Б., Кожевников М.А., Итополитова Н.С. и др. Пластика пищевода желудком у детей с рубцовыми стриктурами и ее клиническая оценка // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2009. – №8. – С.55-65.

9. Чернявский А.А., Рыжов М.К. Выбор способа завершения изоперистальтической трубчатой эзофагопластики на основании интраоперационной оценки кровоснабжения желудочно-го трансплантата // Хирургия. – 2008. – №2. – С.26-32.

10. Черноусов А.Ф., Ручкин Д.В., Черноусов Ф.А., Балалыкин Д.А. Болезни искусственного пищевода. – М.: Видар, 2008. – 690 с.

11. Aghajanzadeh M., Safarpour F., Koohsari M.R., et al. Functional outcome of gastrointestinal tract and quality of life after esophageal reconstruction of esophagus cancer // Saudi J. Gastroenterol. – 2009. – №15(1). – P.24-28.

12. Chirica M., Veyrie N., Munoz-Bongrand N., et al. Late morbidity after colon interposition for corrosive esophageal injury: risk factors, management, and outcome. A 20-years experience // Ann. Surg. – 2010. – №252(2). – P.271-280.

13. Khan A.Z., Nikolopolous I., Botha A.J., Mason R.C. Substernal long segment left colon interposition for oesophageal replacement // Surgeon. – 2008. – №6(1). – P.54-56.

14. Knezević J.D., Radovanović N.S., Simić A.P., et al. Colon interposition in the treatment of esophageal caustic strictures: 40 years of experience // Dis. Esophagus. – 2007. – №20(6). – P. 530-534.

**Информация об авторах:** Чикинев Юрий Владимирович – д.м.н., заведующий кафедрой, e-mail: chikinev@inbox.ru, тел. (383) 346-30-66; Дробязгин Евгений Александрович – к.м.н., ассистент, эндоскопист, e-mail: evgenyidrob@inbox.ru, тел. (383) 346-30-66, (383) 315-98-38; Беркасова Инесса Викторовна – к.м.н., ассистент, анестезиолог-реаниматолог, e-mail: ness-24@yandex.ru; Кутепов Антон Вадимович – к.м.н., ассистент, врач торакальный хирург, e-mail: ant-ku@cn.ru; Судовых Ирина Евгеньевна – к.м.н., врач-эндоскопист, e-mail: artz77@mail.ru; Коробейников Александр Владимирович – врач торакальный хирург, заведующий отделением; Котельников Александр Иванович – врач торакальный хирург.

## ЛЕКЦИИ

© БАЛАБИНА Н.М. — 2012  
УДК: 616.053.9:378

### ОСОБЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ ПОЖИЛОГО ПАЦИЕНТА В УСЛОВИЯХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО УЧАСТКА

*Наталья Михайловна Балабина*

(Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, зав. – д.м.н., проф. Н.М. Балабина)

**Резюме.** Анализ литературных источников показал, что для сохранения здоровья населения старшего возраста участковым терапевтам необходимо знать и учитывать анатомо-физиологические особенности организма пожилого пациента, с учетом которых назначать антибиотики и антигипертензивные препараты, что позволит значительно снизить риск нежелательных эффектов от лекарств.

**Ключевые слова:** пожилой пациент, лекарственная терапия, участковый терапевт.

### THE PECULIARITIES OF MEDICINAL THERAPY OF ELDERLY PATIENT IN THE CONDITIONS OF THERAPEUTIC STATION

*N.M. Balabina*

(Irkutsk State Medical University)

**Summary.** The analysis of references has shown, that for preservation of health of the population of advanced age it is necessary for local therapists to know and consider anatomy-physiological features of an organism of the elderly patient in view of which to appoint antibiotics and preparations decreasing blood pressure that will allow to lower risk of undesirable effects considerably.

**Key words:** elderly patient, medicinal therapy, divisional therapist.

Человечество стремительно стареет. По прогнозам ВОЗ, в ближайшее десятилетие число жителей Земли, которым исполнится более 60 лет, перевалит за миллиард [28,30,32]. Поэтому сохранение здоровья населения старшего возраста участковым терапевтом имеет огромное общественное и экономическое значение. От этого зависит степень участия пожилых людей в производственной и общественной полезной деятельности, расходы на здравоохранение и социальное обеспечение, а также затраты времени трудоспособных членов семьи на уход за больными и немощными [1,7,10]. Результаты исследований разных лет показывают, что существенное увеличение в структуре населения на терапевтических участках численности лиц пожилого возраста сопровождается закономерным увеличением заболеваемости в этой возрастной группе [2,25]. Лица пожилого возраста употребляют лекарств гораздо больше, чем молодые, так как имеют,

как правило, не одно хроническое заболевание и чаще нуждаются в медицинском обслуживании. Особенности фармакотерапии пожилых пациентов связаны с их возрастом, подбором препаратов и спецификой воздействия лекарственных средств (ЛС) на организм пожилого человека [18,35]. В случае, когда каждое из имеющихся заболеваний требует постоянной лекарственной терапии, в несколько раз возрастает риск развития неблагоприятных эффектов от принимаемых препаратов. Поэтому общие подходы к применению ЛС у пожилых неприменимы, так как в этой группе пациентов выше риск развития побочных реакций лекарственных препаратов [5,12,17]. На наш взгляд, это связано с различными причинами: одновременным употреблением нескольких ЛС пожилым пациентом, широкой распространенностью сосудистых, почечных и неврологических расстройств в этой возрастной группе, а также возрастными изменениями фар-

макокинетики и фармакодинамики ЛС. Следовательно, при подборе лечения пожилому пациенту участковому терапевту необходимо учитывать возрастные особенности метаболизма и выявлять пациентов с высоким риском нежелательных реакций [14,21,30]. Информация об особенностях фармакотерапии в пожилом и старческом возрасте для участкового терапевта чрезвычайно важна, так как многие медицинские работники и сами пациенты недооценивают возможные неблагоприятные последствия от взаимодействия ЛС.

Анатомо-физиологические особенности людей пожилого возраста оказывают влияние на фармакокинетические параметры ЛС. Вследствие уменьшения массы тела, снижения содержания воды и увеличения образования жировой ткани меняется распределение ЛС в организме [3,9,15]. Снижение массы печени, скорости печеночного кровотока и активности ферментов приводит к нарушению метаболизма некоторых антибактериальных препаратов, например, макролидов и требует уменьшения их дозы. Особенности фармакодинамических эффектов у пожилых и старых людей проявляются возрастанием частоты лекарственных осложнений. В возрасте старше 60 лет лекарственные осложнения встречаются приблизительно в 2 раза чаще, чем у 20-летних пациентов, а после 70 лет — в 7 раз [20,27]. При увеличении числа используемых ЛС частота побочных реакций возрастает с 7 до 24. Естественно, что в такой ситуации предпочтительнее моно-, а не полифармакотерапия. Однако при лечении пожилых ограничиваться одним, двумя и даже тремя препаратами удается редко. В связи с множественностью заболеваний две трети лиц старше 65 лет принимают от 5 до 12 таблеток в день. Поэтому у пожилых особенно важно учитывать реакции взаимодействия различных ЛС при их одновременном назначении [1,4,9].

В то же время, распространенные схемы фармакотерапии разработаны и испытаны, как правило, без учета особенностей воздействия лекарственных средств на пациентов старших возрастов. Производители препаратов не уделяют должного внимания проблеме особенностей влияния выпускаемых ими лекарственных средств на пожилых больных [3]. С возрастом связаны и сложности, которые возникают у пациентов при приеме медикаментов. Старикам забывают вовремя принимать лекарства, путают препараты между собой, не могут правильно использовать технические устройства для доставки лекарственных средств (турбохалер, небулайзер и т.д.).

К особенностям медицинского обслуживания пожилых пациентов в поликлинике можно отнести следующие факторы: отсутствие возможности выбора врача; отсутствие возможности выбора лекарств; привязанность пожилых пациентов к «льготным лекарствам»; ориентация на «малобюджетные» способы лечения [3,11]. Нередко пожилые люди обращаются к врачу, будучи уверенными в непогрешимости тех лекарств, которые они получали много лет назад. Зачастую устаревшие лекарства они назначают себе сами, даже вопреки мнению специалиста. Во многом такая ситуация связана с тем, что по целому ряду позиций пожилые относятся к так называемой «социально незащищенной» группе людей, поэтому не могут себе позволить приобретать современные дорогостоящие препараты [6,13]. Одним из зол фармакотерапии пожилых людей является полипрагмазия, которая значительно увеличивает риск побочных реакций лекарственных препаратов, зачастую снижает лечебное действие этих препаратов благодаря антагонистическому действию многих лекарств. Поэтому применение множества ЛС у пациентов старческого возраста настолько же бессмысленно, насколько бессмысленно применение у данной группы больных, например, гормональных контрацептивов.

Невозможно перечислить все возможные побочные эффекты лекарственных препаратов, однако каждый участковый терапевт, рекомендуя тот или иной препарат пожилому человеку, должен быть осведомлен о наиболее часто встречающихся нежелательных явлениях и о том, какие лекарства их вызывают [16,24].

Среди всех случаев побочных реакций на медикаменты около 10% составляют реакции на антибактериальные средства. При этом пероральный прием препаратов наиболее безопасен в отношении аллергических реакций. В силу возрастных изменений почек (уменьшение их массы и количества функционирующих нефронов; снижение почечного

кровотока, скорости клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции) замедляется элиминация многих антибиотиков (пенициллинов, аминогликозидов, карбапенемов и др.). Кроме того, аминогликозиды и некоторые макролиды повышают риск ототоксичности и вестибулотоксичности, а у пожилых достаточно часто встречаются те или иные нарушения со стороны органов слуха и вестибулярного аппарата [8,19]. При этом диагностика поражения органа слуха при лечении аминогликозидами часто оказывается запоздалой из-за обычно нечетких первых признаков ототоксического действия. Обычно снижение слуха симметричное и двустороннее. Вестибулопатия проявляется нарушением равновесия при ходьбе, тошнотой при резких поворотах головы, ощущением опьянения [22]. Такие больные могут предъявлять жалобы и на расстройства зрения. Поражения слуха при лечении аминогликозидами иногда бывают очень тяжелыми, приводящими к полной глухоте. Вестибулярные расстройства регрессируют после отмены антибиотика. Ототоксическое действие аминогликозидов объясняется их повышенной концентрацией в плазме крови, перилимфе внутреннего уха. Особенно чувствительны к токсическому действию аминогликозидов сенсорные клетки кортиева (спирального) органа, которые не регенерируют после поражения [26]. Этим объясняется необратимость ототоксических осложнений. Очень опасно применение аминогликозидов у больных с нарушением функции почек, поскольку в этих случаях возрастает их концентрация в крови и, следовательно, в эндолимфе внутреннего уха. Кураре-подобное действие (нервно-мышечная блокада) аминогликозидов проявляется параличами, в частности дыхательной мускулатуры.

Побочными эффектами макролидов у пожилых могут быть поражения печени и потенцирование нарушений ритма сердца, которые нередки в этой возрастной группе [23]. Таким образом, пожилым пациентам с нарушением функции печени и больным с заболеваниями сердца следует назначать меньшие дозы макролидов или применять антибиотик другой группы.

Частыми побочными эффектами терапии тетрациклинами является раздражение слизистой желудочно-кишечного тракта особенно поражения пищевода разной степени. Большинство случаев этой лекарственной патологии остается недиагностированной [29]. Клинически приблизительно у 3/4 больных отмечаются боли при глотании или загрудинные боли по типу стенокардии, в 20% случаев — дисфагия. С целью профилактики лекарственных эзофагитов лица, страдающие заболеваниями пищевода, должны принимать тетрациклины с максимальным количеством воды и находясь в вертикальном положении. Больным, ранее перенесшим лекарственный эзофагит, лучше принимать ЛС в форме суспензии или раствора [31]. У больных с хронической почечной недостаточностью тетрациклины (за исключением доксициклина, выделяющегося с калом) увеличивают содержание азота в крови. Таким больным тетрациклины следует назначать осторожно. В свою очередь фармакокинетика доксициклина у пациентов с нарушенной функцией почек не меняется. Фототоксические дерматиты описаны для всех препаратов этой группы. В настоящее время считают, что фоточувствительность является скорее токсической реакцией, чем аллергической, и связана с накоплением лекарств в коже [33]. Редким осложнением терапии тетрациклинами является геморрагический диатез. Его возникновение объясняют влиянием лекарств на эндогенную продукцию витамина К. Побочные эффекты взаимодействия тетрациклинов чаще всего связаны с одновременным приемом пищи и двухвалентных металлов (кальций, магний и др.) и препаратов железа. Трехчасовой интервал между приемом ЛС исключает подобное взаимодействие [34]. Однако учитывая элемент полифармакотерапии, лучше выбрать антибиотик с продолжительностью действия 12-24 часа и таким образом с одно- или двукратным приемом в сутки. В настоящее время наиболее часто применяемым антибиотиком из группы тетрациклинов в условиях поликлиники является доксициклин. Более того, в последние годы спектр показаний к назначению доксициклина значительно расширился. Доказана эффективность доксициклина при ревматических болезнях. Получены данные, позволяющие обсуждать возможность предупреждения метастазирования злокачественных опухолей путем применения доксициклина [12,22]. Теоретически доказано, что длительная терапия доксициклином способна

задержать прогрессирующее увеличение аневризмы аорты, серьезного заболевания, которое обычно развивается в пожилом возрасте и может привести к смерти. Доксидиклин в виде соли хорошо переносится и редко вызывает серьезные осложнения.

Достаточно часто в амбулаторной практике встречаются ошибки при лечении артериальной гипертензии у пожилых пациентов. Это, во-первых, применение устаревших препаратов. Пожилые пациенты привыкли к определенной группе препаратов и продолжают принимать только их. Врач же зачастую не старается разубедить больного. Во-вторых, отсутствие адекватного контроля эффекта лечения [12]. Целевыми уровнями артериального давления у пожилых больных следует считать: в общем случае <140/90 мм рт. ст.; при сахарном диабете — <130/80 мм рт. ст.; при протеинурии > 1 г/сут. — <125/75 мм рт. ст. В-третьих, резкое и быстрое снижение АД пожилых в связи с наличием у них выраженного склероза мозговых артерий и высокого риска, как минимум, транзиторной ишемической атаки, а как максимум — развития инфаркта мозга. В-четвертых, отсутствие рекомендаций по изменению образа жизни [13]. Почему-то считается, что пожилых людей поздно переучивать. Между тем, рекомендация начать лечение артериальной гипертензии с изменения образа жизни (снизить, к примеру, потребление соли и жид-

кости) в группах минимального риска, возможно, позволит в дальнейшем избежать той самой «полипрагмазии» у значительной части пациентов [15]. В-пятых, назначение пациентам с низкой комплаентностью препаратов, обладающих синдромом отмены (клонидин, бета-блокаторы). Старые люди не отличаются высокой дисциплинированностью в отношении приема лекарственных средств. Вероятность того, что оставленный без присмотра родных человек с инволюционными изменениями памяти перестанет в какой-то момент принимать, например, бета-адреноблокатор, довольно велика [22]. Подобная отмена может привести к самым серьезным последствиям: гипертонический криз, нарушения сердечного ритма, дестабилизация стенокардии, развитие инфаркта миокарда и даже внезапная смерть [25].

В заключение следует отметить, что в настоящий момент участковый терапевт для того, чтобы сделать жизнь пожилых людей эмоционально насыщенной и менее тягостной в физическом отношении, должен при назначении лекарственного препарата пожилому человеку учитывать все возможные негативные последствия от этого назначения. Немалая роль в решении этой проблемы принадлежит учету анатомо-физиологических особенностей лиц пожилого возраста, которые и определяют фармакодинамику лекарственного вещества в организме пожилого больного.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев Ф.Т., Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю. Хроническая сердечная недостаточность. Избранные лекции по кардиологии. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — С.162-187.
2. Антибактериальная терапия / Под ред. Л.С. Страчунского и др. — М., 2007. — С.191-215.
3. Гастроэнтерология. Клинические рекомендации. — Вып. 2. — М., 2008. — С.401-479.
4. Гастроэнтерология. Национальное руководство / Под ред. В.Т. Ивашкина. — М., 2008. — С.321-378.
5. Баранов А.А., Беленков Ю.Н., Володин Н.Н. и др. Клинические рекомендации. Стандарты ведения больных. — Вып. 2. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — С.312-443.
6. Внутренние болезни с основами доказательной медицины и клинической фармакологией / Под ред. В.С.Моисеева. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — С.201-326.
7. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предсказательной медицины / Под ред. В.С. Баранова. — СПб.: Н-Л, 2009. — С.275-393.
8. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины. — Пер. с англ. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — С.125-423.
9. Заболевания внутренних органов в амбулаторной практике / Под ред. В.Г. Радченко. — СПб.: Диалект, 2008. — С.102-164.
10. Звенигородская Л.А., Бондаренко Е.Ю., Чукунова Б.З. Клинические особенности и роль НР у пожилых больных с язвенной болезнью // РМС. — 2006. — №8(1). — С.1-5.
11. Ивахненко И.В., Куличенко Л.Л. Бронхообструктивный синдром в практике участкового терапевта. — Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2007. — С.123-198.
12. Кардиология. Национальное руководство / Под ред. Ю.Н. Беленкова и др. — М., 2007. — С.215-293.
13. Кардиология. Клинические рекомендации / Под ред. Ю.Н. Беленкова и др. — М., 2007. — С.126-187.
14. Куличенко Л.Л., Чернышев Е.П., Колесникова И.Ю. Экспертиза временной нетрудоспособности и медико-социальная экспертиза в практике врача терапевта больницы и амбулаторно-поликлинического звена: Учебное пособие для самостоятельной подготовки студентов, интернов и клинических ординаторов. — Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. — С.43-61.
15. Неотложная помощь в терапии и кардиологии: Рук-во / Под ред. Ю.И. Гринштейна. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — С.143-162.
16. Нефрология. Национальное руководство / Под ред. Н.А. Мухина. — М., 2008. — С.32-134.
17. Организация и оценка качества лечебно-профилактической помощи населению: учебное пособие / Под ред. В.З. Кучеренко. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — С.12-21.
18. Пульмонология. Национальное руководство. / Под

ред. А.Г. Чучалина. — М., 2008. — С.78-201.

19. Пульмонология. Клинические рекомендации / Под ред. А.Г. Чучалина. — М., 2008. — С.104-189.
20. Рациональная антимикробная фармакотерапия: Рук-во для практикующих врачей / Под ред. В.П. Яковлева, С.В. Яковлева. — М.: Литтерра, 2003. — С.126-198.
21. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов дыхания: Рук-во для практикующих врачей / А.Г. Чучалин, С.Н. Авдеев и др. — М.: Литтерра, 2004. — С.179-283.
22. Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний: Руководство для практических врачей / Под ред. Е.И. Чазова, Ю.Н. Беленкова. — М.: Литтерра, 2006. — С.201-253.
23. Рациональная антимикробная фармакотерапия / Под ред. В.П. Яковлева, С.В. Яковлева. — М., 2003. — 1001 с.
24. Рациональная фармакотерапия. Справочник терапевта: Рук-во для практикующих врачей / Под ред. Л.И. Дворецкого. — М.: Литтерра, 2007. — С.56-172.
25. Реабилитация кардиологических больных / Под ред. К.В. Лядова, В.Н. Преображенского. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — С.253-301.
26. Руководство по первичной медико-санитарной помощи / Под ред. А.А. Баранова, И.Н. Денисова, А.Г. Чучалина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — С.204-281.
27. Руководство по амбулаторно-поликлинической кардиологии / Под ред. Ю.Н. Беленкова, Р.Г. Оганова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — С.264-172.
28. Руководство по геронтологии и гериатрии. В 4 т. / Под ред. А.С. Мелентьева, В.Н. Ярыгина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — С.172-216.
29. Руководство по клиническому обследованию больного. — Пер. с англ. — М., 2008. — С.102-125.
30. Руководство по медицинской профилактике / Под ред. Р.Г. Оганова и др. — М., 2007. — С.346-417.
31. Руководство по рациональному использованию лекарственных средств (формуляр) / Под ред. А.Г. Чучалина и др. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — С.251-305.
32. Руководство по медико-социальной работе в геронтологии / Под ред. П.И. Сидорова, Р.В. Банниковой. — Архангельск, 2000. — 289 с.
33. Руксин В.В. Неотложная амбулаторно-поликлиническая кардиология: Краткое руководство. — М., 2007. — С.54-89.
34. Уорд Д., Уорд Д., Лич Р., Винер Ч. Наглядная пульмонология: учебное пособие. — Пер. с англ. — М., 2008. — С.101-145.
35. Чазова И.Е., Ратова Л.Г. Комбинированная терапия артериальной гипертензии. — М.: МедиаМедика, 2007. — С.231-262.
36. Staessen J., Fagard R., Lijnen P, et al. The hypotensive effect of propranolol in captopril-treated patients does not involve the plasma renin-angiotensin-aldosterone system // Clin Sci. — 1981. — Vol. 61. — P.441-444.



# ПЕДАГОГИКА

© КАЛУЦКИЙ П.В., МЕДВЕДЕВА О.А., ЕФРЕМОВА Н.Н., КЛИМОВА Л.Г., ЖИЛЯЕВА Л.В. – 2012  
УДК:378.02:37.016

## РАБОЧАЯ ТЕТРАДЬ КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ В ИННОВАЦИОННОМ СОЦИАЛЬНО-ОРИЕНТИРОВАННОМ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ

Павел Вячеславович Калущкий, Ольга Анатольевна Медведева, Наталья Николаевна Ефремова,  
Людмила Григорьевна Климова, Людмила Владимировна Жилыева  
(Курский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. В.А. Лазаренко,  
кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, зав. – д.м.н., проф. П.В. Калущкий)

**Резюме.** Рабочая тетрадь является важным предметно-знаковым средством обучения, получившим общее признание у преподавателей и учащихся. Учебная деятельность в них специально конструируется и отражается в определенной логике. Использование рабочей тетради облегчает педагогу планирование занятия, позволяет сочетать устную и письменную работу, избавляет студентов от большого объема механической работы, а также способствует индивидуализации процесса обучения.

**Ключевые слова:** самостоятельная работа студентов, рабочая тетрадь, образовательный процесс.

## WORKBOOK AS A PART OF THE STUDENTS INDEPENDENT WORK IN AN INNOVATIVE SOCIALLY-ORIENTED EDUCATIONAL PROCESS

P.V. Kalutsky, O.A. Medvedeva, N.N. Efremova, L.G. Klimova, L.V. Zhilyaeva  
(Kursk State Medical University)

**Summary.** The workbook is an important subject-significant learning tool that has received general acceptance from teachers and students. The workbook activities are specifically designed and is reflected in a certain logic. Using a workbook facilitates teacher lesson planning, allows to combine oral and written work, saves students from a large amount of mechanical work, and also promotes learning process individualization.

**Key words:** independent work of students, a workbook, the educational process.

Одной из важнейших проблем, стоящих перед преподавателями любого образовательного учреждения высшего звена, является повышение качества подготовки и формирование творческой личности специалиста, способного к саморазвитию, самообразованию, инновационной деятельности [6,9,10,13]. Решение этих проблем вряд ли возможно только путем передачи знаний в готовом виде от преподавателя к студенту. Необходимо перевести студента из пассивного потребителя знаний в активного творца, умеющего сформулировать проблему, проанализировать пути ее решения, найти оптимальный результат и доказать его правильность.

Происходящая в настоящее время реформа высшего образования, связана по своей сути с переходом от парадигмы обучения к парадигме образования. Поэтому следует признать, что самостоятельная работа студентов это не просто важная, а основная форма образовательного процесса [1,3,5,7].

Это предполагает ориентировать студентов на активные методы овладения знаниями, развитие их творческих способностей, переход от поточного к индивидуализированному обучению с учетом потребностей и возможностей личности. Речь идет не просто об увеличении числа часов на самостоятельную работу. Усиление роли самостоятельной работы студентов означает принципиальный пересмотр организации учебно-воспитательного процесса в ВУЗе, который должен строиться так, чтобы развивать умение учиться, формировать способности к саморазвитию, творческому применению полученных знаний, способам адаптации к профессиональной деятельности в современном мире. Самостоятельная работа студентов (СРС) – это процесс активного, целенаправленного приобретения студентом новых для него знаний и умений без непосредственного участия преподавателей. СРС должна быть конкретной по своей предметной направленности и сопровождаться эффективным контролем и оценкой ее результатов [2,5]. Поиск путей совершенствования заставляет учебные заведения пересматривать как содержание образования и обучения, так и технологию образовательного процесса.

Во время обучения педагог наряду с учебниками использует разнообразный дидактический материал, несущий информационную нагрузку занятия (тесты, программированного контроля, видеofilмы, ситуационные задачи). В последнее время деятельность педагога по формированию

новых знаний и умений не мыслима без средств организации познавательной деятельности учащихся (структурно-логических средств, обобщенных алгоритмов решения задач и т.д.) [12,14].

Одним из важных предметно-знаковых средств обучения, получивших в последнее время общее признание у преподавателей и учащихся, является рабочая тетрадь, учебная деятельность в которой специально конструируется и отражается в определенной логике.

Суть конструкта ёмко выразил Л.Н. Ланда: «Обеспечить пооперационное формирование мыслительных процессов». Операции ученый образно представил в виде «кирпичиков мыслительной деятельности» [1].

Современная рабочая тетрадь – это дидактический комплекс, предназначенный для самостоятельной работы студентов в аудиторное время практического занятия, а также во внеурочное время непосредственно на её страницах. Использование рабочей тетради облегчает педагогу планирование занятия, позволяет сочетать устную и письменную работу, избавляет студентов от большого объема механической работы, а также способствует дифференциации и индивидуализации процесса обучения. Структура рабочей тетради может быть различной, что, в свою очередь обусловлено содержанием изучаемого предмета, степенью его сложности, исходным уровнем подготовки аудитории, условиями обучения, творческими особенностями преподавателя. Назначение рабочей тетради состоит в том, чтобы помочь студентам в освоении трудного для них теоретического курса, показать возможные методы и приемы анализа материала. Выполнение упражнений, решение задач, чтение учебной и научной литературы способствует развитию самостоятельного мышления студентов, поэтому преподаватель должен дать возможность студентам самим найти решение и аргументировать его, привлекая теоретические знания, усвоенные на лекциях и дополнительный материал. Роль преподавателя состоит в том, чтобы пробудить интерес к изучаемому предмету.

Мы хотим поделиться опытом применения рабочей тетради на практике. Дисциплина «Микробиология, вирусология, иммунология» относится к базовым дисциплинам, и является одним из основных предметов, изучаемым студентами на 2-3 курсах обучения. Рабочая тетрадь по дисциплине «Микробиология, вирусология, иммунология» составлена со-

гласно Государственному образовательному стандарту в соответствии с рабочей программой курса и является компонентом учебно-методического комплекса. На кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии, подготовленные, изданные рабочие тетради по дисциплине «Микробиология, вирусология, иммунология», успешно используются студентами лечебного, педиатрического, фармацевтического, стоматологического факультетов и студентов лечебного факультета, обучающиеся на английском языке. Дисциплину «Микробиология, вирусология и иммунология» студенты изучают на протяжении двух семестров. В первом семестре изучается общая микробиология (вопросы морфологии, физиологии, экологии микроорганизмов, вопросы генетики, инфекции и инфекционной иммунологии). Во втором семестре разбираются вопросы медицинской (частной) микробиологии.

Разделы рабочей тетради следуют логике расположения учебного материала в учебной программе курса «Микробиология, вирусология, иммунология» и содержат 36 учебных тем. Структура рабочей тетради может быть различной, что, в свою очередь, обусловлено содержанием изучаемого предмета, степенью его сложности. Предлагаемая нами рабочая тетрадь структурирована следующим образом:

- тематически план практических занятий на год;
- правила работы в бактериологической лаборатории;
- материал практических занятий по темам, который предусматривает обязательное выполнение заданий для самоподготовки и практическую работу студента на текущем занятии.

Задания построены так, что, работая над ними, студент не может не производить всех операций, его ошибка на каждом этапе учебного познания должна быть замечена педагогом и при этом она исправляется на месте, где была совершена.

Следует отметить, что единая логика и алгоритм представления учебной информации, практической деятельности учащихся во всём объёме рабочей тетради, переходят в метод учебной работы.

Для того чтобы научить студентов думать, рассуждать, мы не только знакомим их с заданиями, но и требуем, чтобы они их выполняли. Мы организовали обучение таким образом, что студенты в процессе усвоения знаний и тренировки, обязательно осуществляют нужные операции, и не могут уйти от решения задачи.

Для того чтобы использование рабочей тетради стало эффективным, были выполнены следующие условия:

- обеспечение правильного сочетания объема аудиторной и самостоятельной работы;
- методически правильная организация работы студента в аудитории и вне её;
- обеспечение студента необходимыми методическими материалами с целью превращения процесса самостоятельной работы в процесс творческий;
- контроль за ходом самостоятельной работы студента и мерами, поощряющими студента за ее качественное выполнение.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алханов А. Самостоятельная работа студентов // Высшее образование в России. – 2005. – №11. – С.6-89.
2. Берденникова, Н.Г., Меденцев В.И., Панов Н.И. Организационное и методическое обеспечение учебного процесса в вузе: Учебно-методическое пособие. – СПб.: Д.А. Р. К., 2006. – 208 с.
3. Васенов Ю.Б. Организация и управление учебным процессом вуза при переходе на ФГОС ВПО нового поколения: Учебное пособие. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2007. – 244 с.
4. Гарунов М.Г. Самостоятельная работа студентов. – М.: Знание, 1998.
5. Гузев В.В. Системные основания образовательной технологии. – М.: Знание, 2005.
6. Жиркова З.С., Новгородова Н.Н., Бехтеева Н.Г., Гавришева Н.Д. Роль самостоятельной работы студентов в образовательном процессе // Успехи современного естествознания. – 2011. – №8 – С.169-171.
7. Мелехова Л.И., Ростова Н.Н. Организация самостоятельной работы студентов в медицинском вузе: Методические рекомендации для преподавателей. – Кемерово: КемГМА, 2010. – 23 с.
8. Методические рекомендации по разработке и реали-

По нашему мнению основными функциями рабочей тетради являются:

*обучающая* – помогает формировать у студентов необходимые знания и умения;

*развивающая* – способствует развитию устойчивого внимания на занятии и помогает воспринимать учебный материал;

*воспитывающая* – аккуратность в ведении конспекта;

*формирующая* – навыки самоконтроля при условии систематического заполнения листов рабочей тетради;

*рационализирующая* – правильную организацию учебного времени и практической работы студентов;

*контролирующая* – помогает осуществлять контроль самостоятельной работы студентов. При этом у преподавателя появляется возможность осуществлять его постоянно, на всех практических занятиях [8,11].

Экономия времени преподавателей, простота разработки методов наряду с их высокой эффективностью, объективностью, продуманность и четкая постановка вопросов – таков неполный перечень преимуществ работы студента с рабочей тетрадью. По нашему мнению, рабочая тетрадь решает одну из главных проблем в обучении – организацию самостоятельной работы студентов на занятии в инновационном социально ориентированном образовательном процессе. Общеизвестно, что знание, которое включается в самостоятельную деятельность учащегося, усваивается значительно лучше в сравнении с тем, которое сообщается педагогом как готовое. Практика показывает, что использование рабочей тетради вызывает интерес к осваиваемому материалу, методам обучения и образовательному процессу вообще. В ходе рефлексии проведенных занятий студенты выделяют среди положительных моментов: снижение утомляемости, отсутствие монотонности, учет индивидуальных особенностей и, как следствие, выбор последовательности выполнения заданий, возможность проявить себя, предвосхищение результата своей деятельности, повышение мотивации, возможность проектирования своего процесса обучения [4,11].

В работе с рабочей тетрадью реализованы дидактические принципы обучения: целостность, структурность, преемственность, связь с другими предметами в профессиональной подготовке выпускников. Выражены системность, действия по творческому развитию личности студента и создание необходимых условий для развития. В заключении можно отметить, что разработка рабочей тетради является вполне современным способом ведения учебного процесса. Несомненные преимущества налицо: проверка усвоения материала, контроль мыслительной деятельности учащихся, проверка полученных знаний. Занятия проходят более разнообразно, и как следствие этого повышенный интерес аудитории, возможность исправлять ошибки в момент, когда они делаются. Такой тип обучения подходит для студентов всех факультетов. Применение рабочей тетради улучшает качество образования, повышает эффективность учебного процесса.

зации на основе деятельностно-компетентностного подхода образовательных программ ВПО, ориентированных на ФГОС третьего поколения / Т.П. Афанасьева, Е.В. Караваева, А.Ш. Канукова и др. – М.: Изд-во МГУ, 2007. – 96 с.

9. Морозова Л.А. Особенности самообразовательной деятельности в условиях вуза // Проблемы уч.-метод. и воспитательной работы в вузе: материалы III межрегион. науч.-практ. конф. – Сургут: Изд-во СурГУ, 2006. – Т. 2. – С.124-130.

10. Портных В. О воспитании самостоятельности студентов // Высшее образование в России. – 2006. – №7. – С.155-157.

11. Прокотьев М.Н. К вопросу об инновационном подходе в организации самостоятельной работы студентов медицинского вуза // Фундаментальные исследования. – 2009. – №9 – С.68-70.

12. Рубаник А., Большаков Г., Тельных Н. Самостоятельная работа студентов // Высшее образование в России. – 2005. – №6. – С.120-124.

13. Селезнева Н.А. Качество высшего образования как объект системного исследования. – М.: Исследовательский центр проблем качества подготовки специалистов, 2005. – 96 с.

14. Сенаищенко В., Жалнина Н. Самостоятельная работа студентов, актуальные проблемы // Высшее образование в России. – 2006. – №7. – С.103-109.

**Информация об авторах:** Калущий Павел Вячеславович – заведующий кафедрой, д.м.н., проф., 305033 г. Курск, ул. Карла Маркса, д. 3, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, тел. (4712) 58-81-43, email:luci26@rambler.ru; Медведева Ольга Анатольевна – доцент, к.ф.н., Ефремова Наталья Николаевна – старший преподаватель, к.б.н.; Климова Людмила Григорьевна – старший преподаватель, к.м.н.; Жилиева Людмила Владимировна – ассистент, к.м.н.

## ЮБИЛЕИ

УДК

### КИБОРТ РУДОЛЬФ ВАДИМОВИЧ (К 75-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)

### KIBORT RUDOLF VADIMOVICH (TO THE 75 ANNIVERSARY SINCE BIRTHDAY)



В апреле 2012 года отметил свой 75-летний юбилей доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и почётный профессор Иркутского государственного медицинского университета Рудольф Вадимович Киборт.

Родился 03.04.1937 года в г. Хабаровск в семье военнослужащего, по роду службы отца жил в разных городах Советского Союза (Хабаровск, Благовещенск, Москва). В сентябре 1941 года семья переехала в Кабанский район Бурятской АССР, а в 1947 году – в Иркутск. В школу пошёл учиться в 1944 году, а закончил её в 1954 году. В 1955 году сдал экзамены и был зачислен на санитарно-гигиенический факультет Иркутского государственного медицинского института, с которым и связал все последующие годы своей жизни.

Начиная со 2-го курса стал заниматься в научном кружке кафедры микробиологии под руководством заведующей кафедрой доцента Клавдии Аввакумовны Нестеренко. Выступал на ежегодных студенческих научных конференциях. После окончания института в 1961 году был направлен в целевую аспирантуру на кафедру микробиологии Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института, где под руководством известного учёного, профессора Георгия Николаевича Чистовича выполнил кандидатскую диссертацию

на тему «Распространение патогенных стафилококков в природе и их санитарно-показательное значение», которую успешно защитил в 1966 году. После окончания аспирантуры вернулся на родную кафедру микробиологии ИГМИ и стал работать ассистентом, а с 1972 года – доцентом. С 1975 года – заведующим кафедрой микробиологии, в этой должности работал до 31 августа 2009 года. В 1988 году защитил в Институте иммунологии РАМН (Москва) диссертацию на соискание учёной степени доктора медицинских наук на тему «Иммунный статус организма человека при стафилококковых инфекциях (взаимосвязи иммунологических параметров)». В 1990 году ему присвоено учёное звание профессора.

В период заведования кафедрой Р.В. Киборта преподавательский состав её был стабилен. Научным направлением работы кафедры были вопросы общей и частной иммунологии, иммунитета при стафилококковых инфекциях и изучались стафилококки как возбудители внутрибольничных инфекций.

Р.В. Киборт является автором более чем 230 научных печатных работ, в том числе монографий, методических рекомендаций, статей в зарубежных и центральных изданиях. Имеет авторские свидетельства на изобретения, патенты и рационализаторские предложения. Руководитель и консультант 7 кандидатских и 1 докторской диссертации. Руководит подготовкой интернов, клинических ординаторов и практических врачей по специальности «Бактериология», оказывает большую консультативную помощь сотрудникам бактериологических лабораторий г. Иркутска и Иркутской области. Является членом лабораторного совета и членом правления Иркутского отделения Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Участник съездов микробиологов и эпидемиологов, а также целой серии международных, всероссийских и региональных конференций микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов. Труд Рудольфа Вадимовича отмечен юбилейной медалью «За доблестный труд», «За строительство БАМа», медалью «Ветеран труда», значками «Отличнику здравоохранения», «Изобретатель СССР», многочисленными почётными грамотами и благодарностями, в частности Избирательной комиссии Иркутской области. Указом Президента Республики Бурятия удостоен почётного звания «Заслуженный врач Республики Бурятия».

В 2009 году за большой вклад в развитие родного вуза он удостоен высокого звания – почётный профессор Иркутского государственного медицинского университета.

Редакционные коллеги «Сибирского медицинского журнала», Иркутской областной газеты «Медик», администрация сотрудники кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Иркутского государственного медицинского университета, коллеги и многочисленные ученики искренне желают Рудольфу Вадимовичу долгих лет жизни, крепкого здоровья, новых творческих идей, планов, активного труда в стенах университета.